

И. В. Астраханцева¹, М. В. Кувишинов¹, В. В. Краснов², Т. И. Уланова¹, А. П. Обрядина¹, Л. Ю. Волова³

ИЗУЧЕНИЕ ПРОФИЛЕЙ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ИММУННОГО ОТВЕТА У ДЕТЕЙ ПРИ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗЫВАЕМОЙ ВИРУСОМ ЭПШТЕЙНА-БАРР

¹ООО Научно-производственное объединение "Диагностические системы", 603093 Нижний Новгород, ул. Яблонева, 22, а/я 69;

²ГОУ ВПО Нижегородская государственная медицинская академия, 603005 Нижний Новгород, пл. Минина, 10/1;

³ГУЗ Ямало-Ненецкий окружной центр по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями

В настоящее время большую актуальность приобрели проблемы персистирующих инфекций. Одним из приоритетных направлений в этой области является изучение заболеваний, обусловленных вирусом Эпштейна—Барр (ВЭБ), относящимся к семейству герпес-вирусов IV типа. Целью настоящей работы было изучение закономерности развития иммунного ответа на ВЭБ-инфекцию в зависимости от возраста пациента. Были исследованы образцы сывороток крови детей в возрасте от 5 дней до 17 лет (n = 411), доноров (n = 503) и рожениц (n = 49). Определяли наличие следующих маркеров ВЭБ-инфекции: анти-VCA-IgM, анти-VCA-IgG, анти-EA-IgG, анти-NA-IgG. Сыворотки, содержащие анти-VCA-IgG, были дополнительно исследованы на определение авидности специфических антител. Результаты настоящего исследования показали, что к трем годам жизни уровень инфицированности ВЭБ достоверно не отличается от уровня у взрослых доноров и составляет более 95%. При этом около 40% детей инфицируются в течение первого года жизни. Выявлена тенденция к увеличению частоты первичного инфицирования у детей пубертатного возраста. IgG EA как маркер активной ВЭБ-инфекции наиболее характерен для групп детей 14-17, 1-2 лет. Анти-VCA-IgM не являются достоверным маркером первичной инфекции. Для достоверной диагностики стадии ВЭБ-инфекции необходимо комплексное определение серологического профиля.

К л ю ч е в ы е с л о в а: вирус Эпштейна-Барр, возраст, антитела, авидность, инфицированность

V. Astrakhantseva¹, M. V. Kuvshinov¹, V. V. Krasnov², T. I. Ulanova¹, A. P. Obryadina¹, L. Yu. Volova³

STUDY OF REGULARITIES OF AN IMMUNE RESPONSE IN CHILDREN WITH EPSTEIN-BARR VIRUS INFECTION

¹ *Diagnosticheskkiye Sistemy Research-and-Production Association, 22 Yablonevaya St., Nizhni Novgorod 603093, PO 69;* ² *Nizhni Novgorod State Medical Academy, 10/1 Minin St., Nizhni Novgorod 603005;* ³ *Yamalo-Nenets District Center for Prevention and Control of AIDS and Infectious Diseases*

Persistent infections have now become an increasingly urgent problem. One of the priorities in this area is to study diseases caused by Epstein-Barr virus (EBV) belonging to the family of herpes viruses type IV. The purpose of this investigation was to study the mechanisms of development of an immune response to EBV infections in relation to the patient's age. Serum samples from in 411 children aged 5 days to 17 years, 503 donors, and 49 parturients were tested for the following markers of EBV infection: anti- VCA-IgM, anti- VCA-IgG, anti-EA-IgG, anti-NA-IgG. The sera containing anti- VCA-IgG were further examined for the avidity of specific antibodies. The present investigation has shown that the EBV infection rates at 3 years of life do not differ significantly from those in adult donors and it was more than 95%. At the same time, about 40% of the children become infected during the first year of life. There is a tendency for higher rates of primary infection in pubertal children. IgG-EA as a marker of active EBV infection is most characteristic of infants aged 1 to 2 years and children aged 14 to 17 years. Anti- VCA-IgM is not a valid marker of primary infection. Comprehensive determination of a serological profile is required for the valid diagnosis of the stage of EBV infection.

Key words: *Epstein-Barr virus, age, antibodies, avidity, infection rates*

В настоящее время большую актуальность приобрели проблемы персистирующих инфекций. Одним из приоритетных направлений в этой области является изучение заболеваний, обусловленных вирусом Эпштейна—Барр (ВЭБ), относящимся к семейству герпес-вирусов IV типа.

ВЭБ представляет собой В-лимфотропный вирус человека. После попадания в организм вирусная ДНК может встраиваться в геном В-лимфоцитов и реплицироваться вместе с ДНК клетки-хозяина, что является причиной латентной инфекции, которая длится пожизненно. По современным оценкам инфицированность населения ВЭБ очень высока и приближается к 99% [1, 2, 7, 8, 11].

Обычно первичное инфицирование ВЭБ происходит в возрасте до 5 лет и в большинстве случаев протекает бессимптомно либо под маской ОРВИ. При инфицировании в более старшем возрасте может развиваться клиническая картина инфекционного мононуклеоза. У иммунокомпетентных лиц вирус сохраняется в организме в латентной форме, у иммунокомпрометированных возможно развитие хронического мононуклеоза, увеита, гепатита, тяжелых лимфопролиферативных заболеваний. Вследствие иммуносупрессии различного происхождения может происходить реактивация латентной инфекции.

Внутриутробное инфицирование ВЭБ приводит к развитию у новорожденных некротического гепатита, менингоэнцефалита, пневмонии, тяжелых пороков развития; при этом смертность может достигать 30%.

Особенностью гуморального иммунного ответа на ВЭБ-инфекцию является дифференцированный по времени синтез специфических иммуноглобулинов к различным вирусным белкам: вирусному капсидному антигену (VCA), раннему антигену (EA), нуклеарному (ядерному) антигену (NA). Следовательно, информативность и эффективность диагностики повышается при одновременном определении антител ко всем вирусным белкам, что позволяет не только выявить присутствие возбудителя [8,13], но и дифференцировать стадию ВЭБ-инфекции (см. таблицу).

На ранних фазах развития инфекции в образцах сывороток крови пациента обнаруживаются анти-VCA-IgM и анти-VCA-IgG, причем синтез анти-VCA-IgG продолжается весь период сосуществования вируса и макроорганизма (т. е. пожизненно), а анти-VCA-IgM определяются только в течение 1 — 3 мес. Специфические IgG к EA появляются позже и могут обнаруживаться у больных в сроки от нескольких месяцев до года. Наличие этих антител слабо коррелирует с первичной инфекцией, но часто используется как маркер фазы реактивации [8].

Антитела к NA начинают детектироваться в крови инфицированных только через 3—6 мес и сохраняются в течение всей жизни [1, 2].

Как правило, лабораторный диагноз первичной ВЭБ-инфекции не вызывает затруднений и определяется наличием в сыворотке анти-VCA-IgM и анти-VCA-IgG, а также анти-EA-IgG [6] (см. таблицу). Однако известно, что анти-VCA-IgM продуцируются не у всех пациентов с первичной инфекцией, более того, в редких случаях анти-VCA-IgM могут определяться в течение 1 года после инфицирования [5, 6, 8, 12, 14]. Кроме этого у 30% инфицированных может отсутствовать либо прекращаться (например, при иммуносупрессии) синтез маркера пастинфекции — антител к NA [4, 8].

Для дифференциации нетипичных случаев первичной и пастинфекции рекомендуется использовать определение индекса авидности специфических антител к капсидному белку вируса. Авидность антител определяется силой взаимодействия их с антигенным эпитопом вирусного белка и зависит, как правило, от давности инфекции и особенностей иммунной системы человека (скорости соматических мутаций в генах, кодирующих вариабельные участки IgG) [12].

Кроме этого при рассмотрении иммунного статуса новорожденных детей следует учитывать, что он в значительной мере связан с иммунным статусом матери и особенностями течения беременности [3]. У здоровых доношенных детей в крови определяются IgA, IgM, IgG.

Собственными являются антитела классов М и А. Уровень IgM в сыворотке доношенного новорожденного составляет 6—10% от уровня взрослого и к двум годам практически достигает последнего. Синтез собственных IgG в организме новорожденного выражен слабо, а циркулирующие иммуноглобулины этого класса имеют в основном материнское происхождение (трансплацентарный перенос). Сразу после родов уровень IgG у новорожденного составляет около 110% от материнского, однако вскоре вследствие естественного распада снижается, достигая нижней точки в возрасте 3—4 мес [3].

При исследовании иммунного статуса детей в возрасте до 1 года целесообразным является деление их на две группы — до 3 мес и от 4 мес до 1 года.

Целью настоящей работы было изучение закономерности развития иммунного ответа на ВЭБ-инфекцию в зависимости от возраста пациента.

Интерпретация серологических данных

Показатель	Низкоавидные антитела	Анти-VCA-IgG	Анти-VCA-IgM	Анти-EA-IgG	Анти-NA-IgG
Инкубационный период или отсутствие инфицирования	-	-	-	-	-
Первичная инфекция	+	+	+/-	-	-
Острая первичная инфекция (инфекционный мононуклеоз)	+	+	+	+	-
Поздняя первичная инфекция	-	+	+/- ($\leq 0,3$)	+	+/-
Атипичная первичная инфекция	-	+	+	-	-
Хроническая инфекция	-	+	+/-	+	-
Ранняя пастификация (реконвалесценция)	-	+	-	+	+
Поздняя пастификация (латентная инфекция у клинически здоровых людей)	-	+	-	-	+
Реактивация	-	+	+/-	+	+

Материалы и методы

Были исследованы образцы сывороток крови детей в возрасте от 5 дней до 17 лет ($n = 411$), доноров ($n = 503$) и рожениц ($n = 49$). Детский контингент разделили на возрастные группы: 0—3 мес ($n = 102$); 4 мес—1 год ($n = 36$); 1—2 года ($n = 60$); 3—4 года ($n = 51$); 5—9 лет ($n = 68$); 10—13 лет ($n = 38$); 14—17 лет ($n = 56$).

Определяли наличие следующих маркеров ВЭБ инфекции: анти-VCA-IgM, анти-VCA-IgG, анти-EA-IgG, анти-NA-IgG. Сыворотки, содержащие анти-VCA-IgG, были дополнительно исследованы на определение авидности специфических антител. Расчет индекса авидности (ИА) и интерпретация результатов проводились согласно инструкции к тест-системе. В исследовании использованы коммерческие иммуноферментные тест-системы производства ООО «НПО "Диагностические системы"» (Нижний Новгород).

Статистическая обработка данных проведена с помощью ППП статистической обработки данных Statistica 6.0. Для поиска различий показателей использовали критерий Фишера, поиск взаимосвязей проводили с помощью непараметрического критерия корреляции Спирмена.

Результаты и обсуждение

Оценили инфицированность различных групп населения ВЭБ, для чего определяли антитела к капсидному и нуклеарному антигенам, поскольку эти маркеры характеризуются пожизненной персистенцией в организме.

Максимальная доля лиц, положительных на анти-VCA-IgG, выявлена среди доноров, а также подростков старше 14 лет (рис. 1), что является подтверждением известного факта тотального инфицирования ВЭБ взрослого населения [8]. В то же время максимум положительных результатов на анти-NA-IgG отмечен среди детей в возрасте от 1 года до 4 лет. Следовательно, можно сделать вывод, что уже к 3-х летнему возрасту около 98% детей имеют собственные антитела к ВЭБ, т. е. инфицированы этим вирусом.

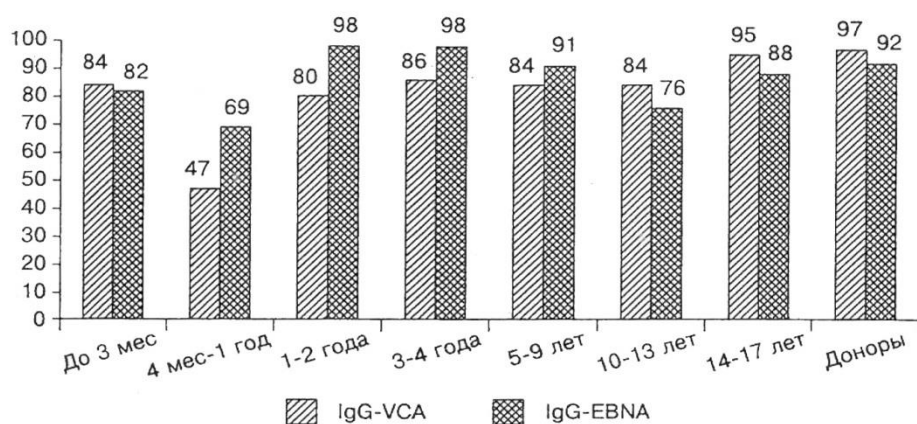


Рис. 1 Сравнение частоты встречаемости IgG-VCA и IgG-NA.

По оси абсцисс: возрастные группы обследуемых и доноры.

У детей в возрасте до 3 мес уровень распространенности обоих маркеров практически не различается ($p > 0,05$) и является отражением материнского иммунитета. Группа детей в возрасте до 9 лет включительно характеризуется преобладанием антител к ядерному антигену, причем максимальная разница отмечена в возрастной группе 4 мес—1 год, что, по-видимому, связано с более медленной элиминацией материнских анти-NA-IgG из организма ребенка.

Причина отсутствия IgG к VCA при наличии IgG к NA описана в литературе [4, 9] и может быть связана с особенностями используемых диагностикумов.

Первое поколение тест-систем по определению антител к VCA разработано на основе белка p23 (компонент VCA-комплекса). Эти диагностикумы способны выявлять самые ранние стадии инфекции, но часто IgG к данному белку, так же как IgG к NA, могут не вырабатываться при иммуносупрессивных состояниях либо вторично утрачиваются при хронической латентной инфекции, что затрудняет диагностику ВЭБ-инфекции.

Второе поколение тест-систем (в том числе производства ООО «НПО "Диагностические системы"») использует в качестве антигена рекомбинантный белок p18 (другой белок VCA-комплекса). Несмотря на то что в некоторых случаях IgG к p18 при ранней первичной инфекции могут отсутствовать (особенно у детей), его использование позволяет дифференцировать случаи хронической латентной инфекции с вторично утраченными антителами к NA и острой первичной инфекции [4].

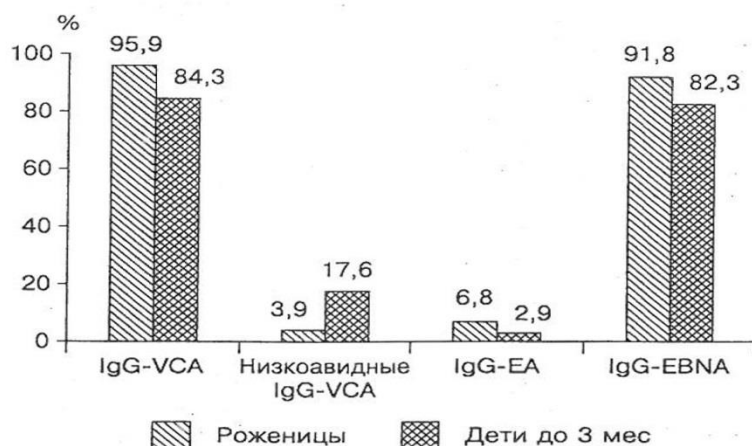


Рис. 2. Сравнение уровня маркеров между роженицами и новорожденными детьми в возрасте до 3 мес.

У детей старше 10 лет более преобладали антитела к капсидному антигену. Аналогичное

соотношение выявлено среди доноров, что можно объяснить отсутствием анти-NA-IgG при хронизации процесса либо при иммуносупрессивных состояниях пациента [8].

Особого внимания заслуживает проблема параллельного изучения иммунного статуса новорожденных и рожениц.

При сравнении антительного профиля детей в возрасте до 3 мес и рожениц получены следующие результаты: анти-VCA-IgG, анти-EA-IgG, анти-NA-IgG детектируются у детей достоверно реже (84,3, 2,9, 82,3%), чем у рожениц (95,9, 6,9, 91,8%; $p < 0,01$, $p < 0,01$, $p < 0,05$ соответственно), а частота встречаемости низкоавидных анти-VCA-IgG у детей достоверно выше (17,6% против 3,9%; $p < 0,05$) (рис. 2). Снижение частоты встречаемости уровня IgG свидетельствует о постепенной элиминации материнских антител из организма ребенка. Однако наличие у многих детей низкоавидных антител, являющихся маркером первичной инфекции, причем достоверно чаще, чем у рожениц, позволяет предположить, что в некоторых случаях IgG могут вырабатываться с рождения ребенка в ответ на инфицирование ВЭБ.

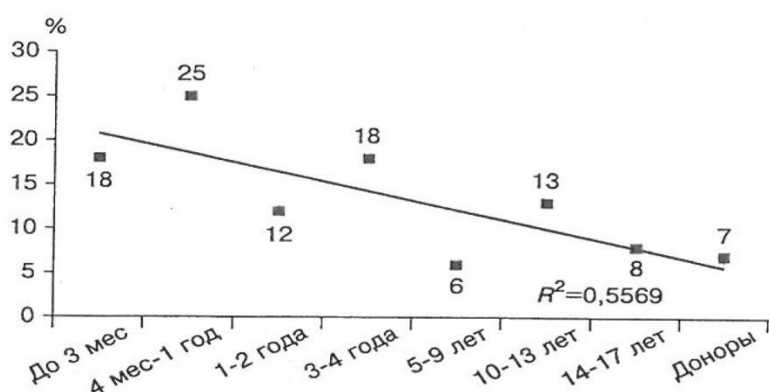


Рис. 3. Распространенность низкоинвазивных IgG-VCA в различных группах.

По оси ординат — частота встречаемости маркера.

Сравнили частоту встречаемости низкоавидных IgG в разных возрастных группах детей, а также среди взрослых доноров (рис. 3). От взрослых доноров по частоте встречаемости низкоавидных анти-VCA-IgG (7%) достоверно отличаются дети в возрасте до 3 мес (17,6%), от 4 мес до 1 года (25%) и дети в возрасте от 3 до 4 лет (17,6%) ($p < 0,01$). Большинство детей Нижнего Новгорода инфицируется ВЭБ в течение первых 4 лет жизни, при этом риск заразиться у детей в возрасте от 1 года до 2 лет относительно ниже, что, возможно, связано с более развитой системой иммунитета, чем у детей до 1 года. Кроме того, по сравнению с более старшими возрастными группами дети 1—2 лет меньше контактируют с посторонними людьми, что снижает вероятность инфицирования. Эти результаты согласуются с данными других авторов о том, что серонегативные дети чаще воспитываются дома, чем серопозитивные, а в 3-летнем возрасте большинство детей начинают посещать дошкольные учреждения [7, 10].

Также можно выделить еще один пик первичной ВЭБ-инфекции у детей пубертатного возраста. Отмечено более чем 2-кратное увеличение частоты встречаемости низкоавидных антител у подростков в возрасте 10—13 лет по сравнению с предыдущей возрастной группой (5—9 лет) и донорами — 13,2, 5,9 и 7% соответственно. Однако следует признать, что в обоих случаях разница показателей статистически недостоверна ($p > 0,05$).

Учитывая, что наличие низкоавидных анти-VCA-IgG является маркером первичной ВЭБ-инфекции, можно сделать вывод о снижении ее частоты с возрастом, что подтверждается данными других авторов [10, 14].

Не было выявлено значимой связи между частотой встречаемости анти-VCA-IgM и частотой первичного инфицирования ВЭБ во всех возрастных группах, т. е. подтверждены данные, что анти-VCA-IgM не являются достоверным маркером первичной инфекции [8, 12].

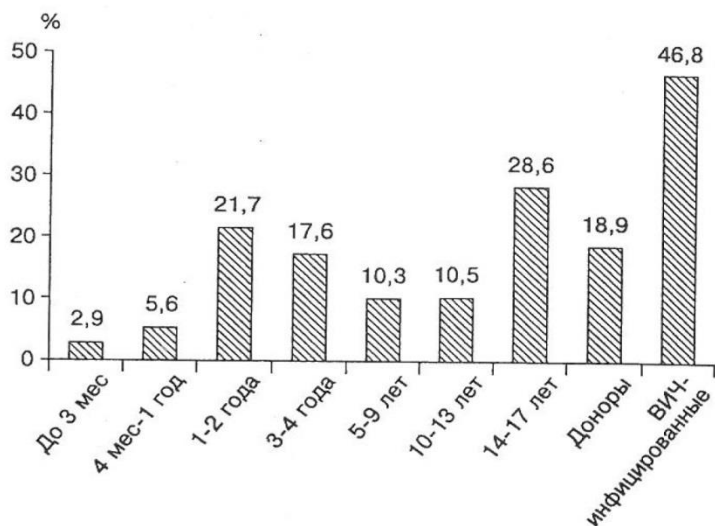


Рис. 4. Частота встречаемости IgG-EA в разных группах.

В группе детей в возрасте до 3 мес достоверно чаще по сравнению с другими группами ($p < 0,05$), а также с группой рожениц ($p < 0,01$) встречались неинтерпретируемые значения ИА, так называемая серая зона. У детей с первых дней жизни может идти образование собственных IgG, и достоверно более высокий уровень "промежуточной авидности" объясняется одновременным присутствием в организме младенца высокоавидных материнских анти-VCA-IgG и низкоавидных собственных. Следовательно, при диагностике ВЭБ-инфекции у новорожденных необходимо знать серологический статус матери, а также наблюдать за изменением серологического статуса ребенка в динамике.

Наличие анти-EA-IgG может являться маркером хронической инфекции, ранней пастификации (реконвалесценции) либо реактивации вируса [8]. При этом учитывая, что у некоторых пациентов анти-VCA-IgM не вырабатываются, реконвалесценция и реактивация будут иметь одинаковый серологический профиль (см. таблицу). Это позволяет утверждать, что присутствие в организме анти-EA-IgG является маркером активной ВЭБ-инфекции.

Выявлено, что у подростков в возрасте 14—17 лет анти-EA-IgG встречается достоверно чаще (рис. 4), чем у детей в возрасте до 1 года ($p < 0,01$), и у детей в возрасте 5—13 лет ($p < 0,05$). У детей от 1 года до 2 лет частота встречаемости анти-EA-IgG также достоверно выше, чем у детей в возрасте до 1 года ($p < 0,01$) и 5—9 лет ($p < 0,05$), у детей от 3 до 4 лет — достоверно чаще, чем у детей до 1 года ($p < 0,05$).

Результаты показывают, что первый "пик" уровня анти-EA-IgG наблюдается у детей в возрасте от 1 года до 2 лет. Учитывая динамику образования антител при ВЭБ-инфекции, можно предположить, что "пик" анти-EA-IgG в возрасте от 1 года до 2 лет может быть связан с первичным инфицированием в течение первого года жизни. Следующий "пик" встречаемости анти-EA-IgG приходится на 14—17 лет. В этом случае он может быть связан как с первичным инфицированием, так и с реактивацией латентной инфекции, характерными для пубертатного периода, поскольку в этом возрасте происходят гормональные изменения в организме, которые могут сопровождаться снижением функции иммунной системы и как следствие реактивацией возбудителей латентных инфекций, в том числе ВЭБ.

Изучали частоту встречаемости антител к ядерному антигену ВЭБ в разных тестируемых группах (см. рис. 1). Хотя по данным некоторых авторов [7] частота встречаемости этого маркера увеличивается с возрастом, в настоящем исследовании такой зависимости не выявлено. Значения данного показателя варьировали от 69% в группе детей от 4 мес до 1 года до 98,3% в возрастной группе 1—2 года. Следующие периоды жизни характеризуются незначительными колебаниями частоты встречаемости анализируемого маркера.

Выводы

Результаты настоящего исследования показали, что к трем годам жизни уровень инфицированности ВЭБ достоверно не отличается от уровня взрослых доноров и составляет более 95%. При этом около 40% детей инфицируется в течение первого года жизни. Также имеет место тенденция к увеличению частоты первичного инфицирования у детей пубертатного возраста. IgG-ЕА как маркер активной ВЭБ-инфекции либо ее реактивации наиболее характерен для детей 14—17, 1—2 лет. Анти-VCA-IgM не являются достоверным маркером первичной инфекции.

Для достоверной диагностики стадии ВЭБ-инфекции недостаточно определение какого-либо одного маркера, необходимо комплексное определение серологического профиля.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вирус Эпштейна—Барр и серодиагностика связанных с ним заболеваний // Информ. бюл. "Новости Вектор-Бест". — 2000. - № 4 (18). - С. 1-5.
2. Заболоцкая С. Г., Шевченко Н. М., Ольховский И. А. Лабораторная диагностика инфекции, вызванной вирусом Эпштейна-Барр // Бюл. лаб. службы. — 2002. — № 10. — С. 10-15.
3. Матвиенко Н. А. Внутритрубная инфекция и иммунитет. <http://www.gabr.org/article/article30.htm>
4. Bauer G. Simplicity through complexity: Immunoblot with recombinant antigen as the new gold standard in Epstein—Barr virus serology // Clin. Lab. - 2001. — Vol. 5-6. - P. 223-230.
5. Chan K. H., Luo R. X., Cen H. L. et al. Development and evaluation of an Epstein—Barr virus (EBV) immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assay based on the 18-Kilodalton matrix protein for diagnosis of primary EBV infection // J. Clin. Microbiol. - 1998. - Vol. 36, N 11. - P. 3359-3361.
6. Chan K. H., Ng M. N., Seto W. H., Peiris J. S. Epstein—Barr virus (EBV) DNA in sera of patient with primary EBV infection // J. Clin. Microbiol. — 2001. — Vol. 39, N 11. — P. 4152—4254.
7. Figueira-Sitva C. M., Pereira F. E. L. Prevalence of Epstein—Barr virus antibodies in healthy children and adolescent in Vitoria, state of Espirito Santo, Brazil // Rev. Soc. Brasileira Med. Trop. — 2004. - Vol. 37, N 5. - P. 409—412.
8. Hess D. R. Routine Epstein—Barr diagnostics from the laboratory perspective: still challenging after 35 years // J. Clin. Microbiol. - 2004. - Vol. 42, N 8. - P. 3381-3387.
9. Myrhr K. M., Riise T., Barret-Connor E. et al. Altered antibody pattern to Epstein—Barr virus but not to other herpesviruses in multiple sclerosis: a population-based case-control study from western Norway // J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. — 1998. - Vol. 64. - P. 539-542.
10. Pancharoen C., Mekmullica J., Chinratanapisit S. et al. Seroprevalence of Epstein—Barr virus antibody among children in various age groups in Bangkok, Thailand // Asian Pac. J. Allergy Immunol. - 2001. - Vol. 19, N 2. - P. 135-137.
11. Pariente M., Bartolome J., Lorente S. Age distribution of serological profiles of Epstein—Barr virus infection: review of results from a diagnostic laboratory // Enferm. Infect. Microbiol. Clin. 2007. - Vol. 25, N 2. - P. 108-110.
12. Robertson P., Beynon S., Whybin R. et al. Measurement of EBV- IgG anti-VCA avidity aids the early and reliable diagnosis of primary EBV infection. — 2003. — Vol. 70, N 4. — P. 617—623.
13. Schaade L., Kleines M., Hausler M. Application of virus-specific immunoglobulin M (IgM), IgG, and IgA antibody detection with a polyantigenic enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Epstein—Barr virus infections in childhood // J. Clin. Microbiol. - 2001. - Vol. 39, N 11. - P. 3902-3905.
14. Votava M., Bartosova D., Krchnakova A. et al. Diagnostic importance of heterophile antibodies and immunoglobulins IgA, IgE, IgM and low-avidity IgG against Epstein—Barr virus capsid antigen in children // Acta Virol. — 1996. — Vol. 40. — P. 99—101.