Молекулярни методи на диагностика при HSV стромални кератити

Molecular methods in the diagnosis of HSV stromal keratitis

Г. Йорданов¹, А. Попхаритов², С. Мургова³, Й. Йорданов¹

¹Катедра „Офталмология и обща медицина“, Медицински факултет,
Тракийски университет – Стара Загора

²Клиника по хирургия, Медицински факултет, Тракийски университет – Стара Загора

³Очна клиника, МУ – Плевен

G. Y. Yordanov¹, A. Popkharitov², S. Murgova³, Y. Yordanov¹

¹Department of Ophthalmology and General Medicine, Medical faculty, Trakia University – Stara Zagora

²Department of Surgery, Medical faculty, Trakia University – Stara Zagora

³Eye Clinic, Medical University – Pleven

Резюме

Роговичната стромална лезия може да има обширна диференциална диагноза. Серологичното изследване често не е достатъчно категорично по отношение на етиологията. Прилагането на полимеразна верижна реакция (PCR) при диагностични затруднения е ценен метод за доказване на евентуалния причинител – херпетичния вирус.

Цел: Да установим ефективни ли са молекулярно-вирусологичните техники и в частност полимеразната верижна реакция (PCR) в диагнозата на стромалния херпетичен кератит.

Материал и методи: Рандомизирано, проспективно проучване, включващо 9 пациенти (9 очи, 6-ма мъже и 3 жени, средна възраст 49,6 г.) с предполагаем стромален херпес симплекс вирусен (HSV) кератит. Пациентите са лекувани амбулаторно и се разделят в две групи: Група 1 – с типични стромални херпетични лезии (7 очи) и Група 2 – с атипични клинични белези (2 очи). За извършването на PCR реакцията се ползва HSV 430/720 V-8-50R Amplification Kit (Saccase Biotechnologies, Italy). Ползвани бяха положителни и отрицателни контроли.

Резултати: При очите с **типична клинична картина** (Група 1) вирусен генетичен материал доказахме в проба от сълза, взета с микропипета при 2/7 случаи (28,6%) и 1/7 случаи (14,3%) в проба от сълза, получена чрез Schirmer-тест лента. При двете очи с **нетипична стромална лезия** (Група 2) установихме причинителя при 1 от 2-та случая (50%) с хартиена Schirmer-тест лента и микропипета. При този пациент диагнозата бе потвърдена и чрез епително абразιο (дебрайдмънт), възможно, поради съпътстващата, надлежаша епителна лезия.

Важността на роговицата се е осъзнавала още от древността. Първите по-сериозни опити за разбиране на анатомията на окото и роговицата и тяхната функция и патология датират от края на древногръцкия и началото на римския период. Счита се, че първите описания са направени в Александрийското училище (Египет), но записките от този период са загубени (1). Същата съдба постига и Галеновата творба „Galen's strictly ophthalmic writings“ (2). Авторът е и първият клиник, оставил ясно описание на роговицата по отношение на положението спрямо другите очни тъкани и нейната функция (3).

Херпетичните заболявания са широко разпространени и рядко представляват диагностична трудност (4). Възрастните хора са обособена клинична група по отношение на инфекцията. Херпес симплекс вирус (HSV) инфекции са по-чести при тях и могат да увеличат риска от силно изтъняване на роговицата и перфорация (5). В около 70% заболяването става рецидивиращо в различни интервали. Новите рецидиви протичат по-тежко и увеличават риска от трайно увреждане на зрението (6).

Заклучение: Полимеразната верижна реакция (PCR) е надежден метод за доказване на диагнозата херпетичен стромален кератит, лимитиращ фактор за ефективността ѝ е методът на събиране на пробите.

Ключови думи: роговица, херпес симплекс вирус (HSV), стромален кератит, полимеразна верижна реакция (PCR), молекулярно-вирусологични методи.

Абревиатури в текста: Полимеразна верижна реакция (PCR), херпес симплекс вирус (HSV), дезоксирибонуклеинова киселина (ДНК), интервал на достоверност (CI), варицела-зостер вирус (VZV), цитомегаловирус (CMV).

Abstract

A corneal stromal lesion could have quite an extensive differential diagnosis. One of the main agent causing corneal inflammation is the herpes simplex virus (HSV). Serology investigation often isn't eloquent enough concerning the etiology of the disease. Applying polymerase chain reaction (PCR) when in doubt is a valuable method for proving the causing agent – in that case the herpetic virus.

Purpose: To evaluate the effectiveness of molecular-virology techniques – PCR in the diagnosis of HSV stromal keratitis.

Material and Methods: Randomized, prospective study, including 9 patients (9 eyes), of which 6 men and 3 women, average age 49,6 years with diagnosis to proof – HSV stromal keratitis. The patients were treated on an outpatient basis and were divided into 2 groups: Group 1 – with typical stromal herpetic lesions (7 eyes) and Group 2 – with atypical stromal presentation (2 eyes). For performing the PCR we used HSV 430/720 V-8-50R Amplification Kit (Saccase Biotechnologies, Italy). Positive and negative controls were used.

Results: In eyes with typical presentation (Group 1) we proved specific viral DNA in tear film sample, collected with micropipette in 2 out of 7 eyes (28,6%) and in 1 out of 7 (14,3%), collected with Schirmer-test strips. In Group 2 we found herpetic DNA in 1 out of 2 eyes (50%) with Schirmer-test strip and micropipette. In that particular patient the diagnosis was confirmed using epithelial debridement, which we had the opportunity to perform due to an overlying epithelial lesion.

Conclusion: Polymerase chain reaction (PCR) is a reliable method for stating the diagnosis of herpetic stromal keratitis and a possible limiting factor could be the way of collecting the tear film or epithelial cell samples.

Key words: Cornea, Herpes simplex virus (HSV), stromal keratitis, polymerase chain reaction (PCR), molecular virology methods.

Abbreviations in text: Polymerase chain reaction (PCR), Herpes simplex virus (HSV), Deoxyribonucleic acid (DNA), Confidence interval (CI), Varicella zoster virus (VZV), Cytomegalovirus (CMV).

Цел

Целта на нашето проучване бе да установим ефективни ли са молекулярно-вирусологичните техники и в частност полимеразната верижна реакция (PCR) в диагнозата на стромалния херпетичен кератит.

Материал и методи

Рандомизирано, проспективно проучване, включващо 9 пациенти (9 очи, 6-ма мъже и 3 жени, средна възраст 49,6 г.) с предполагаем стромален херпес симплекс вирусен (HSV) кератит. Пациентите са лекувани амбулаторно и се разделят в две групи: Група 1 – с типични стромални херпетични лезии (7 очи) и Група 2 – с атипични клинични белези (2 очи). За извършването на PCR реакцията се ползва HSV 430/720 V-8-50R Amplification Kit (Saccase Biotechnologies, Italy). Ползвани бяха положителни и отрицателни контроли.

Когато постъпилите за изследване материали бяха сълзи, вирусите в транспортната среда бяха преципитирани с помощта на PEG-6000/NaCl при 4°C за една нощ и концентрирани чрез центрофугиране при 10,000 rpm. Полученият при това пелет беше ресуспендиран в буфер TNE (0.1 M NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH 7.6; 1 mM EDTA, pH 8.0) и подлаган веднага на ДНК-екстракция или съхраняван на -70°C до момента на по-нататъшна обработка.

Амплификацията на специфичен геномен фрагмент на HSV се осъществи с помощта на търговския набор HSV 430/720 V-8-50R Amplification Kit (Saccase Biotechnologies, Italy). Всички дейности по амплификацията на изследваните ДНК проби, както и визуализацията на получените резултати бяха извършвани според изискванията на производителя (Saccase Biotechnologies, Italy).

Амплификацията беше провеждана при условията, препоръчани от производителя: начална денатурация на 95°C за 5 мин, последвана от 42 цикъла (95°C/60 сек, 65°C/60 сек и 72°C/60 сек) и 1 цикъл на крайна елонгация при 72°C/1 мин.

Визуализацията на PCR продуктите бе направена чрез хоризонтална агарозна гел-електрофореза (7).

Резултати

Резултатите от изследването са представени на таблица 1.

Таблица 1. Детекция на HSV ДНК в проби от пациенти с херпетичен стромален кератит.

МЕТОДИ НА ВЗЕМАНЕ НА МАТЕРИАЛ	КЛИНИЧНИ ФОРМИ НА СТРОМАЛЕН КЕРАТИТ (9)	
	ТИПИЧНИ ФОРМИ (7) p > 0.05	АТИПИЧНИ ФОРМИ (2)
ПРОБА ОТ СЪЛЗА		
- с Schirmer лента	1+/7 (14,3%)	1+/2 (50%)
- с микропипета	2+/7 (28,6%)	1+/2 (50%)
ЕПИТЕЛНО АБРАЗИО		
- с игла	Не е взета	1+/2 (50%)
- с тампон	Не е взета	Не е взета

В групата на типичните и атипични дълбоки херпетични кератити с най-висока доказателствена стойност е получаването на материал чрез микропипета – до 28,6%. Разликите не са статистически значими и това се обяснява с факта, че относителните дялове са направени от малък брой случаи.

От стромалните форми с херпетичен кератит при 9 пациенти (9 очи) 7 са с типична клинична картина (Група 1). При тях вирусен генетичен материал доказахме в слъза при 2/7 случаи (28,6%) с микропипета и при 1 от 7 случаи (14,3%) със Schirmer-тест лента. В случаите на интактност на епитела не е извършвано повърхностно абразиио.

При Група 2 (с нетипична стромална лезия) установихме причинителя при 1 от 2 случая (50%) с хартиена Schirmer-тест лента и микропипета. В този пациент диагнозата бе потвърдена и чрез епително абразиио (дебрайдмънт), възможно поради съпътстващата надлежаша епителна лезия.

Обсъждане

Според мултицентрово проучване, извършено във Франция през 2003 г. общата заболяемост през изследвания период (3 месеца) е била 31,5 за 100 000 човека за година, (95% интервал на достоверност [CI], 25.5-37.5), заболяемостта за нови случаи (първичен епизод) е била 13,2 на 100,000 човека за година (95% CI, 10.4-15.9) и 18.3 на 100,000 човека за година рецидиви (95% CI, 14.6-22.1). Най-честата форма е била дендритната (56.3%, n = 153), стромален кератит (29.5%, n = 81) и географска форма (9.8%, n = 27). Други очни лезии са били свързани с кератит в 35.0% (n = 125) от случаите; най-чести от тях били конюнктивитите (18.8%, n = 67), увеит (11.8%, n = 42), и/или въвличане на клепачите (8.6%, n = 31) (8).

Диагностичната полза от PCR детекцията на HSV ДНК в слъзни проби при стромални и дисциформени лезии се подчертава и от други автори, особено когато роговична биопсия не е желателна и конвенционалните техники за директно доказване на HSV като изолация на вирус и антигенно откриване са трудни (9). Ние установяваме генетичен материал от херпес симплекс вирус в 28,6% при типични и до 50% при атипични форми на стромално засягане.

Наблюдават се атипични прояви на HSV, при които затруднената диагноза води до неправилно лечение, полипрагмазия и дори прилагане на медикаменти, противопоказани за тези заболявания. Без лабораторна диагностика се провежда противовирусно лечение по принципа „diagnosis ex juvantibus“, което може да доведе до влошаване на заболяването и забавяне на адекватното лечение. Противовирусните препарати са с висока токсичност и безконтролното им приложение може да доведе до нарушаване на хомеостазата и трофиката на роговичната повърхност.

Важността на вземане на материалите за изследване се подчертава от Goldschmidt и сътр. Те изследват потенциалните взаимодействия на разтворите на охубургосаин и fluorescein, използвани в практиката и влиянието на тези разтвори върху надеждността на резултатите от извършена като рутинен тест PCR за диагностика на кератит. Установява се, че възможността на метода да открие HSV, VZV, CMV и Acanthamoeba ДНК-последователности се намалява от присъствието на охубургосаин и fluorescein. Двата продукта, разредени до 1/16, понижават вероятността за откриване на вирусна копия повече от 2 logs (ДНК копия/проба). Едновременно поставяне на fluorescein или локален анестетик в епруветките, съдържащи пробите за PCR диагностика, особено ако това

е PCR в реално време (rt PCR), може да доведе до фалшиво негативни резултати. Понеже проби от роговица за микробиологична диагностика на кератит се вземат след накапване на локален анестетик и оцветяване на роговицата с fluorescein, очната повърхност трябва да се промива интензивно с подходящ очен разтвор, за да се намали рискът от поставяне на погрешна диагноза (10).

Fukuda и съавтори установяват, че при епителните кератити и персистиращите епителни дефекти HSV ДНК се открива във всички изследвани от тях проби (100%). При активния дисциформен стромален кератит HSV ДНК се открива в 57%. HSV ДНК не е открита в проби от незасегнати очи или в проби от вял стромален кератит или ендотелит. С това проучване авторите демонстрират, че HSV репродукция

настъпва в персистиращите епителни дефекти и дисциформения стромален кератит (11).

Заклучение

Вирусните заболявания на очите и в частност причинените от HSV са актуален клиничен проблем. Статистическите проучвания демонстрират тенденция за бързо и трайно нарастване на очните заболявания с вирусна етиология. Като основна причина за това се приема снижаването на имунната защита на съвременния човек, инвалидизирането поради неправилно използване на кортикостероиди и антибиотични препарати, влиянието на стресови и неблагоприятни екологични фактори. PCR е надежден метод за доказване на диагнозата херпетичен стромален кератит.

Книгопис:

1. „History of ophthalmology“ (1988), Documenta Ophthalmol 68: 1-184.
2. Kuchle, H. (2000). „History of the Ophthalmology clinic, University of Erlangen- Nuremberg.“ Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde 217: A10-1.
3. Eds Albert DM, E. D. (1996). „Ophthalmology before Hippocrates. In: The History of Ophthalmology.“ Blackwell Science: 1-11.
4. Nakagawa H, Uchida Y, Takamura E, Nakagawa Y, Araki H, Watanabe M. Diagnostic impression cytology for herpes simplex keratitis. Jpn J Ophthalmol. 1993; 37(4): 505-13.
5. Butler, T. K. H., N. A. Spencer, et al. (2005). „Infective keratitis in older patients: a 4 year review, 1998-2002.“ British Journal of Ophthalmology 89(5): 591-6.
6. Дундаров, Ст. Г.: Клинична вирусология, София: Медицина и физкултура, 2006.
7. Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1982) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York.
8. Labetoulle M, Auquier P, Conrad H, et al. Incidence of herpes simplex virus keratitis in France. Ophthalmology. 2005; 112: 888-895.
9. Pramod, N. P., R. Hari, et al. (2000). „Influence of human immunodeficiency virus status on the clinical history of herpes simplex keratitis.“ Ophthalmologica 214(5): 337-40.
10. Goldschmidt, P., H. Rostane, et al. (2006). „Effects of topical anaesthetics and fluorescein on the real-time PCR used for the diagnosis of Herpesviruses and Acanthamoeba keratitis.“ British Journal of Ophthalmology 90(11): 1354-6.
11. Fukuda, M., T. Deai, et al. (2003). „Quantitative analysis of herpes simplex virus genome in tears from patients with herpetic keratitis.“ Cornea 22(7 Suppl): S55-60.

Corresponding author:

Georgi Y Yordanov, MD, PhD,
Department of Ophthalmology and General Medicine,
11 Armeiska str.,
6000 Stara Zagora,
Bulgaria
E-mail: jordanoff_g@yahoo.com