

УДК 617.713-002:616.523-07

## **Значение лабораторной диагностики герпетического кератита.**

Сакович В.Н.

ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины».

**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 миллиона случаев герпетического кератита, включая 40 000 новых случаев значительного снижения зрения или слепоты [1]. Клиническая картина герпетических заболеваний глаз проявляется разнообразно: древовидный кератит, персистирующая эпителиальная эрозия, глубокие формы кератита, эндотелиит, что создает трудности при постановке диагноза [2,3]. 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 [4]. 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 ним, свидетельствуя об общем для обоих типов вируса тропизмом [5]. 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 [6]. 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 [7,8]. Подтверждение герпетической природы инфекции базируется на клинической картине, подкрепленной лабораторными тестами.

Существует несколько методов лабораторной диагностики ВПГ: 1) Серологические исследования; 2) Выделение и культивирование возбудителя на культурах клеток; 3) ПЦР диагностика; 4) Биологическая проба.

ПЦР диагностика – наиболее дорогостоящий метод, но 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 [12, 13, 14]. Типичная клиническая картина кератита хорошо коррелирует с положительным результатом ПЦР, особенно при эпителиальных дефектах или древовидном кератите. При эпителиальных кератитах ДНК ВПГ определяется во всех случаях. В 50 % случаев атипичного кератита определяется положительный результат ПЦР [15]. При активном стромальном дисциформном кератите – в половине случаев, и не определяется в случае «тихого» стромального кератита или эндотелиита.

При заражении ВПГ наблюдается последовательный синтез Ig M, G, A. 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, 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 [10]. В случаях субклинической или нераспознаваемой герпетической инфекции, серологическое определение иммуноглобулинов класса G может оказаться полезным [16]. При серологических исследованиях возможны ложноположительные результаты [5,9,10].

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 [5,17].

**Целью** нашего исследования являлось изучение особенностей лабораторной диагностики методом ПЦР у пациентов с разными типами герпетического кератита.

**Материалы и методы.** Под нашим наблюдением находилось 86 пациентов с предположительно герпетическим кератитом, по данным объективного осмотра. Из них мужчин было 51, женщин 35. Возраст пациентов от 21 до 75 лет. 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: 1. Эпителиальный кератит (древовидный и географический) – 40 человек; 2. Стромальный кератит – 36 человек; 3. Эндотелиит – 10 человек. 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 конъюнктивного 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 (таб.). 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.

Таблица

3 группы пациентов	Количество пациентов в группе	Положительный результат ПЦР к ВПГ
1. Эпителиальный кератит (древовидный и географический)	40 человек	40 пациентов «+» ВПГ 1 тип- 100 %
2. Стромальный кератит	36 человек	16 пациентов «+» ВПГ 1 тип- 44,4 %
3. Эндотелиит	10 человек	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.

## Список литературы.

1. Farooq AV. Herpes simplex epithelial and stromal keratitis: an epidemiologic update /Farooq AV, Shukla D// Survey of ophthalmology – 2012 Sep;57(5):448-62.
2. Fukuda M. Presence of a large amount of herpes simplex virus genome in tear fluid of herpetic stromal keratitis and persistent epithelial defect patients./Fukuda M, Deai T, Higaki S, Hayashi K, Shimomura Y// Seminars in Ophthalmology 2008 Jul-Aug;23(4):217-20.
3. Fukuda M. Quantitative analysis of herpes simplex virus genome in tears from patients with herpetic keratitis/ Fukuda M, Deai T, Hibino T, Higaki S, Hayashi K, Shimomura Y// Cornea 2003 Oct; 22(7 Suppl):S55-60.
4. Binnicker MJ. 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/Clinical & Vaccine Immunology/Binnicker MJ, Jespersen DJ, Harring JA// 2010 February; 17(2): 253–7.
5. Samgin M.A., Haldin A. A. Herpes Simplex (dermatology aspects).–M.: MEDpressinform, 2002.
6. Kaneko H. Evaluation of mixed infection cases with both herpes simplex virus types 1 and 2/Kaneko H, Kawana T, Ishioka K, Ohno S, Aoki K, Suzutani T //Journal of medical virology, 2008 May;80(5):883-7.
7. Rowe AM. Herpes keratitis /Rowe AM, St Leger AJ, Jeon S, Dhaliwal DK, Knickerlbein JE, Hendriks RL// Progress in retinal & eye research. 2013, Jan; 32:88-101.
8. Seitz B. "Herpetic keratitis". Various expressions require different therapeutic approaches/ Seitz B, Heiligenhaus A// Ophthalmologie. 2011 Apr; 108(4):385-95; quiz 396-7. Klinik für Augenheilkunde und Hochschulambulanz, Universitätsklinikum des Saarlandes UKS, Kirrbergerstr.
9. Leigh JF. Does asymptomatic shedding of herpes simplex virus on the ocular surface lead to false-positive diagnostic PCR results?/ Leigh JF, Acharya N, Cevallos V, Margolis TP//British Journal of Ophthalmology. 2008 Mar;92(3):435-6.
10. Rhoda Ashley Morrow. Use of "biokit HSV-2 Rapid Assay" to improve the positive predictive value of Focus HerpeSelect HSV-2 ELISA / Rhoda Ashley Morrow, David Friedrich, Amalia Meier, Lawrence Corey//BMC Infectious Diseases. 2007 October 14; 5:84.

11. Thomson DA. Oligonucleotide and polymer functionalized nanoparticles for amplification-free detection of DNA /Thomson DA, Tee EH, Tran NT, Monteiro MJ, Cooper MA // *Biomacromolecules*. Institute for Molecular Bioscience, University of Queensland, Brisbane, Australia. 2012 Jun 11; 13(6):1981-9.
12. Hlinomazová Z . Applying the DNA diagnostics in patients with superficial keratitis of viral origin/ Hlinomazová Z, Serý O, Horácková M, Pitelová R, Loukotová V, Vlková E//*Cesk Slov Oftalmol*. 2008 Mar; 64(2):47-51.
13. Hlinomazová Z. The treatment of HSV1 ocular infections using quantitative real-time PCR results/ Hlinomazová Z, Loukotová V, Horácková M, Šerý O// *Acta Ophthalmologica*. 2012 Aug; 90(5):456-60.
14. Gitman MR. 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/Gitman MR, Ferguson D, Landry ML // *Journal of clinical microbiology*. 2013 Sep 4. [Epub ahead of print].
15. Kamimura A. Molecular detection of herpes simplex virus by polymerase chain reaction in patients with typical and atypical herpetic keratitis/ Kamimura A, Takata MI, Fernandes AC, Neves JP, Viegas MT, Murata VY, Nogueira ML, Almeida Junior GC//*Arquivos brasileiros de oftalmologia*. 2008 Nov - Dec ; 71(6):827-30.
16. M. J. Binnicker. 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, and J. A. Harring// *Clinical and vaccine Immunology*. 2010 February; ;17(2):253-7.
17. Hafezi W. Reciprocal transmission of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) between corneal epithelium and trigeminal neurites in an embryonic chick organ culture/Hafezi W, Eing BR, Lorentzen EU, Thanos S, Kühn JE// *FASEB Journal: Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2002 Jun; 16(8):878-80.

## Резюме

**Значение лабораторной диагностики герпетического кератита.**

Сакович В.Н.

В работе 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 человек; 2. Стромальный кератит – 36 человек; 3. Эндотелиит – 10 человек. 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.

## Резюме

**Значення лабораторної діагностики герпетичного кератиту**

Сакович В.М.

У роботі наведені 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 осіб ; 2. Стромальний кератит - 36 осіб ; 3. Ендотеліт – 10 осіб. 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 тож визначався ВПГ тип 1 (44,4 %). ВПГ не визначався в випадках ендотеліту. В жодному випадку не визначався ВПГ тип 2. Спостерігалася гарна 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.

summary

### **Importance of laboratory diagnostics of herpetic keratitis.**

Sakovych V.N.

State Institution “Dnipropetrovsk Medical Academy”

**Introduction.** The most part of human population is infected by virus herpes simplex. This infection is often symptom-free, but ophthalmological form of disease leads to complicated pathology with serious corneal damage. Virus herpes simplex is in the lead cause of blindness in developed countries. There are several types of laboratory diagnostics: 1. Polymerase chain reaction; 2. Serological investigations; 3. Cultural method; 4. Bioassay. Polymerase chain reaction is the gold standart of clinical diagnostics, is very reliable in the cases of superficial forms of keratitis, but only in half cases helps to detect virus in material. Serological investigations may be useful to. Cultural method and bioassay are the rare types of diagnostics for modeling disease in laboratory animals.

**Objective.** The goal was to study peculiarities of laboratory diagnostics of herpetic keratitis by polymerase chain reaction in different types of herpetic keratitis.

**Materials and methods.** Due to last classification of Herpetic keratitis Infection Research Group (Davison et al., 2005) 86 patients were divided into 3 groups: 1. Epithelial keratitis–40 patients; 2. Stromal keratitis–36 patients; 3. Endothelitis–10 patients. Before treatment tears of all patients were investigated by polymerase chain reaction to detect herpes simplex virus type 1 & 2 (HVS).

**Results and discussion.** All 40 patients with epithelial keratitis were herpes simplex virus type 1 positive. 16 patients with stromal keratitis were also herpes simplex virus type 1 positive. Virus herpes was not detected in cases of endothelitis. Herpes simplex virus type 2 did not determine at all. There was a good correlation of typical clinical picture and detection of herpes simplex virus.

**Conclusions.** 1. PCR-diagnostics is commercial accessible, fast and reliable method in the cases of epithelial keratitis and some cases of stromal keratitis. It is important not only for treatment strategy but also for accurate monitoring.

2. In cases of stromal keratitis when epithelium is not damaged it is ideally to add serological methods, because probability of HVS detection is smaller. We consider that investigation of Ig A, M, G may be useful.

**Key words:** herpetic keratitis, herpes simplex virus type 1 & 2, laboratory diagnostics, polymerase chain reaction.

Сакович Василий Никитович, д.м.н., профессор кафедры неврологии и офтальмологии.

Г. Днепропетровск, ул. Боженко 1-б , 49050

т. 050-591-41-54 , E-mail: s.v.n.doctor@gmail.com

