

УДК 616.61-089.843-022.6:57.083.3

АНАЛИЗ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА НА ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНУЮ ИНФЕКЦИЮ У БОЛЬНЫХ С АЛЛОТРАНСПЛАНТАТАМИ ПОЧКИ

О.Е. Потехин, А.М. Ведяков, И.С. Апарин

Научно-исследовательский институт трансплантологии и искусственных органов Минздрава РФ, г. Москва

В работе исследован гуморальный иммунный ответ на цитомегаловирус (ЦМВ) у пациентов, перенесших аллотрансплантацию почки. Установлено наличие ДНК вируса у 68,2% пациентов. У всех пациентов обнаружены IgG-антитела к ЦМВ. 36,4% и 25% пациентов имели IgM-антитела к ЦМВ и IgG-антитела к предраннему неструктурному белку ЦМВ, соответственно. 75% пациентов, имевших IgM-антитела и 90,9% пациентов с IgG-антителами к неструктурному белку ЦМВ, имели ДНК ЦМВ в крови. Осуществлен мониторинг антител IgG-класса к основному неструктурному предраннему белку ЦМВ, общих антител ЦМВ-специфических антител IgG класса, ЦМВ-специфических антител IgM класса и ДНК ЦМВ на протяжении 2 месяцев после операции. Установлены варианты в динамике гуморального иммунного ответа у пациентов, перенесших пересадку почки.

Ключевые слова: цитомегаловирус, полимеразная цепная реакция, предранний неструктурный белок, IgG-антитела, IgM-антитела, аллотрансплантация почки.

THE HUMORAL IMMUNE RESPONSE TO CYTOMEGALOVIRUS INFECTION IN RENAL TRANSPLANT RECIPIENTS.

O.E. Potekhin, A.M. Vedjakov, I.S. Aparin

Institute of Transplantology and Artificial Bodies, Moscow, Russia.

CMV-IgM-ELA-test, CMV-IgG-ELA-test (Medac), CMV-control-test (D. Masaj and Co) and PCR was used for detection of specific anti-CMV IgM, IgG, specific anti-CMV-nonstructural protein IgG and CMV DNA respectively. Peripheral blood samples (N=44) from 14 kidney transplant patients were investigated during 4 months after transplantation. All samples were positive by specific anti-CMV IgG, 30 (68.2%) were positive by PCR, 16(36.4%) - by specific anti-CMV IgM detection, and 11 (25%) - by specific anti-CMV-nonstructural protein IgG. 12(75%) CMV-IgM-ELA-test positive samples and 10 (90.9%) anti-CMV-nonstructural protein IgG positive samples were positive by RCR. Only 3 samples positive by specific anti-CMV-nonstructural protein IgG were also positive by anti-CMV IgM. Our data suggest different variants humoral immune response to cytomegalovirus infection in renal transplant patients. Combination of modern diagnostic techniques is useful for diagnosis and monitoring of CMV infection after kidney transplantation.

Key words: cytomegalovirus, polymerase chain reaction, early nonstructural protein, IgG-antibodies, IgM-antibodies, kidney transplantation.

Цитомегаловирусная инфекция (ЦМВИ) остается одной из причин заболеваемости и смертности в посттрансплантационном периоде. Она встречается у 44% - 85% больных после пересадки органов и костного мозга.

Диагностика ЦМВ-инфекции обеспечивается в основном серологическими методами. Преобладают диагностикумы, выявляющие общие антитела класса IgG и IgM к цитомегаловирусным белкам. Однако, их использование в посттрансплантационном периоде затруднено из-за высокого уровня инфицированности цитомегаловирусом и иммуносупрессивной терапии данной категории больных.

Для диагностики активной ЦМВ-инфекции и ЦМВ-болезни у трансплантационных больных применяют полимеразную цепную реакцию (ПЦР). Положительной результат

ПЦР-анализа периферической крови свидетельствует об активации инфекции, так как у здоровых лиц с латентной инфекцией содержание вируса в крови чрезвычайно низко. Количество вирусной ДНК более 1000 копий в 10^4 лейкоцитах коррелирует с развитием симптоматической ЦМВ-инфекции [1]. В то же время ПЦР-диагностика не позволяет выявлять латентное вирусоносительство и дифференцировать первичную инфекцию от реактивации или реинфекции.

Применение ИФА-диагностики, основанной на использовании различных структурных и неструктурных рекомбинантных белков ЦМВ, является перспективным направлением в дифференциальной диагностике первичной, латентной и активной ЦМВ-инфекции. Показано, что антитела к структурному белку ЦМВ p150 выявляются почти у 100% инфицированных. Исключение составляет ранняя стадия первичной инфекции, когда выявляются антитела к неструктурному белку ЦМВ p52 [2].

Цель исследования: оценить динамику специфического антительного ответа против ЦМВ в ходе развития активной ЦМВИ у больных после аллотрансплантации почки.

Материалы и методы

В работе представлены клинические наблюдения и исследования, выполненные в НИИТ и ИО МЗ РФ и ЦКБ Медицинского центра Управления делами Президента РФ.

Было обследовано 44 сыворотки от 14 больных с аллотрансплантатами почки, имевших позитивный результат ПЦР (ДНК ЦМВ) в посттрансплантационном периоде. Все пациенты получали трехкомпонентную иммуносупрессивную терапию циклоспорином (СуА), азатиоприном и преднизолоном. Большинство обследований проводили в период 1-12 недель после аллотрансплантации с интервалом 1-2 недели.

Для серологической диагностики ЦМВИ использовали иммуноферментные тест-системы следующих фирм:

1. ЦМВ-контроль компании “Д. Мазай и К^о” (Россия). В данной тест-системе используется рекомбинантный полипептид - аналог неструктурного основного предраннего белка ЦМВ. Трактовка результатов осуществляется по разнице между величиной оптической плотности в лунке со специфическим рекомбинантным антигеном ЦМВ и величиной оптической плотности в лунке с контрольным неспецифическим полипептидом E.coli. Результат относили к положительным при разнице 0.350.
2. CMV-IgM-ELA-test, ф. Medac (Германия). Определение IgM-антител к ЦМВ в данной тест-системе основано на связывании содержащимися в сыворотке иммуноглобулинов класса IgM с нанесенными на поверхности лунок антителами к IgM человека с последующим добавлением инактивированного ЦМВ-антигена, меченого пероксидазой. Количество образовавшихся комплексов IgM-ЦМВ пропорционально интенсивности окраски ТМВ-субстрата и характеризует концентрацию антител к ЦМВ.
3. CMV-IgG-ELA-test, ф. Medac (Германия) В данной тест-системе для определения IgG-антител к ЦМВ используется следующий принцип: иммуноглобулины класса IgG, содержащиеся в исследуемой сыворотке, связываются с ревматоидным фактором, нанесенным на поверхности лунок. В последующем в лунки вносится ЦМВ-антиген, меченный пероксидазой. Количество образовавшихся комплексов IgG-ЦМВ пропорционально интенсивности окраски ТМВ-субстрата и характеризует концентрацию антител к ЦМВ.

В качестве теста, подтверждающего активную ЦМВ-инфекцию использовали полимеразную цепную реакцию (ПЦР). ДНК выделяли из образцов цельной крови с помощью сорбента (наборы для выделения ДНК Центрального Научно-исследовательского института эпидемиологии (ЦНИИЭ)). Для амплификации участка ДНК ЦМВ были использованы праймеры на 4 экзон сверххранного (ME) региона генома ЦМВ. Полуколичественную оценку результатов ПЦР проводили методом десятикратных разведений образца перед амплификацией при известной чувствительности. Детекцию продуктов реакции проводили методом электрофореза в 2% агарозе с 0,001% этидиум бромидом, с последующей

визуализацией в ультрафиолетовом свете. В качестве положительного контроля, использовали ДНК, выделенную из ЦМВ (штамм AD-169), выращенного на культуре фибробластов эмбриона человека.

Результаты исследования

При исследовании 44 сывороток (30 позитивных и 14 негативных на ДНК ЦМВ) от 14 пациентов ИФА-тест-системой “Д. Мазай и К^о” (Россия) антитела IgG класса к основному неструктурному предраннему белку ЦМВ были обнаружены в 11(25%) сыворотках от 5 пациентов. Из них 10 (90.9%) образцов крови были позитивны на ДНК ЦМВ. При этом, однако, 20 (60.6%) образцов из 33, серонегативных по этим антителам, также были позитивным и в ПЦР. У 1 из пациентов, положительных по ранним IgG-антителам, произошла обратная сероконверсия до появления ДНК ЦМВ в крови.

ЦМВ-специфические антитела IgM-класса (CMV-IgM-ELA-test, Medac, Germany) были обнаружены в 16 (36.4%) из 44 исследованных образцов сывороток, из них 12 (75%) были ПЦР-позитивны. С другой стороны, 18 (64.3%) образцов крови из 28, негативных по IgM антителам, также были позитивны в ПЦР. 8 (72.7%) образцов, содержащих IgG-антитела к неструктурному белку ЦМВ, были серонегативны в тесте на IgM-антитела к ЦМВ.

Все (100%) обследованных образцов сывороток были положительны по антителам IgG класса к ЦМВ (CMV-IgG-ELA-test, Medac,) (Таб. 1).

Таблица 1

Сравнительная оценка результатов исследования 44 образцов крови от 14 больных с аллотрансплантатами почки ИФА-тест системами ЦМВ-контроль (“Д. Мазай и К^о”), CMV-IgG-ELA-test, CMV-IgM-ELA-test (Medac) и методом ПЦР (ДНК ЦМВ).

ИФА-ЦМВ-контроль Д.Мазай и К	CMV-IgM +	CMV-IgM -	CMV-IgG +	CMV-IgG -	ДНК ЦМВ +	ДНК ЦМВ -	Всего:
IgG+	3	8	11	0	10	1	11(25.0%)
IgG-	13	20	33	0	20	13	33(75.0%)
Всего:	16 (36.4%)	28 (63.6%)	44 (100%)	0 (0.0%)	30 (68.2%)	14 (31.8%)	44 (100%)

ПЦР	CMV-IgM +	CMV-IgM -	CMV-IgG +	CMV-IgG -	CMV-IgG (ИФА-ЦМВ-контроль)+	CMV-IgG (ИФА-ЦМВ-контроль) -	Всего:
ДНК ЦМВ+	12	18	30	0	10	20	30(68.2%)
ДНК ЦМВ-	4	10	14	0	1	13	14(31.8%)
Всего:	16 (36.4%)	28 (63.6%)	44 (100%)	0 (0%)	11 (25%)	33 (75%)	44 (100%)

В ходе активации ЦМВ-инфекции в посттрансплантационном периоде было отмечено четыре основных варианта антительного ответа:

1. Нарастание титров общих и предранних антител IgG класса, антител IgM класса при появлении и росте уровней ДНК ЦМВ (Таб.2)
2. Отсутствие специфических антител класса IgG к основному неструктурному белку ЦМВ при позитивном результате ПЦР-анализа и наличии высокого уровня общих антител класса IgG и IgM (Таб. 3)
3. Появление и быстрый рост титров IgM-антител к ЦМВ вместе с нарастанием уровней ДНК ЦМВ при постепенным нарастанием титров общих антител IgG класса к ЦМВ при полном отсутствии антител IgG класса к неструктурному белку ЦМВ (Таб.4).

4. Нарастание титров общих и предранних антител IgG класса к ЦМВ при отсутствии IgM-антител к ЦМВ при росте уровней ДНК ЦМВ в крови (18.2%) (Таб 5).

Таблица 2

Мониторинг антител IgG-класса к основному неструктурному предраннему белку ЦМВ, общих антител ЦМВ-специфических антител IgG класса, ЦМВ-специфических антител IgM класса и ДНК ЦМВ у больного Г.

Недели после трансплантации					
Показатели	11	12	13	14	15
IgG к ранним н/с белкам ЦМВ величина превышения	0.615	не иссл.	1.159	не иссл.	0.982
IgG антитела к ЦМВ образец/ cut-off	16.29	не иссл.	17.03	не иссл.	15.06
IgM антитела к ЦМВ образец/ cut-off	5.80	не иссл.	16.9	не иссл.	18.27
ДНК ЦМВ	++	+++	+++	+	+
Симптомы ЦМВ-инфекции	-	+	+	-	-
Антивирусная терапия		+	+	-	

Таблица 3

Мониторинг антител IgG-класса к основному неструктурному предраннему белку ЦМВ, общих антител ЦМВ-специфических антител IgG класса, ЦМВ-специфических антител IgM класса и ДНК ЦМВ у больного Б-р.

Недели после транспланта ции	11	12	13	14	15
IgG к ранним н/с белкам ЦМВ величина превышения	не обн.	не обн.	не обн.	не обн.	не иссл
IgG антитела к ЦМВ образец/ cut-off	12.35	14.69	15.36	15.51	не иссл
IgM антитела к ЦМВ образец/ cut-off	4.35	4.39	4.93	4.69	не иссл
ДНК ЦМВ	+++	++	++	-	не иссл
Симптомы ЦМВ-инфекции	-	-	-	-	-
Антивирусная терапия	+	+	-	-	

Таблица 4

Мониторинг антител IgG-класса к основному предраннему неструктурному белку ЦМВ, общих антител ЦМВ-специфических антител IgG класса, ЦМВ-специфических антител IgM класса и ДНК ЦМВ у больного Б.

Недели после трансплантации						
Показатели	1	2	3	4	5	6
IgG к ранним н/с белкам ЦМВ величина превышения	не обн.	не обн.	не обн.	не обн.	не обн.	не обн.
IgG антитела к ЦМВ образец/ cut-off	2.39	2.98	4.6	6.97	6.36	6.37
IgM антитела к ЦМВ образец/ cut-off	14.2	14.2	14	12.9	13.32	12
ДНК ЦМВ	-	- ++	+++	+	+	-
Симптомы ЦМВ-инфекции	-	-	+	+	+	-
Антивирусная терапия	-	+	+	+	+	-

Таблица 5

Мониторинг антител IgG-класса к основному неструктурному предраннему белку ЦМВ, общих антител ЦМВ-специфических антител IgG класса, ЦМВ-специфических антител IgM класса и ДНК ЦМВ у больного К.

Показатели	Недели после трансплантации					
	1	2	3	4	5	6
IgG к ранним н/с белкам ЦМВ величина превышения	не иссл.	не обн.	3.367	2.952	2.987	3.041
IgG антитела к ЦМВ образец/ cut-off	не иссл.	12	15.32	15.17	15.27	17.68
IgM антитела к ЦМВ образец/ cut-off	не иссл.	0.70	0.34	0.52	0.89	0.93
ДНК ЦМВ	не иссл.	-	+++	+	+ -	+
Симптомы ЦМВ-инфекции	-	-	+	+	-	-
Антивирусная терапия	-		+	+	-	-

Таким образом, в 90.9% случаях положительный результат по IgG-антителам к раннему неструктурному антигену ЦМВ сопровождался наличием ДНК ЦМВ в периферической крови. Однако, эти антитела выявлялись в 33% образцов крови, позитивных по ДНК ЦМВ. Выявление ЦМВ-специфических IgM антител в 75% случаев сопровождалось положительным результатом ПЦР. 64.3% образцов крови, негативных по IgM содержали ДНК ЦМВ. Расхождения результатов ПЦР-анализа и ИФА связаны с медленным ростом титров ЦМВ-специфических IgM при развитии активной ЦМВИ и их длительной циркуляцией после специфической противовирусной терапии. Диагностика ЦМВ-инфекции, основанная на выявлении только общих ЦМВ-специфических антител IgG класса, малоинформативна вследствие 100% вирусоносительства у обследованной категории пациентов.

Диагностика ЦМВ-инфекции у иммунокомпетентных и иммунодефицитных пациентов в большинстве случаев имеет различную направленность. У иммунокомпетентных - это дифференцировка первичной, латентной и активной инфекции. У иммунодефицитных пациентов основная проблема связана с диагностикой ЦМВ-болезни. Выявление в сыворотке пациента ЦМВ-специфических антител IgM класса в отсутствии антител IgG класса свидетельствует о первичной инфекции. Наличие ЦМВ-специфических антител IgM и IgG класса означает реактивацию ЦМВИ. Однако, определение сроков инфицирования или реактивации крайне затруднительно вследствие медленного роста титров антител и их длительной циркуляции.

Диагностика ЦМВ-болезни у иммунодефицитных пациентов проводится, как правило, методом количественной ПЦР [3, 4] или методом выявления антигенемии [5, 6]. Первичная ЦМВ-инфекция у трансплантационных больных встречается редко, однако ее диагностика также актуальна, поскольку чаще сопровождается развитием тяжелых клинических симптомов.

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о разнообразии вариантов антительного ответа при развитии активной ЦМВ-инфекции на фоне иммуносупрессивной терапии. IgG-антитела к ранним неструктурным белкам ЦМВ выявляются в 39,4% ПЦР-позитивных образцов крови. Появление IgG-антител к ранним неструктурным белкам ЦМВ в 90,9% совпадает с наличием ДНК вируса в крови пациента. Положительный результат по IgM-антителам к ЦМВ совпадает с данными ПЦР-анализа в 75% исследованных образцов. 72.7% образцов крови, содержащих IgG-антитела к неструктурному белку

ЦМВ, были серонегативны в тесте на IgM-антитела к ЦМВ. Таким образом, для объективной оценки течения инфекционного процесса в группах риска необходимо комбинированное использование современных методов ДНК- и серодиагностики.

Список литературы.

1. Ведяков А.М., Долгих М.С. Полимеразная цепная реакция в диагностике цитомегаловирусной инфекции у больных с аллотрансплантатами органов. *Терапевтический архив.* -1998.N 4. - С. 45.
2. Landini M.P. and Mach M. Searching for antibodies specific for human cytomegalovirus: is it diagnostically useful? When end how. *Scan. J. Infect. Dis.* - 1995. Suppl. 99. Proc. 5th Internat. Cytomegalovirus Conference, May 21-24. - 18.
3. Gerna G., Baldanti F., Zella D., Furione M. Detection of human Cytomegalovirus DNA: How, when and where? *Scan. J. Infect. Dis., Proc. 5th Internat. Cytomegalovirus Conference, May, 21-24, Stockholm, Sweden.* - 1995. - V. 99. - 11.
4. Kuhn J.E., Wendland T., Schafer P., Mohring K., Wieland U., Elgas M., Eggers H.J. Monitoring of Renal Allograft Recipients by Quantitation of Human Cytomegalovirus Genomes in Peripheral Blood Leukocytes. *J. Med. Virol.* - 1994. - V. 44. - 398.
5. Van der Bij W., Torensma R., van Son W.J., Anema J., Schirm J., Tegzess A.M., The T.H. Rapid immunodiagnosis of active cytomegalovirus infection by monoclonal antibody staining of blood leukocytes. *J. Med. Virol.* - 1988. - V. 25. - 179.
6. The T.H., van den Berg A.P., Harmsen M.C., van der Bij W., van Son W.J. The cytomegalovirus antigenemia assay: A plea for standardization. *Scan. J. Infect. Dis.* - 1995. Suppl. 99. Proc. 5th Internat. Cytomegalovirus Conference, May 21-24. - 25.