

ПРИМАТОЛОГИЯ

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ЦИТОМЕГАЛОВИРУСА У ОБЕЗЬЯН АДЛЕРСКОГО ПИТОМНИКА И У ЛЮДЕЙ

А.А.Агумава, М.Г.Чикобава, Б.А.Лапин

НИИ медицинской приматологии РАН, Сочи—Адлер

Проводили мониторинг маркеров цитомегаловируса в крови людей, а также в крови, смывах из зева и тканях слюнных желез обезьян разных видов. Выявили корреляцию процента инфицирования цитомегаловирусом с возрастом у людей. С максимальной частотой вирус обнаруживается в тканях слюнных желез, а с минимальной — в крови.

Ключевые слова: цитомегаловирус, обезьяны, кровь, слюнные железы

Цитомегаловирус (ЦМВ) — это ДНК-содержащий вирус, относящийся к семейству *Herpesviridae*, род *Cytomegalovirus* [3,10]. ЦМВ-инфекция широко распространена и характеризуется многообразными проявлениями — от бессимптомного течения до тяжелых генерализованных форм с поражением внутренних органов и ЦНС [4,9]. Отличительной особенностью ЦМВ является широкий спектр путей инфицирования: воздушно-капельный, урогенитальный, внутриутробный, постнатальный, а также через компоненты крови при переливаниях и пересадке органов. ЦМВ может инфицировать разные органы и ткани, включая клетки нервной ткани, костного мозга, лимфоузлов, печени, легких, желудочно-кишечного тракта, гениталий, крови. Первичное инфицирование может переходить в латентную стадию инфекции с последующей возможной реактивацией при состояниях, связанных с иммунной супрессией [6,8,11].

Наряду с вирусом цитомегалии человека известны ЦМВ обезьян, морских свинок, крыс, мышей и т.д., патогенные только для своего вида [1,2,5,10]. Сравнительное исследование ЦМВ обезьян и людей позволит понять особенности инфекции, что в дальнейшем поможет подойти к решению вопроса о профилактике и разработке специфического лечения. В настоящее время лабораторная диагностика ЦМВ отдельных видов приматов развита недостаточно.

Цель данного исследования — лабораторная диагностика ЦМВ у людей и обезьян, определение частоты обнаружения вируса в разном биологи-

ческом материале, а также выявление эффективности методов ИФА и ПЦР.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводили на базе Адлерского питомника обезьян Института медицинской приматологии РАН. Материалом для исследования послужили 176 образцов крови, 68 соскобов из глотки и 86 образцов тканей слюнных желез обезьян разных видов, а также образцы крови 120 клинически здоровых людей. Кровь, смывы из зева и ткани слюнных желез были взяты от разных животных. Биологический материал, собранный от обезьян разных видов, был разделен на 3 группы. Первую группу составили образцы крови 50 макак-резусов (*Macaca mulatta*), 38 макак яванских (*Macaca fascicularis*), 30 павианов гамадрилов (*Papio hamadryas*), 20 павианов анубис (*Papio anubis*), 30 зеленых мартышек (*Cercopithecus aethiops*), 8 макак лапундер (*Macaca nemestrina*). Во 2-ю группу включили смывы из зева 20 макак-резусов, 12 макак яванских, 13 павианов гамадрилов, 6 павианов анубис, 14 зеленых мартышек, 3 макак лапундер. Третью группу составили ткани слюнных желез 25 макак-резусов, 15 макак яванских, 20 павианов гамадрилов, 8 павианов анубис, 14 зеленых мартышек, 4 макак лапундер.

Экстракцию ДНК из материалов проводили двумя методами: гуанидинтиоционатным (GuSCN) — для экстракции ДНК из крови и смывов из зева, и протеиназным (с использованием фермента протеиназы К) — для экстракции ДНК из тканей слюнных желез.

Адрес для корреспонденции: aslan39@mail.ru. Агумава А.А.

При гуанидинтиоционатном методе материал (100 мкл крови, смыва из зева) переносили в пробирку, содержащую 300 мкл 5 М GuSCN, 1% Три-тон X-100 (об/об), 20 мМ ЭДТА, 50 мМ трис-HCl pH 6.4, 10 мкл SiO₂, инкубировали в течение 30 мин, центрифугировали и отмывали осадок однократно 500 мл промывочного раствора, содержащего 5 М GuSCN, 50 мМ трис-HCl pH 6.4, и двукратно 500 мл промывочного раствора, содержащего 10 мМ трис-HCl pH 7.3, 50 мМ NaCl, 50% этиловый спирт. ДНК элюировали в 50 мкл 0.1 М трис-ЭДТА буфера pH 8.3 [7].

При протеиназном методе материал (100-200 мг ткани слюнных желез) переносили в пробирку с 1 мл раствора, содержащего 2.5 мМ MgCl₂, 20 мкг протеиназы К (30 ед. акт/мг), инкубировали в течение 24 ч при 54°C, инактивировали протеиназу нагреванием до 95°C 5 мин, центрифугировали 3 мин при 13 000 об/мин, надосадочную жидкость переносили в отдельные пробирки [7]. Для ПЦР-амплификации использовали 5 мкл, остаток хранили при -20°C.

Амплификацию проводили в 25 мкл раствора, содержащего 50 мМ KCl, 10 мМ трис-HCl pH 8.4, 3.0 мМ MgCl₂, 0.01% желатина, 100 нг каждого праймера, 0.2 мМ каждого дНТФ и 2.5 ед. Taq ДНК полимеразы. Праймеры синтезированы в компании "Синтол". В качестве положительного контроля использовали ДНК, выделенную из культуральной среды клеток фибробласта человека, зараженных лабораторным штаммом AD169 ЦМВ человека. Отрицательным контролем служила дистиллированная вода. ПЦР проводили на аппарате "Терцик" ("ДНК-технология").

После амплификации материал вносили в 2% агарозный гель, содержащий 0.5 мкг/мл этидиума бромид. Электрофорез проводили в течение 15 мин, 50 А, 10 В/см. Продукты амплификации визуализировали на трансиллюминаторе при λ=330 нм.

В качестве материала для исследования при проведении ИФА использовали сыворотку крови, полученную из цельной крови обезьян разных видов и людей. Для постановки ИФА использовали коммерческую тест-систему для определения IgG человека к ЦМВ ("Вектор Бест").

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При постановке ИФА определяли реактивность антител класса G (IgG) к ЦМВ. Представлены результаты обследования 137 клинически здоровых людей (табл. 1). Общий процент серопозитивных по ЦМВ составляет 91%, прослеживается корреляция между возрастом и процентом положительных на антитела к ЦМВ людей. Также проводили

Таблица 1. Определение антител к ЦМВ в сыворотке крови клинически здоровых людей и обезьян разных видов

Группа	Количество обследованных	Серопозитивные	
		абс.	%
Здоровые люди			
до 25 лет	13	8	61
от 25 до 40 лет	40	35	87
от 40 до 55 лет	38	36	95
от 55 лет и выше	46	46	100
всего	137	124	91
Здоровые обезьяны			
макаки-резусы	50	15	30
макаки яванские	38	12	32
павианы гамадрилы	30	10	33
павианы анубис	20	5	25
зеленые мартышки	30	11	37
макаки лапундер	8	2	25
всего	176	55	31

ИФА на наличие антител к ЦМВ у клинически здоровых обезьян разных видов (табл. 1). В процентном отношении обнаружение IgG к ЦМВ у обезьян колеблется от 25 до 37%, что в 3 раза меньше таковых показателей у людей (табл. 1).

В данном исследовании было проведено ПЦР-тестирование, направленное на качественную детекцию вируса в разном биологическом материале. Для проведения ПЦР были подобраны праймеры к общему консервативному участку гена UL56 ЦМВ человека и обезьян. Из результатов ПЦР-тестирования образцов крови клинически здоровых людей и обезьян разных видов следует, что процент вирусемии как у людей, так и у обезьян достаточно низок и составляет 0-5% (табл. 2).

Таблица 2. Результаты ПЦР-тестирования образцов крови клинически здоровых людей и обезьян разных видов на наличие ЦМВ

Группа	Количество обследованных	Положительные на ЦМВ	
		абс.	%
Люди	137	6	4
Макаки-резусы	50	2	4
Павианы гамадрилы	30	1	3
Макаки яванские	38	2	5
Зеленые мартышки	30	1	3
Павианы анубис	20	1	5
Макаки лапундер	8	—	0

Таблица 3. Результаты ПЦР-тестирования смывов из зева клинически здоровых обезьян разных видов на наличие ЦМВ

Вид	Количество обследованных	Положительные на ЦМВ	
		абс.	%
Макаки-резусы	20	3	15
Павианы гамадрилы	13	2	15.3
Макаки яванские	12	2	16
Зеленые мартышки	14	3	21
Павианы анубис	6	1	17
Макаки лапундер	3	—	0
Всего	68	11	16

объясняется тропностью ЦМВ к тканям слюнных желез и персистенцией в клетках в латентной форме.

Относительно заниженные проценты ЦМВ-положительных на антитела обезьян по сравнению с таковыми показателями у людей обусловлены, по-видимому, межвидовой специфичностью антител класса G, а также различием ЦМВ человека и обезьян по антигенной структуре. Вследствие этого человеческая ИФА-тест-система не может быть использована для полноценной диагностики антител к ЦМВ у обезьян.

Таким образом, мониторинг ЦМВ-маркеров показал высокий процент инфицированности при маленькой вирусной нагрузке, что характерно для латентной инфекции.

Таблица 4. Результаты ПЦР-тестирования образцов слюнных желез обезьян разных видов, взятых на аутопсии

Вид	Количество обследованных	Положительные на ЦМВ		Отрицательные на ЦМВ
		абс.	%	
Макаки-резусы	25	16	64	9
Павианы гамадрилы	20	13	65	7
Макаки яванские	15	9	60	6
Зеленые мартышки	14	10	71	4
Павианы анубис	8	4	50	4
Макаки лапундер	4	2	50	2
Всего	86	54	63	32

При использовании в качестве вирусологического материала смывов из зева наблюдалась другая картина по частоте выявления ЦМВ (табл. 3).

Общая доля ЦМВ-положительных составляет 16%, что в 4 раза больше, чем по результатам тестирования образцов крови (табл. 3). Это обусловливается тем, что клетки эпителия могут быть латентно инфицированы данным вирусом.

В качестве заключительного тестирования проводили детекцию ЦМВ в тканях слюнных желез обезьян (табл. 4). Материал был взят на аутопсиях.

Довольно низкий процент ЦМВ выявляется методом ПЦР в крови как у обезьян, так и у людей, несмотря на то что антитела к вирусу имеются у 25-91%. Данный факт свидетельствует о том, что вирусная нагрузка при ЦМВ-носителе настолько мала, что не выявляется одноразовой ПЦР.

В смывах из зева частота выявления вируса в 2-3 раза выше, чем в крови, и составляет 15-21%. Это свидетельствует о латентной инфицированности вирусом эпителиальных клеток зева.

Самый высокий процент выявления вируса наблюдается в тканях слюнных желез, инфицированность которых составляет 50-70%. Данный факт

ЛИТЕРАТУРА

1. Bahr U., Darai G. // J. Virol. 2001. Vol. 75, N 10. P. 4854-4870.
2. Johnson G., Dick D., Ayers M. et al. // J. Clin. Microbiol. 2003. Vol. 41, N 3. P. 1256-1258.
3. Johnson G., Nelson S., Petric M., Tellier R. // Ibid. 2000. Vol. 38, N 9. P. 3274-3279.
4. Limaye A.P., Kirby K.A., Rubenfeld G.D. et al. // JAMA. 2008. Vol. 300, N 4. P. 413-422.
5. Michaels M.G., Jenkins F.J., George K.S. et al. // J. Virol. 2001. Vol. 75, N 6. P. 2825-2828.
6. Munro S.C., Hall B., Whybin L.R. et al. // J. Clin. Microbiol. 2005. Vol. 43, N 9. P. 4713-4718.
7. Powers C., Früh K. // Med. Microbiol. Immunol. 2008. Vol. 197, N 2. P. 109-115.
8. Revello M.G., Gerna G. // Clin. Microbiol. Rev. 2002. Vol. 15, N 4. P. 680-715.
9. Sinclair J., Sissons P. // J. Gen. Virol. 2006. Vol. 87, Pt. 7. P. 1763-1779.
10. Staczek J. // Microbiol. Rev. 1990. Vol. 54, N 3. P. 247-265.
11. Wiener-Well Y., Yinnon A.M., Singer P., Hersch M. // Isr. Med. Assoc. J. 2006. Vol. 8, N 8. P. 583-584.

Получено 14.08.09