

Значение лабораторной диагностики герпетического кератита

Сакович В. Н.

ГУ «Днепропетровская медицинская академия Министерства здравоохранения Украины»

Приведены данные по изучению информативности ДНК-анализа слезы методом ПЦР при разных типах герпетического кератита. Пациенты с герпетическим кератитом были разделены на 3 группы: 1. Эпителиальный кератит (древовидный и географический) – 40 пациентов; 2. Стромальный кератит – 36 пациентов; 3. Эндотелиит – 10 пациентов. Помимо общепринятых офтальмологических обследований, всем пациентам до начала лечения проводился анализ слезы методом ПЦР на наличие ДНК ВПГ 1 и 2 типа. Во всех 40 случаях эпителиального кератита в слезе определялась ДНК ВПГ тип 1 (100 %). В 16 случаях стромального кератита так же определялся ВПГ тип 1 (44,4 %). ВПГ не определялся в случаях эндотелиита. Ни в одном из случаев не определялся ВПГ тип 2. Наблюдалась хорошая корреляция типичной клинической картины герпетического кератита с выявлением вирусной ДНК, что говорит о репродукции вируса.

Ключевые слова: герпетический кератит, вирус простого герпеса 1 и 2 тип, лабораторная диагностика, полимеразная цепная реакция.

Актуальность. Вирусом простого герпеса (ВПГ) инфицирована большая часть мировой популяции. Эта инфекция часто протекает не типично. Глазная форма инфицирования ВПГ приводит к сложной патологии со значительным повреждением роговицы и является лидирующей причиной слепоты в развитых странах. Во всем мире каждый год возникает приблизительно 1,5 млн. случаев герпетического кератита, включая 40 тыс. новых случаев значительного снижения зрения или слепоты [3]. Клиническая картина герпетических заболеваний глаз проявляется разнообразно:

- древовидный кератит;
- персистирующая эпителиальная эрозия;
- глубокие формы кератита;
- эндотелиит, –

что создает трудности при постановке диагноза [4, 5].

ВПГ тип 1 и 2 распространены повсеместно; заражение осуществляется при прямом контакте с вирус-инфицированным секретом. Инфицирование ВПГ-1 увеличивается с возрастом: более 90 % взрослых пациентов во всем мире серопозитивны к ВПГ. Частота определения антител к ВПГ-2 зависит от пола, возраста и факторов риска [2]. В прошлом существовало мнение об избирательном поражении ВПГ-1 исключительно области лица, а ВПГ-2 – наружных половых органов, что находило свое подтверждение при серологическом обследовании больных. Имеющиеся сегодня данные не совпадают с этим мнением, свидетельствуя об общем для обоих типов вируса тропизмом [1].

ВПГ тип 1 вызывает поражение преимущественно верхней половины тела, иннервируемой тройничным нервом, в то время как ВПГ тип 2 – нижней половины. Последние сообщения свидетельствуют о том, что оба типа могут инфицировать обе части тела, вызывая одинаковые симптомы, а так же микст-инфекции [10].

Патологические изменения роговицы при офтальмогерпесе могут рецидивировать в течение всей жизни и часто приводят к прогрессирующему роговичному рубцеванию со снижением зрения. Поражения роговицы ВПГ – «хамелеон» протекают с различными типами проявлений, не всегда типичными [14, 15]. Подтверждение герпетической природы инфекции базируется на клинической картине, подкрепленной лабораторными тестами.

Существует несколько методов лабораторной диагностики ВПГ:

- серологические исследования;
- выделение и культивирование возбудителя на культурах клеток;
- ПЦР (полимеразная цепная реакция) диагностика;
- биологическая проба.

ПЦР диагностика – наиболее дорогостоящий, но и наиболее быстрый, точный и надежный метод определения вирусной ДНК при герпетическом кератите благодаря высокой специфичности и чувствительности; при поверхностном герпетическом кератите позволяет проводить очень точный мониторинг эффективности лечения [6, 8, 9]. Типичная клиническая картина

кератита хорошо коррелирует с положительным результатом ПЦР, особенно при эпителиальных дефектах или древовидном кератите [11]:

- при эпителиальных кератитах ДНК ВПГ определяется во всех случаях;
- при атипичном кератите положительный результат ПЦР определяется в 50 % случаев;
- при активном стромальном дисциформном кератите – определяется в 50 % случаев;
- в случае «тихого» стромального кератита или эндотелиита – не определяется.

При заражении ВПГ наблюдается последовательный синтез *IgM*, *IgG*, *IgA*; их основное действие направлено на блокировку возбудителя за счет образования иммунных комплексов «Антиген–Антитело». В результате снижается его патогенетическое действия на клетки эпителия и организм в целом. Механизм действия антител направлен на ВПГ и инфицированные им клетки, на предупреждения распространения инфекции через межклеточные пространства, угнетение размножения возбудителя в очаге его проникновения, но гуморальные механизмы не могут полностью предупредить активацию латентного ВПГ. При рецидивах наблюдается такая же последовательность образования иммуноглобулинов, как и при первичном инфицировании, что ведет к повышению их уровня во время обострений [13]. В случаях субклинической или нераспознаваемой герпетической инфекции, серологическое определение иммуноглобулинов класса *G* может оказаться полезным [2]. При серологических исследованиях возможны ложноположительные результаты [1, 12, 13].

Выделение и культивирование возбудителя на культурах клеток обеспечивает возможность непосредственного наблюдения и анализа распространения ВПГ у лабораторных животных и в эмбриональных тканях человека. Биологическая проба ставится для воспроизведения герпетического кератита у подопытных животных [1, 7].

Цель исследования – изучение особенностей лабораторной диагностики методом ПЦР у пациентов с разными типами герпетического кератита.

Материалы и методы. Под нашим наблюдением находилось 86 пациентов (51 мужчина и 35 женщин в возрасте от 21 до 75 лет) с предположительно герпетическим кератитом, по данным объективного осмотра. Пациенты были разделены, в соответствии с последней классификацией исследовательской группы инфекционных герпетических кератитов (Herpetic keratitis Infection Research Group, Davison *et al.*, 2005), на 3 группы:

- эпителиальный кератит (древовидный и географический) – 40 пациентов;
- стромальный кератит – 36 пациентов;
- эндотелиит – 10 пациентов.

Помимо общепринятых офтальмологических обследований, всем пациентам до начала лечения проводился анализ слезы методом ПЦР на наличие ДНК ВПГ 1 и 2 типа. Забор слезы для исследования производился микропипеткой из конъюнктивального мешка, непосредственно в лаборатории. Проведение реакции требует в среднем 3 часа.

Результаты и их обсуждения. Во всех 40 случаях древовидного и географического кератита в слезе определялась ДНК ВПГ тип 1. В 16 случаях стромального кератита так же определялся ВПГ тип 1. ВПГ не определялся в случаях эндотелиита. Ни в одном из случаев не определялся ВПГ тип 2. Наблюдалась хорошая корреляция типичной клинической картины герпетического кератита (эрозивное и изъязвленное поверхностное эпителиа) с выявлением вирусной ДНК, что говорит о репродукции вируса. Результаты исследования слезы пациентов методом ПЦР приведены в табл. 1.

Таблица 1 - Результаты исследования слезы пациентов методом ПЦР

№№ групп	Группы пациентов	Количество пациентов в группе	Положительный результат ПЦР к ВПГ
1	Эпителиальный кератит (древовидный и географический)	40	40 пациентов «+» ВПГ 1 тип – 100 %
2	Стромальный кератит	36	16 пациентов «+» ВПГ 1 тип – 44,4 %
3	Эндотелиит	10	ДНК ВПГ 1 и 2 типа не определялась

Выводы

1. ДНК-диагностика является быстрым и надежным методом определения этиологической причины заболевания у пациентов с поверхностными формами кератита (в 100 % случаев) и некоторыми формами стромального кератита (в 44,4 % случаев). Проведение ПЦР-диагностики необходимо для постановки диагноза и определения лечебной тактики.

2. Несмотря на самую высокую чувствительность и специфичность ПЦР, не во всех случаях герпетического кератита возможно определение ДНК ВПГ в слезе, поэтому мы считаем целесообразным так же определять иммуноглобулины А, М, G к ВПГ в крови пациентов с предполагаемым герпетическим кератитом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Самгин М. А. Простой герпес: дерматологические аспекты / М. А. Самгин, А. А. Халдин. – М.: МЕДпресс-информ, 2002. – 160 с.
2. Binnicker M. J. Evaluation of Three Multiplex Flow Immunoassays Compared to an Enzyme Immunoassay for the Detection and Differentiation of IgG Class Antibodies to Herpes Simplex Virus Types 1 and 2 / M. J. Binnicker, D. J. Jespersen, J. A. Harring // *Clinical & Vaccine Immunology*. - 2010. – Vol. 17, No 2. – P. 253–257.
3. Farooq A. V. Herpes simplex epithelial and stromal keratitis: an epidemiologic update / A.V. Farooq, D. Shukla // *Survey of ophthalmology*. – 2012. – Vol. 57, No 5. – P. 448-462.
4. Presence of a large amount of herpes simplex virus genome in tear fluid of herpetic stromal keratitis and persistent epithelial defect patients / M. Fukuda, T. Deai, S. Higaki *et al.* // *Seminars in Ophthalmology*. – 2008. – Vol. 23, No 4. – P. 217-220.
5. Quantitative analysis of herpes simplex virus genome in tears from patients with herpetic keratitis / M. Fukuda, T. Deai, T. Hibino *et al.* // *Cornea*. – 2003. – Vol. 22. – Suppl 7. – S. 55-60.
6. Gitman M. R. Comparison of Simplexa™ HSV 1 & 2 Direct PCR with Culture, Immunofluorescence and Laboratory Developed TaqMan PCR for Detection of Herpes Simplex Virus in Swab Specimens / M. R. Gitman, D. Ferguson, M. L. Landry // *Journal of clinical microbiology*. – 2013. – Vol. 4 [E-pub. ahead of print].
7. Reciprocal transmission of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) between corneal epithelium and trigeminal neurites in an embryonic chick organ culture / W. Hafezi, B. R. Eing, E. U. Lorentzen *et al.* // *FASEB Journal: Federation of American Societies for Experimental Biology*. – 2002. – Vol. 16, No 8. – P. 878-880.
8. Applying the DNA diagnostics in patients with superficial keratitis of viral origin/ Z. Hlinomazová Z., O. Serý, M. Horácková *et al.* // *Cesk. Slov. Oftalmol.* – 2008. – Vol. 64, No 2. – P. 47-51.
9. The treatment of HSV1 ocular infections using quantitative real-time PCR results / Z. Hlinomazová, V. Loukotová, M. Horácková, O. Šerý // *Acta Ophthalmologica*. . – 2012. – Vol. 90, No 5. – P. 456-460.
10. Evaluation of mixed infection cases with both herpes simplex virus types 1 and 2 / H. Kaneko, T. Kawana, K. Ishioka *et al.* // *Journal of medical virology*. – 2008. – Vol. 80, No 5. – P. 883-887.
11. Molecular detection of herpes simplex virus by polymerase chain reaction in patients with typical and atypical herpetic keratitis / A. Kamimura, M. I. Takata, A. C. Fernandes *et al.* // *Arquivos brasileiros de oftalmologia*. – 2008. – Vol. 71, No 6. – P. 827-830.
12. Does asymptomatic shedding of herpes simplex virus on the ocular surface lead to false-positive diagnostic PCR results? / J. F. Leigh, N. Acharya, V. Cevallos, T. P. Margolis // *British Journal of Ophthalmology*. – 2008. – Vol. 92, No 3. – P. 435-436.
13. Use of “biokit HSV-2 Rapid Assay” to improve the positive predictive value of Focus Herpes-Select HSV-2 ELISA / R. A. Morrow, D. Friedrich, A. Meier, L. Corey // *BMC Infectious Diseases*. – 2007. – Vol. 14. – P. 5-84.
14. Herpes keratitis / A. M. Rowe, A. J. St Leger, S. Jeon S. *et al.* // *Progress in retinal & eye research*. – 2013. – Vol. 32. – P. 88-101.
15. Seitz B. “Herpetic keratitis”. Various expressions require different therapeutic approaches/ B. Seitz, A. Heiligenhaus // *Ophthalmologie*. – 2011. – Vol. 108, No 4. – P. 385-395.
16. Oligonucleotide and polymer functionalized nanoparticles for amplification-free detection of DNA / D. A. Thomson, E. H. Tee, N. T. Tran *et al.* // *Biomacromolecules*. Institute for Molecular Bioscience, University of Queensland, Brisbane, Australia. – 2012. – Vol. 11; 13 (6). – P. 1981-1989.

ЗНАЧЕННЯ ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ ГЕРПЕТИЧНОГО КЕРАТИТУ

Сакович В. М.

ДЗ «Дніпропетровська медична академія Міністерства охорони здоров'я України»

Наведено дані щодо вивчення інформативності ДНК-аналізу сльози методом ПЛР при різних типах герпетичного кератиту. Пацієнти з герпетичним кератитом були поділені на 3 групи: 1. Епітеліальний кератит (деревоподібний і географічний) – 40 пацієнтів; 2. Стромальний кератит – 36 пацієнтів; 3. Ендотеліт – 10 пацієнтів. Окрім загальноприйнятих офтальмологічних обстежень, усім пацієнтам до початку лікування проводився аналіз сльози методом ПЛР на наявність ДНК ВПГ 1 і 2 типу. В усіх 40 випадках епітеліального кератиту в сльозі визначалася ДНК ВПГ тип 1 (100 %). У 16 випадках стромального кератиту також визначався ВПГ тип 1 (44,4 %). ВПГ не визначався у випадках ендотеліїту. У жодному випадку не визначався ВПГ тип 2. Спостерігалася добра кореляція типової клінічної картини герпетичного кератиту з виявленням вірусної ДНК, що говорить про репродукцію вірусу.

Ключові слова: герпетичний кератит, вірус простого герпесу 1 і 2 тип, лабораторна діагностика, полімеразна ланцюгова реакція.

IMPORTANCE OF LABORATORY DIAGNOSTICS OF HERPETIC KERATITIS

Sakovych V. M.

“Dnipropetrovsk Medical Academy of Health Ministry of Ukraine” SE

The data on the study of self-descriptiveness of DNK-analysis of tear by the polymerase chain reaction at different types of herpetic keratitis have been presented. Patients with herpetic keratitis were divided into 3 groups: 1. Epithelial keratitis – 40 patients; 2. Stromal keratitis – 36 patients; 3. Endothelitis – 10 patients. Before treatment in addition to the common eye examination tears of all patients were investigated by polymerase chain reaction to detect herpes simplex virus (HVS) type 1 & 2. All 40 patients with epithelial keratitis were HVS type 1 positive. 16 patients with stromal keratitis were also HVS type 1 positive. Virus herpes was not detected in cases of endothelitis. HVS type 2 did not determine at all. There was a good correlation of typical clinical picture and detection of HVS.

Keywords: herpetic keratitis, herpes simplex virus type 1 & 2, laboratory diagnostics, polymerase chain reaction

Сакович Василий Никитович – доктор медицинских наук, профессор кафедры неврологии и офтальмологии ГУ «Днепропетровская медицинская академия Министерства здравоохранения Украины». s.v.n.doctor@gmail.com