

УДК 616.988.23-078

© Коллектив авторов, 2009.

ИССЛЕДОВАНИЕ УРОВНЯ ИММУНОГЛОБУЛИНА М АНТИТЕЛ К КОКСАКИ И ЕЧНО ВИРУСАМ

А. С. Прилуцкий, Ю. И. Жданюк, Д. А. Лесниченко, В. Г. Гурьянов, Е. А. Слюсарь, Н. В. Пойдун, Н. И. Кузнецова

Кафедра клинической иммунологии, аллергологии и эндокринологии Донецкий национальный медицинский университет им. М.Горького, г. Донецк.

INVESTIGATIONS OF IMMUNOGLOBULIN M LEVEL TO COXSACKIE AND ECHO VIRUSES
A. S. Prilutskiy, Y. I. Zhdanyuk, D. A. Lesnichenko, V. G. Guryanov, E. A. Slusar, N. V. Poydun, N. I. Kuznetsova

SUMMARY

34 patients with clinically established diagnosis of acute enteroviral infection (AEI) were examined. Specific antienteroviral antibodies (AB) – immunoglobulin M (IgM) to Coxsackie and ECHO viruses were measured with use of a developed test-system for immune-enzyme assay produced by "Ukrmed Don" company (Donetsk). The authors revealed that 70% of patients with AEI had IgM AB to Coxsackie and ECHO viruses; healthy persons did not have such AB in the diagnostic titer. The diagnostic accuracy of measuring IgM AB to Coxsackie and ECHO viruses with use of this test-system was 846%, specific properties were equal to 85.7%. This test-system is can be applied for verification of AEI diagnosis in clinical practice and scientific research.

ДОСЛІДЖЕННЯ РІВНЯ ІМУНОГЛОБУЛІНУ М АНТИТІЛ ДО КОКСАКІ ТА ЕЧНО ВІРУСІВ
О. С. Прилуцький, Ю. І. Жданюк, Д. О. Лесніченко, В. Г. Гурьянов, О. О. Слюсарь, Н. В. Пойдун, Н. І. Кузнецова

РЕЗЮМЕ

Обстежені 34 хворих з клінічно встановленим діагнозом гострої ентеровірусної інфекції (ЕВІ). Визначення специфічних антиентеровірусних антитіл (АТ) – імуноглобуліну М (IgM) до вірусів Коксаки та ЕЧНО проводили за допомогою розробленої тест-системи для імуноферментного аналізу виробництва ТОВ "Укрмед Дон" (м. Донецьк). Встановлено, що у 70 % хворих на ЕВІ виявляються IgM АТ до вірусів Коксаки та ЕЧНО, у здорових вказані АТ у діагностично значущому титрі не визначались. Чутливість методу визначення IgM АТ до вірусів Коксаки та ЕЧНО з використанням тест-системи складає 84,6 %, специфічність – 85,7 %. Розроблену тест-систему доцільно використовувати для верифікації діагнозу гострої ЕВІ в клінічній практиці та наукових дослідженнях.

Ключевые слова: антитела класса М, Коксаки, ЕЧНО вирусы.

Энтеровирусная инфекция (ЭИ) является в настоящее время одной из актуальных проблем в связи с недостаточной изученностью распространенности, эпидемиологических особенностей, клинического течения различных форм заболевания и их исходом [1]. Трудность своевременной диагностики ЭИ обусловлена многообразием клинических проявлений, имитирующих различные инфекционные и неинфекционные заболевания, также возможностью протекания инфекции в бессимптомной форме [2]. Использование вирусологических методов исследования ограничено сложностью и длительностью их выполнения. Исходя из сказанного, становится очевидной важная роль специфических иммунологических и молекулярно-биологических исследований в диагностике ЭИ [2,3]. Широкое применение иммуноферментных (ИФА) методов исследований до сих пор было ограничено из-за отсутствия отечественных тест-систем для определения иммуноглобулина М (IgM) антител (АТ) к вирусам Коксаки и ЕЧНО и практической невозможностью приобретения зарубежных аналогов, из-за чего верификация заболевания была крайне затруднительна.

Настоящая работа посвящена изучению диагностических возможностей разработанной отечественной тест-системы для ИФА определения IgM АТ к вирусам Коксаки и ЕЧНО в диагностике острой ЭИ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследованы 34 больных (18 мужчин и 16 женщин) в возрасте от 18 до 57 лет, находившихся на стационарном лечении в диагностическом отделении Городской инфекционной больницы № 1 г. Донецка с диагнозом ЭИ. Больные были госпитализированы с синдромами, ведущие из которых давали основание поставить клинически предварительный диагноз ЭИ (табл. 1).

Определение IgM АТ к вирусам Коксаки и ЕЧНО ИФА методом проводили с использованием отечественной тест-системы производства ООО "Укрмед Дон" (г. Донецк) (Свидетельство № 6113/2007 от 15.02.2007). В качестве контроля были использованы результаты определения уровня IgM АТ при обследовании 40 здоровых доноров.

Статистическая анализ результатов производилась с помощью пакета статистических программ

Таблица 1

Клинические проявления у больных с ЭИ

| Формы ЭИ | Частота, (%) |
|--|--------------|
| Асептический менингит | 47,1 |
| Энцефалит | 5,9 |
| Герпетическая ангина | 23,5 |
| Экзантематозная форма (Бостонская экзантема) | 14,7 |
| Плевродиния (болезнь Борнхольма) | 8,8 |

“MedStat” [4]. В таблицах приводится выборочное среднее значение оцениваемой величины и ошибка среднего. Достоверность различий оценивали с помощью *t* критерия Стьюдента (в случае нормального закона распределения) либо критерия Вилкоксона (в случае отличия закона распределения от нормального).

Для установления диагностического порога (точки разделения здоровых и больных для оценки количественного результата теста) был использован метод построения характеристической кривой (ROC) [4]. Построение кривой операционной характеристики и выбор порога принятия-отвержения проводился в программе Statistica Neural Network (StatSoft Inc., 1999). Оценка прогностических результатов теста производилась путем расчета чувствительности и специфичности теста с указанием 95% доверительного интервала (ДИ) [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При анализе наличия АТ к антигенам вирусов Коксаки и ЕСНО было установлено, что у всех обследованных доноров экстинкция их не превышала 0,2 ЕД оптической плотности. Распределение полученных результатов не отличалось от нормального ($p > 0,1$ по критерию Шапиро-Уилка). В то же время эк-

стинкция при определении уровня АТ класса IgM среди отобранной группы больных с предварительным диагнозом ЭИ составила $0,66 \pm 0,08$ ЕД оптической плотности.

Для исключения возможностей влияния на результат вариаций экстинкции, зависящей от типа и чувствительности ИФА анализаторов различных фирм, различных серий хромогена (ТМВ), длительности проявления, в дальнейшем была проведена стандартизация данных показателей по показателям экстинкции сыворотки больного из пациентов (гепатит - отрицательный, ВИЧ - отрицательный, РНК энтеровирусов - отрицательный), имеющей один из наиболее высоких показателей ОД. Уровни ее были приняты условно за 100 ЕД. В дальнейшем результаты исследований выражались в условных единицах, исходя из стандартной кривой, полученной путем последовательных разведений ее: 1:1 = 50 ЕД, 1:3 = 25 ЕД и т.д.

Распределение результатов исследования IgM АТ у больных ЭИ отличалось ($P < 0,01$) от нормального (Рис. 1). Также были проанализированы средние, минимальные и максимальные значения IgM АТ к вирусам Коксаки и ЕСНО для здоровых лиц и больных ЭИ (Рис. 2).

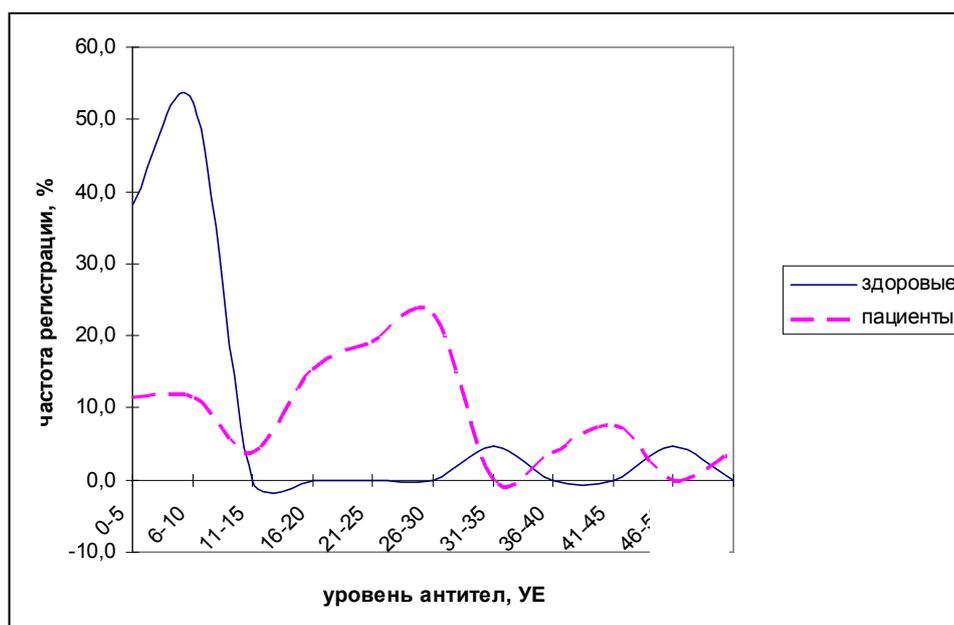


Рис. 1. Распределение результатов определения уровня IgM АТ к вирусам Коксаки и ЕСНО.

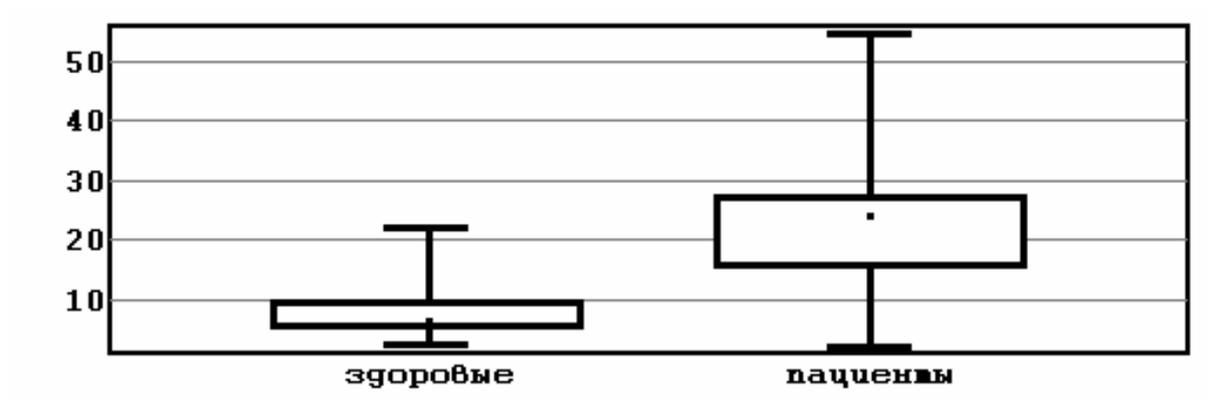


Рис. 2. Результаты определения уровня IgM АТ к вирусам Коксаки и ЕСНО для исследуемых групп. Указаны медианные значения признака, значения I и III квартиля, минимальные и максимальные значения.

Для выявления оптимального уровня значения показателя, разделяющего две группы, была постро-

ена операционная характеристика исследуемого теста (Рис. 3).

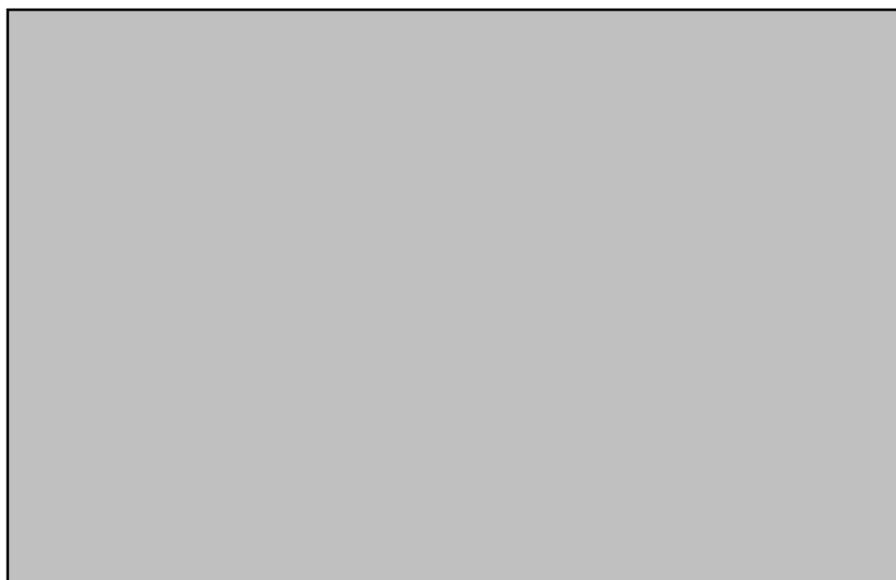


Рис. 3. Кривая операционной характеристики теста определения уровня IgM АТ к вирусам Коксаки и ЕСНО для исследуемых групп.

Установлено оптимальное значение порога отнесения пациента к группе здоровых/больных (Порог = 10 ЕД). В этом случае чувствительность теста составляет 84,6% (ДИ 67,6% – 96,0%), специфичность – 85,7% (ДИ 66,7% – 97,5%). Таким образом, при пороге 10 ЕД IgM АТ вероятность диагностики больных ЭИ составила 84,6%, то есть 84,6% больных ЭИ имели уровень IgM АТ 10 ЕД и выше, а соответствен-

но рассчитанной специфичности, 85,7% здоровых лиц имели уровень IgM АТ ниже 10 ЕД.

Полученные результаты показали, что для здоровых лиц средние статистические уровни антител класса IgM составили $6,4 \pm 2,8$ ЕД/мл. У больных соответствующие показатели равнялись $18,7 \pm 3,2$ ЕД/мл и отличались существенно ($P < 0,01$) от данных контрольной группы (Табл. 2).

Таблица 2

Результаты определения IgM АТ к вирусам Коксаки и ЕСНО

| Группы обследованных | Количество обследованных лиц | Уровни АТ класса IgM к вирусам Коксаки и ЕСНО |
|----------------------------|------------------------------|---|
| Здоровые | 40 | $6,4 \pm 2,8$ ЕД/мл |
| Больные ЭИ | 34 | $18,7 \pm 3,2$ ЕД/мл |
| Достоверность различий (P) | | $P < 0,01$ |

Учитывая сигмально-процентильные соотношения для параметрических и непараметрических критериев, все исследуемые лица были разделены на 3 группы: с отрицательным результатом, чему соответствовали отклонения средних до 2у и включали значения до 95 % достоверности (уровень IgM АТ ниже

9,5 ЕД/мл), положительным результатом с отклонением 3у и более 99 % значений (уровень IgM АТ выше 10,7 ЕД/мл) и сомнительным результатом в интервале от 2у до 3у и 95 – 99 % значений и уровнем IgM АТ в пределах 9,5 – 10,7 ЕД/мл (Табл. 3).

Таблица 3

Частота результатов определения IgM АТ к вирусам Коксаки и ЕСНО у больных с диагнозом ЭИ и здоровых лиц

| Группы обследованных | Кол-во обследованных | Результаты выявления IgM АТ к вирусам Коксаки и ЕСНО | | |
|----------------------|----------------------|--|-------------------------------|------------------------------|
| | | отрицательный (< 9,5 ЕД/мл) | сомнительный (9,5–10,7 ЕД/мл) | положительный (> 10,7 ЕД/мл) |
| Здоровые доноры | 40 | 36 | 4 | 0 |
| Больные ЭИ | 34 | 10 | 0 | 24 |

Полученные результаты исследований при использовании вышеуказанных критериев показывают, что положительный результат определения IgM АТ к вирусам Коксаки и ЕСНО был у 70,6 % больных с диагнозом ЭИ и 29,4 % - отрицательный, при этом сомнительные результаты отсутствовали. Не исключено, что у части из 10 больных с отрицательным результатом при поступлении в стационар через несколько дней от начала острой ЭИ уровень IgM АТ еще был недетектируемым вследствие короткого срока до обследования, начала инфекции и в дальнейшем бы продукция специфических IgM АТ к Коксаки и ЕСНО вирусам нарасла бы и отмечалось наличие их. Отрицательные результаты определения IgM АТ к Коксаки и ЕСНО вирусам отмечались у 90 % здоровых доноров, сомнительные – лишь у 10 %, положительные – у 0 %, что также характеризует тест-систему как высокоспецифичную.

Таким образом, разработанная и сертифицированная (Свидетельство № 6113/2007 от 15.02.2007) тест-система для определения

IgM АТ к вирусам Коксаки и ЕСНО дает у большинства больных клинически диагностированной энтеровирусной инфекцией положительный результат. Использование ее и анализ результатов согласно разработанных критериев позволяет лабораторно установить у 70 % пациентов с клинически поставленным диагнозом ЭИ факт наличия специфических АТ класса IgM. Это дает возможность быстро (для проведения анализа требуется всего 2 – 3 часа) подтвердить объективно наличие ЭИ у данной группы пациентов.

Работы по определению IgM АТ при ЭИ единичные и посвящены, как правило, не клиническим, а экспериментальным исследованиям [6]. Результаты исследований IgM АТ к вирусам Коксаки и ЕСНО у больных ЭИ с помощью ИФА метода представлены [3] в статье Т.В. Амвросьевой и соавт. (2004). При этом положительные результаты зарегистрированы у 68%

обследованных пациентов, что практически совпадает с полученными нами результатами.

Специфичность разработанной тест-системы, отсутствие интерференции и зависимости ее результатов от наличия АТ к вирусам полиомиелита подтверждена результатами наших исследований, проведенных среди больных и здоровых лиц с высоким и низким уровнем АТ к данным вирусам при исследовании IgG АТ к вирусам Коксаки и ЕСНО, а также результатами исследований привитых и непривитых детей живой полиовакциной [7].

ВЫВОДЫ

1. Уровень IgM АТ к вирусам Коксаки и ЕСНО у больных с клиническими проявлениями ЭИ составляет $18,7 \pm 3,2$ ЕД/мл и существенно отличается от показателей группы здоровых лиц - $6,4 \pm 2,8$ ЕД/мл ($P < 0,01$).

2. У 70 % больных с клинически выставленным диагнозом ЭИ выявляются IgM АТ к вирусам Коксаки и ЕСНО; у здоровых IgM АТ к вирусам Коксаки и ЕСНО в диагностически значимом титре не определяются.

3. Чувствительность метода определения IgM АТ к вирусам Коксаки и ЕСНО с использованием тест-системы составляет 84,6% (ДИ 67,6% – 96,0%), специфичность – 85,7% (ДИ 66,7% – 97,5%).

4. Разработанную тест-систему целесообразно использовать для уточнения диагноза острой ЭИ в практическом здравоохранении и научных исследованиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Задорожна В.І. Сучасні проблеми ентеровірусних інфекцій / В.І. Задорожна, В.І. Бондаренко // Сучасні інфекції. – 2001. - № 2. – С. 47-51.
2. Бондарев Л.С. Энтеровирусные инфекции (клинические проявления, лабораторная диагностика, терапия) / Л.С. Бондарев // Лікування та діагностика. – 2001. - № 2. – С. 46-50.

3. Лабораторная диагностика энтеровирусных инфекций сердца / Т.В. Амвросьева, Н.В. Поклонская, О.В., О.В. Дьяконова [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2004. – № 3. – С. 58-62.

4. Основы компьютерной биостатистики: анализ информации в биологии, медицине и фармации статистическим пакетом MedStat / [Лях Ю.Е., Гурьянов В.Г., Хоменко В.Н., Панченко О.А.]. – Д.: Папакица Е.К., 2006. – 214 с.

5. Epidemiology biostatistics and preventive medicine. / [Jekel J. F. , Katz D. L., Elmore J. G., Wild

D.M.G.] – 3rd ed.: Saunders, an imprint of Elsevier Inc., 2007. - 421 p.

6. Huber S.A. Coxsackievirus-induced myocarditis is depend on distinct immunopathogenetic responses in different strains of mice / S.A. Huber // Lab. Invest. – 1997. – Vol. 76, № 5. – P. 691 – 701.

7. Результаты исследования уровня антител к вирусам Коксаки А, В и ЭКХО с помощью иммуноферментной тест-системы / А.С. Прилуцкий, С.В. Бабенко, А.С. Сергиенко [и др.] // Имунология та алергологія.- 2006. - № 4. - С. 26-28.