

Mogućnost primene salive za dokazivanje anti herpes simplex virusa IgM antitela

YU ISSN 0039-1743
UDK 616.31

Possibility of saliva use in detecting anti herpes simplex virus IgM antibodies

KRATAK SADRŽAJ

U radu je ispitivana mogućnost upotrebe salive kao materijala alternativnog serumu za dokazivanje anti HSV-1 IgM antitela. U studiju su uključene tri grupe pacijenata od kojih su prve dve činili imunokompetentne osobe sa klinički i virusološki potvrđenom HSV infekcijom, a u treću grupu su bili uključeni pacijenti oboleli od AIDS-a koji su pored mnogobrojnih oportunističkih infekcija imali i herpetičnu infekciju u formi labijalnog herpesa. Prisustvo anti HSV-1 IgM antitela dokazivano je pomoću testa indirektno imunofluorescencije u uzorcima seruma i salive svih pacijenata. Nalaz anti HSV-1 IgM antitela u obe vrste uzoraka u imunokompetentnih osoba sa primarnom i sekundarnom herpetičnom infekcijom bio je u skladu sa dinamikom njihove sinteze tokom infekcije uopšte. Međutim u grupi pacijenata sa AIDS-om, bez obzira što je kod njih bila prisutna rekurentna herpetična infekcija, u određenom broju slučajeva dokazan je pozitivan nalaz anti HSV-1 IgM antitela u serumu odnosno, salivi.

Ključne reči: saliva; anti HSV-1 IgM antitela

Pavlica Dušan

Mikrobiologija i imunologija
Stomatološki fakultet, Beograd

ORIGINALNI RAD (OP)
Stom Glas S, 2002; 49:46-49

Uvod

Infekcija herpes simplex virusom (HSV) široko je rasprostranjena u humanoj populaciji. Ona predstavlja posledicu direktnog kontakta seronegativne osobe sa osobom koja je inficirana ovim virusom i koja aktivno, putem svojih sekreta, a vrlo često je to saliva, luči virus u spoljašnju sredinu. Pri tome su traume, odnosno mikrotraume sluzokože usne duplje tj. usana, ulazna vrata za ovaj virus. Infekcija prouzrokovana sa HSV u najvećem broju slučajeva je inaparentna, a kod 2-5% inficiranih manifestuje se u kliničkoj formi akutnog herpetičnog gingivostomatitisa¹.

Specifična antitela prema HSV imaju zadatak da ograniče infekciju i spreče diseminaciju virusa u okolna tkiva. Već neposredno po primokontaktu virusa i organizma domaćina, u toku prve nedelje bolesti, počinje stvaranje anti HSV IgM antitela koja perzistiraju oko jedan do dva meseca u organizmu domaćina, a potom nestaju². Međutim dostupni literaturni podaci govore i o *de novo* sintezi anti HSV IgM antitela u toku sekundarne, rekurentne HSV infekcije. Dokazivanje prisustva ovih antitela u organizmu domaćina od značaja je u ranoj laboratorijskoj serodijagnozi HSV infekcije.

U rutinskoj praksi kao materijal za serološke reakcije koristi se serum, ali zbog traumatskog iskustva pacijenata, a naročito dece, kao i zbog ostalih negativnih pojava koje prate postupak prikupljanja krvi, odnosno seruma, poslednjih godina čine se naponi u smislu iznalaženja alternativnih uzoraka materijala. Jedan od njih svakako bi mogla biti i saliva koja

zbog niza prednosti može naći svoje mesto u svakodnevnoj, rutinskoj serodijagnostici infekcija lokalizovanih ne samo u orofaringealnoj regiji^{3,4,5}. Osnovni nedostatak ove vrste materijala je niska koncentracija antitela. Međutim ovaj se problem može prevazići upotrebom visoko specifičnih i osetljivijih seroloških testova pomoću kojih, ne samo da je moguće dokazati postojanje specifičnih antitela prema infektivnom agensu, već bi se mogla egzaktno odrediti i njihova koncentracija⁶.

Osnovni zadatak ove studije je određivanje i poređenje nalaza anti HSV IgM antitela u serumu i salivi u toku virusološki potvrđene primarne i sekundarne herpetične infekcije kod imunokompetentnih i imunodeficientnih pacijenata obolelih od sindroma stečene imunodeficijencije (eng. Acquired Immunodeficiency Syndrome - skr. AIDS).

Materijal i metod

Serološki markeri humoralnog imunskog odgovora praćeni su u serumu i salivi u osoba sa klinički i virusološki potvrđenom HSV infekcijom orofaringealne regije. Klinička potvrda HSV infekcije obavljena je na Klinici za oralnu medicinu i parodontologiju, Stomatološkog fakulteta u Beogradu. Virusološka potvrda HSV infekcije izvršena je izolacijom virusa na kulturi VERO ćelija. Shodno svom imunološkom statusu osobe uključene u studiju podeljene su u tri grupe. Prvu grupu je činilo 12 pacijenata, starosne dobi od 4 do 19 godina, sa primarnom herpetičnom infekcijom

koja se klinički manifestovala kao akutni herpetični gingivostomatitis. Ni jedan pripadnik ove grupe nije imao podatke u istoriji bolesti koji bi išli u prilog imunodeficijenciji ili podvrgavanju imunosupresivnoj terapiji. Drugu grupu je činilo 20 imunokompetentnih osoba, starosti od 19 do 65 godina, sa rekurentnom HSV infekcijom orofaringealne regije u kliničkoj formi labijalnog herpesa. Treću grupu je činilo 20 pacijenata sa rekurentnim herpes labijalis-om, starosne dobi između 29 i 60 godina, hospitalizovanih na Klinici za infektivne i tropske bolesti "Dr Kosta Todorović", Medicinskog fakulteta u Beogradu, koji su oboleli od AIDS-a. Pored reaktivacije HSV infekcije orofaringealne regije, pripadnici ove grupe u kliničkoj slici osnovne bolesti imali su i niz drugih oportunističkih infekcija. Podaci o broju CD4+ T limfocita, dobijeni su iz istorija bolesti, a predstavljali su parametar na osnovu koga je praćen stepen oštećenja imuniteta. Taj broj se kretao između 50 i 200 limfocita u 1ml krvi. Prema revidiranoj CDC klasifikaciji iz 1993 god., kliničkog spektra HIV infekcije, svi ispitani pacijenti ove grupe su pripadali kategoriji C3.

Serumi su dobijani iz pune krvi, prikupljane venepunkcijom, a zatim centrifugirane 10 minuta na 3000 obrtaja/minut. Saliva je dobijana na taj način što je svaka osoba uključena u studiju davala 1 - 2ml nestimulisane salive u sterilnu epruvetu. Potom je i ona centrifugirana tokom 10 minuta na 3000 obrtaja/minut, a dobijeni supernatant je odlivan u novu sterilnu epruvetu. Svi uzorci materijala su čuvani na -20°C do upotrebe.

Anti HSV IgM antitela dokazivana su testom indirektno imunofluorescencije. U njegovoj pripremi korišćena je kontinuirana linija VERO ćelija umnožena u prisustvu medijuma (10% inaktivisani goveđi serum) i inficirana laboratorijskim sojem HSV-1. Potom su tako inficirane ćelije nanošene na mikroskopske pločice na 10 predhodno označenih polja. Od uzoraka seruma i salive pravljena su dvostruko rastuća razblaženja počevši od 1/2 do 1/128. Zatim je na svako polje inficiranih ćelija dodavano po 10µl tako razblaženog uzorka materijala. Nakon nanošenja materijala pločice su inkubovane u vlažnoj komori, u termostatu tokom 45 minuta na 37°C, a po isteku tog vremena ispirane su dva puta fosfatnim puferom i jednom destilovanom vodom. U sledećoj fazi na razmazu je dodavano 10µl humanog IgM globulina konjugovanog sa fluorescein izotiocianatom (FITC). Ponovo je sledila inkubacija u vlažnoj komori na 37°C tokom 45 minuta. Po isteku tog vremena pločice su ispirane po predhodno opisanom protokolu, a nakon njihovog sušenja na sobnoj temperaturi, rezultati bojenja su posmatrani pod fluorescentnim mikroskopom.

Rezultati

U svih imunokompetentnih pacijenata sa manifestnom primarnom HSV infekcijom u formi herpetičnog gingivostomatitisa registrovan je pozitivan nalaz serumskih anti HSV-1 IgM antitela. Kod 2 pacijenta (16,7%) titar antitela iznosio je 8, u 7 pacijenata (58,3%) titar serumskih anti HSV-1 IgM antitela bio je 16. Kod 3 osobe (25%) dokazana vrednost titra

ovog izotipa antitela bila je 32. U grupi imunokompetentnih osoba sa rekurentnom herpetičnom infekcijom nije dokazano postojanje serumskih anti HSV-1 IgM antitela. U grupi pacijenata obolelih od AIDS-a koji su pored različitih oportunističkih infekcija imali i rekurentnu herpetičnu infekciju u kliničkoj formi labijalnog herpesa, u 9 osoba dokazan je pozitivan nalaz serumskih anti HSV-1 IgM antitela. Od tog broja kod 8 pacijenata (40%) titar je iznosio 8, a u jednom uzorku seruma (5%) dokazani titar IgM antitela specifičnih prema HSV-1 bio je 16.

Tabela 1. Serumska anti HSV-1 IgM antitela

Table 1. Serum anti HSV-1 IgM antibodies

Titar antitela	I grupa	II grupa	III grupa
/	/	20 (100%)	9 (55%)
8	2 (16,7%)	/	8 (40,0%)
16	7 (58,3%)	/	1 (5,0%)
32	3 (25,0%)	/	/
Ukupno uzoraka	12 (100%)	20 (100%)	20 (100%)

I grupa - Pacijenti sa primarnom HSV infekcijom

II grupa - Imunokompetentni pacijenti sa sekundarnom HSV infekcijom

III grupa - Pacijenti oboleli od AIDS-a sa sekundarnom HSV infekcijom

I group - Patients with primary HSV infection

II grupa - Immunocompetent patients with recurrent HSV infection

III grupa - AIDS patients with HSV infection

Tabela 2. Salivarna anti HSV-1 IgM antitela

Table 2. Salivary anti HSV-1 IgM antibodies

Titar antitela	I grupa	II grupa	III grupa
/	/	20 (100%)	17 (85%)
8	4 (33,3%)	/	3 (15,0%)
16	7 (58,3%)	/	/
32	1 (8,3%)	/	/
Ukupno uzoraka	12 (100%)	20 (100%)	20 (100%)

I grupa - Pacijenti sa primarnom HSV infekcijom

II grupa - Imunokompetentni pacijenti sa sekundarnom HSV infekcijom

III grupa - Pacijenti oboleli od AIDS-a sa sekundarnom HSV infekcijom

I group - Patients with primary HSV infection

II grupa - Immunocompetent patients with recurrent HSV infection

III grupa - AIDS patients with HSV infection

U grupi imunokompetentnih pacijenata sa manifestnom primarnom HSV infekcijom u kliničkoj formi herpetičnog gingivostomatitisa registrovan je pozitivan nalaz anti HSV-1 IgM antitela u svim uzorcima salive. Kod 4 pacijenta (33,3%) titar salivarnih anti HSV-1 IgM antitela iznosio je 8, kod 7 pacijenata (58,3%) ta vrednost je iznosila 16. U I uzorku salive (8,3%) dokazana vrednost titra antitela je iznosila 32. U grupi imunokompetentnih pacijenata sa sekundarnom HSV infekcijom ni u jednom uzorku salive nisu dokazana anti HSV-1 IgM antitela. U trećoj grupi pacijenata,

obolelih od AIDS-a koji su pored različitih oportunističkih infekcija imali i sekundarnu herpetičnu infekciju u kod 3 osobe (15%) dokazana su salivarna anti HSV-1 IgM antitela, a njihov titar iznosio je 8.

Diskusija

Rezultati koji su se odnosili na dinamiku sinteze anti HSV-1 IgM antitela pokazali su da su koncentracije serumskih i salivarnih anti HSV-1 IgM antitela bile pozitivne u svih osoba sa primarnom HSV infekcijom. Za razliku od njih u imunokompetentnih pacijenata sa sekundarnom herpetičnom infekcijom nije dokazano postojanje ovog izotipa antitela specifičnih prema HSV-1 u serumu, odnosno salivi. Ovakav rezultat nalaza antitela u obrađivanim materijalima bio je očekivan i u skladu sa rezultatima iz nama dostupne literature. Poznato je, a i eksperimentalno dokazano, da se u početku primarne infekcije sintetišu antitela klase IgM, a da kasnije, u drugoj nedelji bolesti, počinje sinteza ostalih klasa imunoglobulina. Smatra se da ovaj izotip antitela maksimalnu koncentraciju dostiže posle 1-2 meseca od primokontakta osobe sa određenim infektivnim agensom, a potom dolazi njihov nestanak iz organizma domaćina. Međutim novija istraživanja su pokazala da nastaje njihova *de novo* sinteze prilikom svake sekundarne infekcije^{7,8}.

Rezultati naše studije su takođe ukazali na manju koncentraciju salivarnih anti HSV-1 IgM antitela u odnosu na koncentraciju serumskih. Ovo se može objasniti činjenicom da najveća koncentracija ovih antitela dospeva u usnu duplju, a samim tim i u salivu iz cirkulacije. Međutim ovde se radi o velikom, pentamernom molekulu koji teško i sporo difunduje kroz zidove krvnih sudova, ulazeći pri tom u regiju gingivalnog sulkusa, odakle prelazi u salivu. Neki autori saopštavaju podatke da postoje i sekretorna, monomerna antitela IgM klase i da ona čine oko 10% ukupne količine ove klase imunoglobulina⁹. Iz toga se može zaključiti da prisustvo anti HSV-1 IgM antitela u salivi predstavlja rezultat difuzije ovih antitela kroz epitel gingivalnog sulkusa, ali i njihove lokalne sinteze na nivou tkiva orofaringealne regije. Iako su količine imunoglobulina u salivi nekoliko puta manje nego u serumu korišćenjem vrlo osetljivih i specifičnih seroloških testova moguće je egzaktno utvrditi postojanje kao i koncentraciju specifičnih antitela prema određenom infektivnom agensu. Oliveira i saradnici su u prvoj nedelji infekcije virusom morbilla dokazali pozitivan salivarni IgM odgovor u 93% pacijenata, a već u trećoj nedelji u svim uzorcima salive dokazane su koncentracije specifičnih IgM antitela koje su ukazivale na postojanje infekcije virusom morbilla¹⁰. Do sličnih rezultata isti autor je došao ispitujući mogućnosti korišćenja salive u serodijagnostici denga infekcije kao i infekcije prouzrokovane rubella virusom^{11,12}.

Neočekivani i pomalo začuđujući rezultati dobijeni su u grupi pacijenata obolelih od AIDS-a koji su imali sekundarnu herpetičnu infekciju. Anti HSV-1 IgM antitela su dokazana u gotovo polovine uzoraka seruma, ali i u određenom, manjem procentu obrađenih uzoraka salive. I podaci drugih autora koji su se bavili proučavanjem humoralnog imunskog odgo-

vora u HIV infekciji takođe su pokazali ovu "nelogičnost". Tako Benhamon u svojoj studiji saopštava povišene koncentracije IgM antitela specifičnih prema *Cryptosporidium* sp.¹³, a De Ory dokazuje povećanu koncentraciju specifičnih IgM antitela prema *Toxoplasma gondii* u toku HIV infekcije¹⁴. Baveći se ovom problematikom Quesnel je utvrdio da hipergamaglobulinemija obrnuto korelira sa brojem CD4+T limfocita¹⁵, a odgovor na ovo možda treba tražiti u činjenici da u toku HIV infekcije kao posledica citocidnog delovanja virusa nastaje slabljenje Th1 odgovora uz istovremeno jačanje Th2 imunskog odgovora koji rukovodi specifičnim humoralnim imunitetom. Posledica ovih događanja u toku HIV infekcije je povećana produkcija antitela, među kojima i klase IgM, odnosno nastanak hipergamaglobulinemije¹⁶. Pored toga razlog nastanka hipergamaglobulinemije treba tražiti i u činjenici da ćelije inficirane HIV-om oslobađaju virusni gp120 koji sa jedne strane izaziva inhibiciju CD4+ T limfocita, ali istovremeno prouzrokuje limfoblastnu transformaciju B limfocita, što za posledicu ima povećanu produkciju antitela. Međutim ovde treba naglasiti, a što su Pavlica i saradnici u svojoj studiji ustanovili, ispitujući neutralizacionu aktivnost specifičnih antitela u toku AIDS-a, da antitela stvorena u toku HIV infekcije, specifična prema različitim infektivnim agensima, imaju nisku *in vitro* neutralizacionu moć¹⁷. Posebno treba istaći to da se hipergamaglobulinemija u toku HIV infekcije javlja prema onim infektivnim agensima sa kojima je osoba ranije došla u kontakt, kakav je na primer HSV, dok prema infektivnim agensima sa kojima HIV pozitivna osoba dolazi u kontakt prvi put u toku HIV infekcije nema produkcije specifičnih imunoglobulina¹⁸.

Zaključak

Saliva kao uzorak, poseduje niz prednosti u odnosu na serum. Neke od njih su laka i neinvazivna tehnika njenog prikupljanja, odsustvo potrebe za skupim instrumentima i posebno obučanim kadrom kao i mala mogućnost transmisije infektivnih agenasa putem ovog uzorka materijala. Osnovni nedostatak salive kao uzorka materijala leži u činjenici da neke osobe usled postojanja kserostomije nisu u stanju da daju adekvatnu količinu pljuvačke, dovoljnu za serološka ispitivanja. Pored toga, koncentracije antitela u salivi znatno su niže nego u serumu, tako da se do skora isključivo koristila u epidemiološkim istraživanjima. Međutim primenom vrlo specifičnih i osetljivih seroloških testova moguće je prevazići ovaj problem i odrediti postojanje i koncentraciju specifična antitela u salivi, a to već sada pruža mogućnost njene primene u serodijagnostici pojedinih oboljenja kao zamena serumu.

Komparativnim ispitivanjem seruma i salive prikupljenim od imunokompetentnih pacijenata sa aktivnom HSV infekcijom pokazano je da indukcija humoralnog imunskog odgovora u HSV infekciji odgovara klasičnom imunskom odgovoru u infekciji uopšte. S obzirom da su u serumu i salivi dokazane povećane koncentracije anti HSV-1 IgM antitela serološka dijagnoza infekcija nastalih u toku AIDS-a ima ograničenu primenu.

Literatura

1. Cesario TC, Poland JD, Wulff H, Chin TD, Wener H. Six years experiences with herpes simplex virus in children's home. *J Am Epidemiol*, 1969; 90: 415-417.
2. Brantzaeg P, Fyllanger J, Gjeruldsen ST. Immunoglobulin M local synthesis and selective secretion in patient with immunoglobulin A deficiency. *Science*, 1968; 160: 788-790.
3. Holmstrom P, Sytjainen S, Laine P, Valle SL. HIV antibodies in whole saliva detected by ELISA and Western blot assays. *J Med Virol*, 1990; 732: 245-248.
4. Matsuda S, Oke S, Honda K, Takebe Y, Takemori T. Characteristics of IgA antibodies against HIV in sera and saliva from HIV positive individuals in different clinical stages. *Scand J Immunol*, 1993; 38 (5): 428-434.
5. Ramos J, Arce AY, Santos S.I, Morones M.T, Mendoza J. Antigens and antibodies for HIV type 1 in serum, saliva and gingival fluid in patients with advanced disease. *Int Conf AIDS 1994 Aug 7-12* (abstract NO PB 0348)
6. Parry JV, Perry K, Mortimer PP. Sensitive assay for viral antibodies in saliva an alternative to test on serum. *The Lancet*, 1987; 11: 72-76.
7. Kahlon J, Lakeman FD, Ackerman M. HSV human antibody response to herpes simplex virus specific polypeptides and recurrent infection. *J Clin Microbiol*, 1986; 23(4): 725-730.
8. Nossal GJV. The molecular and cellular antibody response. *Cell*, 1992; 68: 1-2.
9. Brantzaeg P. Humman secretory immunoglobulins. Salivary secretions from individuals with selectively excessive of defective synthesis of serum immunoglobulins. *Clin Exp Immunol*, 1971; 8: 66-70.
10. Oliveira S, Siqueira MM, Brown DW, Camacho LA, Faillace T. Salivary diagnosis of measles for surveillance: a clinic-based study in Niteroi state of Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1998; 92 (6): 636-638.
11. Oliveira SA, Rodrigues CV, Camacho LA. Diagnosis of dengue infection by detecting specific IgM antibodies in saliva samples. *J Virol Methods*, 1999; 77 (1): 81-86.
12. Oliveira SA, Siquera MM, Brown DW, Camacho LA, Castro ST. Diagnosis of rubella infection by detecting specific IgM in saliva samples: a clinic-based study in Niteroi, RJ, Brazil *Rev Soc Bras Med Trop*, 2000; 33 (4): 335-339.
13. Bechman MF, Kalinke U, Althage A, Freer G, Burkhardt C, Root H, Agnet M. The role of antibody concentration and avidity in antiviral protection. *Science*, 1997; 276 (5321): 2024-2027.
14. De Ory F, Carlos JD. Application of fluoroimmunoassay to the identification of low avidity specific IgG against pathogenic human virusis and *Toxoplasma gondii*. *Clin and Diagn Vir*, 1995; 3: 323-332.
15. Quesnel A, Moja P, Lucht F. Is there IgA of gut mucosal origin in the serum of HIV-1 infected patients? *Gut*, 1994; 35 (6): 803-808.
16. Cherici M, Sherer GM. Th1-Th2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunol Today*, 1993; 4: 107-111.
17. Pavlica D. Lokalni i sistemski humoralni imunski status kod pacijenata sa herpes simplex virusanom infekcijom orofaringealne regije. Doktorska teza, Medicinski fakultet, Beograd, 2000; str.111.
18. Scully C. *Samaranayake L*. Clinical virology in oral medicine and dentistry. Cambridge university press, 1992; page 184.

POSSIBILITY OF SALIVA USE IN DETECTING ANTI HSV IGM ANTIBODIES

SUMMARY

In this study we investigated the possibility of saliva use instead of sera for detecting anti HSV IgM antibodies. Three groups of patients were included in this study. The first two consisted of immunocompetent persons with clinically and virologically approved primary and recurrent herpetic infection. The third group was comprised of AIDS patients with recurrent infection. Anti HSV-1 IgM antibodies were detected by immunofluorescence assay. In saliva and sera samples obtained from persons with primary and recurrent HSV infection, findings of specific IgM antibodies correlated with the dynamic of their synthesis in infection generally. But in the third group, which consisted of AIDS patients, in a few cases there were positive anti HSV IgM concentration, both in sera and saliva samples.

Key words: saliva, anti HSV IgM antibodies

Pavlica Dušan

Address for correspondence

Faculty of Stomatology,
Microbiology and immunology
Dr. Subotića 1,
11000 Belgrade