

METODE NOI DE DIAGNOSTIC A INFECȚIEI HERPETICE LA GRAVIDE

Silvia Agop, Olga Cernețchi, Zinaida Sârbu, Constantin Ostrofeț

Catedra Obstetrică și Ginecologie FECMF "Nicolae Testemițanu"

Summary

New methods of diagnosing herpes infection in pregnant women

At the moment we do not have any secure, fast and cheap methods of diagnosing HI (herpes Infection) during pregnancy. With the help of PCR (polymerase chain reaction) in assessing the viral DNA sequences we have a sensibility and distinctiveness up to 98.5%, but very frequently we obtain false negative results, because the viral response has a period of around 14 days. The immunological examination by measuring IgM, which are serving as markers in acute HI, very often when GH (genital herpes) reactivates they are synthesized or they are not serological detectable [2,4]. According to the specialized literature data the total IgG may be divided into IgGp (precocious) and IgGt (tardy). The IgGp serve as markers in the acute HI or in its reactivation [5, 8, 9]. Our purpose is to elucidate the most reliable methods for diagnosing the GH in pregnant women. The results of the study carried out on a group of 70 pregnant women showed that: RPL serological positive was found just in 12.9%, RPL in the cervical epithelium – in 27.1%, IgM-24.3%, while 90.0% with positive IgGp. Based on the study done on pregnant women infected with genital herpes it was found that the most reliable method for diagnosing the acute HI or its reactivation is the immunoenzymatic method by using the ELISA equipment for IgGp determination estimated in 90.0%.

Rezumat

Până la moment în diagnosticul IH (infecție herpetică) la gravide nu există o metodă sigură, rapidă și eficientă. Efectuarea RPL (reacția de polimerizare în lanț) pentru aprecierea fragmentelor de ADN viral are o sensibilitate și o specificitate de până la 98,5%, dar frecvent obținem rezultate fals negative, deoarece perioada de replicare virală durează în mediu 14 zile. Examenul imunologic prin determinarea IgM ce servesc ca marcheri a IH acute, des în HG (herpes genital) în reactivare nu se sintetizează sau serologic nu sunt detectabili [2,4]. Conform datelor literaturii de specialitate IgG totale pot fi divizate în IgGp (precoci) și IgGt (tardivi). IgGp servesc ca marcheri a IH acute sau în reactivare [5,8,9]. Ca scop ne-am propus elucidarea celor mai veridice metode de diagnostic în IH la gravide. În rezultatul examenului de laborator efectuat la 70 de gravide am apreciat: RPL (reacția de polimerizare în lanț) serologic pozitiv doar în 12,9%, RPL din epiteliul cervical – 27,1%, IgM -24,3%, pe când IgGp pozitivi în 90,0%. La gravidele cu herpes genital în baza studiului realizat s-a demonstrat că cea mai veridică metodă de diagnostic a IH acute sau în reactivare este metoda imunoenzimatică prin utilizarea truselor de tip ELISA cu determinarea IgGp estimate în 90,0%.

Actualitatea

IH la gravide provoacă pierderi recurente de sarcină, mortalitate și morbiditate perinatală la un nivel înalt. Pentru a lărgi posibilitățile de tratament a HG la gravide este nevoie de o diagnosticare rapidă și exactă.

În stabilirea diagnosticul herpesului genital se vor lua în considerare acuzele, anamneza, examenul obiectiv, suplimentat de examene de laborator. Tabloul clinic începe de obicei cu sindrom pseudogripal, limfadenopatie inghinală, leucoree apoasă, la a 2-3 zi apar erupții pe un fond hiperemiat și edemat: papule, vezicule, pustule care ulceriază, apoi apar cruste, cicatrice și zone hiperpigmentate [3,4]. Erupțiile durează în infecția primară până la 3 săptămâni, iar în cea recurentă 1 săptămână [2,6].

Formele atipice se depistează în 30-60% cazuri, criteriile clinice sunt: prurit rebel și senzație de tensiune în regiunea vulvei, leucoree apoasă, colpita granuloasă, pseudoerozia și

leucoplachia colului uterin ce nu se supun tratamentului, mai rar se poate întâlni retenția acută de urină (sindromul Enzemeister) în formele grave de HG [5,6].

Examenul de laborator în diagnosticul infecției herpetice cu HVS tip 1 și 2 include: depistarea agentului cauzal (izolarea virusului în culturi de celule, ou embrionat, inoculare la animale de laborator), identificarea antigenului viral (reacția de neutralizare, fixare a complimentului, hemaglutinare), determinarea anticorpilor antiherpetici (imunofluorescență) și aprecierea fragmentelor de ADN viral prin reacția de polimerizare în lanț [6,8].

Conform datelor literaturii de specialitate se consideră că, una din cele mai convingătoare metode pentru diagnosticul de laborator al infecțiilor virale este depistarea agenților infecțioși vii, utilizând metodele microbiologice. Însă, efectuarea acestora este dificilă și în procesul de transportate se distrug o parte de microorganisme, rezultatele fiind frecvent fals negative [1,3].

Pentru evidențierea și evaluarea ADN-lui virusului herpetic se utilizează reacția de amplificare genică (PCR) și tehnica de hibridizare, care au avantajul unei specificități și sensibilități sporite (99,9%) față de tehnicile precedente, dar rămâne a fi costisitoare [4,6].

Primoinfecția herpetică răspunde imun, prin apariția IgM specifice și la două săptămâni apariția IgG [3,6]. În cazul recidivelor herpetice organismul, de regulă nu de fiecare dată reacționează prin sinteza IgM. Uneori IgM se sintetizează în cantități efemeric de mici și serologic nu pot fi depistate, pe când IgG sunt prezente în 100% cazuri [3,5].

În cazul unor boli virale ca HG pentru diagnostic, atât a infecțiilor primare, cât și recidivante, există posibilitatea de a depista IgG pentru proteinele pretimpurii (nestructurale) [1,6,8].

Este cunoscut faptul că virusii sunt paraziți celulari obligatorii și nu sunt capabili să se înmulțească individual. Ciclul lor vital se începe cu replicarea genomului, deasemenea virusii impun celulele în care parazitează să lucreze pentru ei, să producă enzime necesare pentru replicarea și asamblarea noilor particule virale complete, iar mai apoi și proteine structurale necesare capsidului viral. În timpul formării copiilor genomului viral, până a începe asamblarea particulelor virale complete, organismul uman reacționează la proteinele virale străine pentru el (pretimpurii, reglatoare, nestructurale, participante la replicarea ADN viral) prin producerea de IgG. Aceasta are loc la fiecare acutizare virală, în ziua a 3-5 după începutul dezvoltării procesului infecțios. Astfel de IgG pentru proteinele pretimpurii ale virusilor circulă în sânge până la o lună după sfârșirea activității virale [3,7].

Calculând indicii cantitativi ai IgG pentru proteinele virale pretimpurii, se poate de judecat nu doar despre activitatea infecției virale, ci și despre direcția procesului – reprimarea (de exemplu în rezultatul tratamentului reușit) sau dezvoltarea ei. În timpul remisiei nu este activitate a ciclului viral și a replicării genomului, de aceea IgG pentru proteinele pretimpurii nu se sintetizează [1,4].

În cadrul răspunsului imun al organismului față de dezvoltarea infecției virale herpetice ultimii Ac care se sintetizează sunt IgG înalt averse sau târzii. Ei apar după 2 săptămâni de la începutul procesului infecțios și circulă în sânge luni sau chiar ani [2,3].

Scopul studiului este aprecierea celei mai veridice metode de diagnostic a IH la gravide.

Material și metode

Studiul efectuat este de tip prospectiv pe un lot de 70 de gravide, în perioada anilor 2009-2011 în cadrul IMSP SCM Nr. 1 și IMSP ICȘDOSM și C. În studiu au fost incluse gravide cu HG primar sau recidivant. Diagnosticul de IH s-a stabilit în baza culegerii datelor anamnestice, examenului obiectiv și testelor de laborator. Tabloul clinic începe de obicei cu apariția erupțiilor herpetice - la a 2-3 zi apar erupții pe un fond hiperemiat și edemat: papule, vezicule, pustule care ulceriază, apoi apar cruste, cicatrice și zone hiperpigmentate [2,4]. Testele de laborator au fost efectuate în cadrul Laboratorului Imunologic și au inclus: RPL serologică și din epiteliul

canalului cervical, deasemenea determinarea IgM, IgGp și IgGt. Precucrarea statistică a datelor a fost efectuată în programul Microsoft Excel 2000, prin aprecierea testului de semnificație (t-Student) și pragului de semnificație (p).

Rezultate și discuții

Conform datelor literaturii de specialitate până la moment nu există în diagnosticul IH o metodă sigură, eficientă și accesibilă. Medicul specialist stabilește diagnosticul de herpes genital prin colectarea anamnezei, inspecția vizuală a zonei genitale în cazul în care leziunea este tipică sau prin prelevarea unei probe din leziune, în cazul în care este atipică. Infecția cu virusul Herpes Simplex este dificil de diagnosticat între episoadele de reactivare, când nu există nici un fel de leziuni [7,9].

Analiza datelor obținute ce țin de vârsta pacientelor în studiul dat a fost cuprinsă între 16 și 42 ani, în mediu $27 \pm 1,2$ ani, cu următoarea structură: până la 20 ani s-a apreciat în 11 ($15,7\% \pm 2,15\%$) cazuri, 21-30 ani – 39 ($45,7\% \pm 1,95\%$), 31-40 ani – 14 ($20,0\% \pm 4,05\%$) cazuri, iar după 40 de ani – 6 ($8,6\% \pm 6,05\%$) cazuri ($p > 0,05$).

Diagnosticul de laborator este folosit pentru confirmarea etiologiei patologiei apărute în formele atipice și pentru diagnostic diferențiat [3,5]. În studiul dat pentru stabilirea diagnosticului de HG s-au abordat următoarele etape: acuzele, examenul obiectiv pentru aprecierea erupțiilor caracteristice și testele de laborator.

Astfel, pacientele incluse în studiu acuzau la inspecția OG erupții herpetice caracteristice HG, în 100% cazuri, cu diversă localizare (vulvă, perineu, fese și coapse).

Menționăm că a fost apreciat stadiul de replicare virală prin detectarea fragmentelor de ADN al HVS prin metoda molecular genetică, din așa secrete biologice ca serul și epiteliul din canalul cervical. Am obținut următoarele rezultate: reacții pozitive au fost apreciate serologic în $9(12,9 \pm 4,01\%)$ cazuri și ADN din țesutul epitelial al canalului cervical pozitiv în $19(27,1 \pm 5,31)$ cazuri, ($p > 0,05$).

La aprecierea statutului imunologic din serul sangvin, prin metoda ELISA au fost constatați Ac antiherpetici, ca rezultat am obținut IgM s-a estimat pozitiv doar în $17(24,3 \pm 5,13)$ cazuri.

Având în vedere rezultatele obținute, PCR serologic pozitiv doar 12,9%, PCR din epiteliul canalului cervical pozitiv în 27,1%, la fel și IgM pozitiv doar în 24,3%, ne-am propus să introducem o metodă nouă de diagnostic al IH la gravide prin separarea IgG în precoci și tardivi, deoarece IgG precoci sau pretimpurii se încep a sintetiza de la 3-5 zi a procesului infecțios și se mențin în sânge până la 1 lună, atât cât durează procesul inflamator acut.

Tab.1 Metodele de diagnostic a IH la gravide utilizate în studiu

Metode de diagnostic					
Rezultatul examinării	Prezența erupțiilor	RPL serologic	RPL din epiteliul cervical	IgM	IgGp
	Abs./%	Abs./%	Abs./%	Abs./%	Abs./%
Pozitiv	70 100,0±0,0	9 12,9±4,01	19 27,1±5,31	17 24,3±5,13	63 90,0±3,59
Negativ	0 0%	61 87,1±4,01	51 72,9±5,31	53 61,4±5,82	7 10,0±3,59

Astfel în rezultatul datelor obținute am constatat că IgGp au fost detectați în 90,0% cazuri. Pe când IgGt au fost estimați în 3(8,6±4,74%) cazuri ($p>0,05$) și servesc ca marcheri ai infecției herpetice subacute sau cronice.

Prin urmare aprecierea în general a IgG anti herpetice este puțin informativ și ne vorbește doar de o infectare cu HVS, divizarea IgG antiherpetice în IgG precoci și tardivi, ne-au permis să apreciem stadiul infecției herpetice și să confirmăm necesitatea administrării tratamentului.

Așadar aprecierea rezultatele înalte de IgGp în 90,0% la gravidele cu IH, ne permit să constatăm forma de reactivare a infecției viral-herpetice și să afirmăm necesitatea administrării tratamentului deoarece virusul se află încă în stare de replicare și este sensibil la tratamentul antiviral.

Concluzii

1. În rezultatul studiului efectuat am divizat IgG în IgGp (precoci) și IgGt (tardivi).
2. IgGp servesc ca marcheri a IH acute sau în reactivare deoarece se încep a sintetiza din a 3 zi a procesului inflamator viral și se mențin serologic până la o lună.
3. La gravidele cu herpes genital în baza studiului realizat s-a demonstrat că cea mai veridică metodă de diagnostic a IH este metoda imunoenzimatică prin utilizarea truselor de tip ELISA cu determinarea IgGp estimate în 90,0%.

Bibliografie

1. Agop S. Opțiuni de diagnostic și tratament în herpesul genital la gravide. Anale științifice. USMF „Nicolae Testemițanu”. Probleme actuale ale sănătății mamei și copilului. Chișinău, 2009, vol. 5, p. 111-115.
2. Burlacu A. Algoritmul de diagnostic și tactica conduitei gravidelor cu chlamidioză și herpes genital. În: Buletin de perinatologie. Chișinău, 2003, nr. 2. 42-47p.
3. Gavriluc M., Casian M., Spânu C., Floca L. Infectarea sistemului nervos central prin virusul Herpes simplex: considerații diagnostice și terapeutice. În: Analele științifice ale USMF „Nicolae Testemițanu”. Chișinău. 2000. 305-310p.
4. Орловская И. В. Диагностика внутриутробной герпес-вирусной инфекции с церебральными нарушениями. Автореф дис. канд. мед. наук. 1995.
5. Ashley R. L. Laboratory techniques in the diagnosis of herpes simplex infection. Genitourin. Med. 1993. vol. 69. 174-183p.
6. Brown Z.A., Wald A., Morrow R. Et al. Effect of serologic status and cesarean delivery on transmission rates of herpes simplex virus from mother to infant. JAMA. 2003. vol. 289. 2204-2208 p.
7. Enright A. M., Prober C. G. Neonatal herpes infection: diagnosis, treatment and prevention. Semin. Neonatal. 2002. vol. 25. 1-13 p.
8. Ilona LF., Pia O., Marianne F. et al. Detection of herpes simplex virus DNA in dried blood spots marking a retrospective diagnosis possible. J. Clin. Virol. 2003. vol.26. 39-48p.
9. Immergluck L.C., Domowicz M.S., Schwartz N.B. Viral and cellular requirements for entry of herpes simplex type 1 into primary neuronal cells. J. Gen. Virol. 1998. vol. 79. 49-559p.