

## **Значение лабораторных маркеров активной репликации цитомегаловируса у ВИЧ-инфицированных беременных женщин при оценке риска врожденной и внутриутробной ЦМВ-инфекции**

**«Акушерство и гинекология», 2005. — № 2. — С. 24-29.**

*Шахгильдян В. И., Шипулина О. Ю., Сильц В. В., Шамшурина М. К., Серебровская Л. В., Каражас Н. В., Евсеева Л. Ф., Звонарев А. Ю., Баранова Е. Б., Калинина Н. А., Коростылев А. В.*

**Федеральный научно-методический центр профилактики и борьбы со СПИДом МЗРФ;**

**Московский городской центр СПИДа Департамента здравоохранения г. Москвы Инфекционная клиническая больница №2 г. Москвы;**

**НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи РАМН;**

**ФГУП НПО «Микроген» МЗ РФ, г. Москва**

Внутриутробное инфицирование плода — важная проблема современного акушерства. В структуре перинатальной смертности внутриутробная инфекция составляет от 2 до 65.6% случаев [7]. Цитомегаловирусная инфекция (ЦМВИ) является наиболее частой врожденной вирусной патологией и служит основной причиной врожденных пороков, задержки психического и умственного развития у детей раннего возраста, не имеющих хромосомных нарушений [17]. ЦМВИ — главная причина врожденной сенсорноневральной потери слуха [17, 22]. В США ежегодно регистрируются не менее 7000 пациентов с неврологическими нарушениями цитомегаловирусной этиологии [13]. В различных странах мира частота внутриутробного заражения плода цитомегаловирусом (ЦМВ) колеблется от 0.3% до 3% [6, 11, 17, 21]. В России данный показатель составляет 1% — 2.8% [3, 4, 5, 10]. Заражение цитомегаловирусом плода может привести к его гибели, самопроизвольным выкидышам, порокам развития, мертворождению [6, 9, 12]. При развитии у матери во время беременности острой ЦМВИ, инфицированные младенцы в 10% — 15% случаях имеют клинически выраженную патологию [18, 22]. Более чем в половине случаев отмечается гепатоспленомегалия, желтуха и петехии в сочетании с повышением активности АЛТ, концентрации прямого билирубина, тромбоцитопенией [5, 22]. Характерны гипотрофия, недоношенность, не редки тяжелые поражения головного мозга (микроцефалия, гидроцефалия, судорожный синдром, заторможенность, слабый сосательный рефлекс), а также генерализованное поражение органов с развитием шока, ДВС-синдрома с риском летального исхода до 11 — 20% в первые 6 недель жизни ребенка [3, 6, 9, 10, 22]. У большинства выживших детей с клиническими проявлениями ЦМВИ и у 5 — 15% инфицированных детей, не имеющих при рождении признаков заболевания, развиваются поздние осложнения врожденной цитомегалии, проявляющиеся в виде задержки физического и умственного развития, судорожных расстройств, сенсорноневральной глухоты, хориоретинита с возможной атрофией зрительного нерва [3, 10, 20, 22].

Проблема внутриутробной патологии у ВИЧ-инфицированных беременных женщин становится все более актуальной. В России показатель выявляемости ВИЧ-инфекции среди беременных женщин увеличился в 2002 г., по сравнению с 1998 г., в 22 раза, а по сравнению с 1995 г. — в 573 раза [1, 2]. Распространенность ВИЧ-инфекции среди беременных женщин в настоящее время составляет 0.1% [8].

Ежегодно в нашей стране увеличивается число детей, рожденных ВИЧ-инфицированными матерями. Если в общей структуре факторов риска ВИЧ-инфекции в 1999 г. доля детей с риском перинатального заражения составляла 1.7%, то в 2003 г. — 16.4% [1, 2, 8]. Половина (55.3%) от общего количества российских детей, матери которых страдали ВИЧ-инфекцией, появилась на свет в 2002 году [8]. Благодаря широкому применению схем лекарственной профилактики вертикальной передачи ВИЧ частота

передачи вируса от матери к ребенку снизилась с 30 — 40% до 1 — 2% [2]. В то же время сохраняет свою остроту вопрос об иных внутриутробных инфекциях, которые могут поражать плод и новорожденного у ВИЧ-инфицированной матери. Согласно результатам зарубежных исследований [15, 16], частота трансплацентарного заражения ЦМВ существенно выше у младенцев, рожденных ВИЧ-инфицированными матерями, по сравнению с новорожденными, матери которых были ВИЧ-серонегативны. Возможно, ЦМВ является фактором, влияющим на передачу ВИЧ от матери к ребенку [14, 19]. При этом у детей, инфицированных как ВИЧ, так и ЦМВ, отмечалась более глубокая иммуносупрессия и более быстрое прогрессирование ВИЧ-инфекции [18]. В 2002 г. в Москве умерли 7 детей, инфицированных ВИЧ, из них три ребенка страдали ЦМВИ.

Согласно выше изложенному, ребенок, рожденный ВИЧ-инфицированной матерью, должен быть защищен не только от внутриутробной передачи ВИЧ, но и от иных врожденных инфекций (в частности ЦМВИ), которые могут служить причиной его болезни и гибели. В то же время вопрос о достоверных лабораторных критериях высокого риска заражения цитомегаловирусом ребенка в период его внутриутробного развития остается открытым. Цель нашей работы состояла в определении значения различных специфических лабораторных признаков активной репликации цитомегаловируса у беременных ВИЧ-инфицированных женщин в качестве прогностических маркеров врожденной и внутриутробной ЦМВ-инфекции.

#### **Материалы и методы**

С 2000 по 2002 гг. под наблюдением находились 130 беременных ВИЧ-инфицированных женщин и 128 рожденных ими детей. Женщины наблюдались в МГЦ СПИД (руководитель центра Мазус А. И.), родовспоможение осуществляли в родильном доме ИКБ №2 (главный врач роддома Крахмалова Т. А., главный врач больницы Мясников В. А.). Возраст женщин был от 16 до 32 лет; средний возраст составил 21.9 + 2.3 года. Половина пациенток инфицировалась ВИЧ половым путем, 47% — при использовании внутривенных наркотических препаратов. Диагноз ВИЧ-инфекции был подтвержден обнаружением в сыворотке крови специфических антител к ВИЧ методами ИФА и иммунного блотинга. В соответствии с клинической классификацией В. И. Покровского, у 127 женщин была диагностирована ВИЧ-инфекция в стадии первичных проявлений (ПБ-В), 3 человек имели стадию вторичных заболеваний ША. Ни в одном случае не был поставлен диагноз СПИДа. Химиопрофилактика вертикальной передачи ВИЧ проводилась всем женщинам и новорожденным, согласно протоколу РАСТГ 076, с применением тимазиды и ретровира.

У большинства женщин беременность протекала без существенных патологических отклонений. В 2 случаях имел место спонтанный аборт и внутриутробная гибель плода. Роды у женщин проходили естественным путем, лишь в 3 случаях было осуществлено кесарево сечение. Среди наблюдавшихся 128 новорожденных 18 (14.1%) родились недоношенными, в большинстве случаев с признаками внутриутробной гипотрофии. Все дети находились на искусственном вскармливании.

Каждое обследование беременной женщины и ее новорожденного ребенка включало исследование крови на наличие антител к ЦМВ классов IgM и IgG (с определением титров и индекса avidности), анти-ЦМВ IgG к ранним вирусным белкам, определение цитомегаловируса в моче, ДНК ЦМВ в слюне, моче и крови. У 30 женщин был исследован на наличие ДНК ЦМВ материал, полученный при соскобе из цервикального канала. Большинство женщин (86) прошли обследование однократно, 33 человека — двукратно, 11 — трехкратно (в каждом триместре беременности). Новорожденные были обследованы в возрасте одной недели и одного месяца.

Серологические исследования осуществляли методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческих диагностических наборов («DSL» USA, «ВекторЦМВ-IgG-стрип» ЗАО «Вектор-Бест», «ЦМВ-Диагност» ЗАО «Биосервис», «ЦМВ-Контроль» ПКБ им. И. И. Мечникова«РФ) согласно инструкциям, прилагаемым к ним.

Обнаружение цитомегаловируса в моче пациентов проводили путем изоляции ЦМВ на зараженной чувствительной клеточной культуре. Идентификация вируса была основана на характерном цитопатическом эффекте и на определении ЦМВ-антигенов методом НРИФ (ГУ НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи).

Качественное определение ДНК ЦМВ в цельной крови выполняли с помощью ПЦР-тест-системы «АмплиСенс Цитомегаловирус-500/ВКО» ЦНИИЭ МЗ РФ. Аналитическая чувствительность «АмплиСенс ПЦР-тест-системы» составляла 500 копий ДНК ЦМВ в 1 мл цельной крови. Наличие ДНК ЦМВ в слюне, моче, соскобах из цервикального канала определяли методом ПЦР с помощью тест-систем производства ЦНИИ эпидемиологии МЗ РФ.

Среди показателей системы иммунитета определяли количество CD4+ и CD8+ — лимфоцитов с использованием моноклональных антител фирмы «Becton Diskinsan, USA» методом проточной цитофлюорометрии.

Используемые термины. Врожденная ЦМВИ — инфицирование плода в антенатальном периоде развития [5, 10, 12]. Подтверждением диагноза служило выявление ДНК ЦМВ в крови или моче ребенка в первые 7 дней его жизни. Внутриутробная ЦМВИ — инфицирование плода в позднем антенатальном или интранатальном периодах [5, 10, 12]. Диагноз ставился при первом обнаружении ДНК ЦМВ в крови или моче ребенка в возрасте одного месяца.

Положительное и отрицательное прогностические значения лабораторного маркера активности ЦМВ как фактора риска врожденной ЦМВИ определяли следующим образом. Согласно полученным данным, обследуемые женщины были распределены в одну из четырех возможных групп, в зависимости от отрицательного или положительного значения лабораторного признака, а также наличия или отсутствия врожденной ЦМВИ у родившегося ребенка. Соответственно, по каждому лабораторному параметру были составлены следующие группы:

- с «истинно-положительным» (ИП) в отношении диагноза ЦМВ-инфекции значением маркера, когда присутствовал и лабораторный маркер у беременной женщины, и врожденная ЦМВИ у ребенка;
- с «ложноположительным» значением (ЛП), когда имелся лабораторный маркер, но отсутствовала врожденная ЦМВИ;
- с «истинно-отрицательным» значением (ИО), когда отсутствовали и лабораторный маркер, и врожденная ЦМВИ;
- с «ложноотрицательным» значением (ЛО), когда не было выявлено лабораторного маркера, но имелась врожденная ЦМВИ.

Положительное прогностическое значение лабораторного признака определяли согласно формуле  $100\% \times \text{ИП}/(\text{ИП}+\text{ЛО})$ ; отрицательное прогностическое значение — по формуле  $100\% \times \text{ИО}/(\text{ИО}+\text{ЛП})$ . Аналогично рассчитывались прогностические значения лабораторных признаков для внутриутробной ЦМВИ.

#### **Результаты и обсуждение**

Подавляющее большинство (96.9%) обследованных женщин имело в крови анти-ЦМВ IgG. Лишь 4 человека (3.1%) были серонегативны. Титры антител класса IgG у 96% лиц были низкими (менее 1:1000), 4 человека имели высокие титры (от 1:1500 до 1:3000), в 1 случае зафиксирован показатель 1:10000. Лишь у одной женщины за время беременности отмечено повышение титров антител более чем в 4 раза. В 94.6% случаев были выявлены высокоавидные противцитомегаловирусные иммуноглобулины класса G. Только у 7 человек (5.4%) анти-ЦМВ IgG имели низкую степень активности, что могло свидетельствовать о сравнительно недавнем инфицировании вирусом. Ранние антитела класса IgG к ЦМВ выявили у 16 (12.3%) пациенток.

Специфические антитела класса IgM были обнаружены только в 2 случаях (1.5%), причем у обеих женщин определяли и иммуноглобулины класса G, что предполагало не первичное заражение ЦМВ, а его реактивацию или реинфекцию.

Цитомегаловирус присутствовал в моче у 19 (14.6%) беременных женщин.

ДНК ЦМВ была выявлена в слюне у 32 (24.6%) женщин, в моче — у 24 (18.5%), в крови — у 12 (9.2%). Реактивизация ЦМВ, как и повторное инфицирование вирусом могут иметь место на любых сроках беременности. В связи с этим, вероятность выявления ДНК ЦМВ в биологических жидкостях (прежде всего, в моче и крови) зависела от кратности обследования и была выше при повторении исследования в следующем триместре беременности. Так, при первичном анализе наличие ДНК ЦМВ в слюне было установлено у 30 женщин, при повторном исследовании — дополнительно лишь у двух пациенток. Напротив, при очередном обследовании 44 пациенток ДНК ЦМВ в моче и крови была выявлена, соответственно, еще у 10 и 3, помимо четырнадцати и девяти, имевших положительный результат при начальном скрининге.

Согласно результатам проведенных 190 комплексных исследований слюны, мочи и крови на наличие в них ДНК ЦМВ, в подавляющем большинстве случаев ДНК ЦМВ не была обнаружена ни в одной биологической жидкости (132) или присутствовала лишь в слюне (26). В 16 исследованиях ДНК ЦМВ была выявлена только в моче, в 5 — только в крови, в 11 случаях — в обеих биологических жидкостях.

Корреляции между наличием в крови иммуноглобулинов класса М, низкоавидных специфических IgG антител, высоких титров анти-ЦМВ IgG, ранних IgG к ЦМВ, присутствием цитомегаловируса в моче в нашем исследовании не установлено. Не выявлено и корреляции между серологическими маркерами и наличием ДНК ЦМВ в слюне, моче или крови беременных женщин.

В материалах соскобов из цервикального канала ДНК ЦМВ выявили у 10 из 30 обследованных женщин (33.3% случаев). Высокая частота обнаружения ЦМВ в биопсийном материале у ВИЧ-инфицированных беременных женщин свидетельствует о значительном риске заражения их детей цитомегаловирусом во время родов.

Результаты параллельных 30 исследований на присутствие ДНК вируса в моче и соскобах из цервикального канала совпали лишь у половины пациентов: 5 случаев — идентичный положительный ответ, 11 — отрицательный. У 5 женщин ДНК ЦМВ была выявлена только в моче, у 9 — только в биопсийном материале.

Анализ иммунограмм инфицированных ВИЧ беременных женщин не выявил выраженных изменений показателей клеточного звена иммунной системы. Снижение числа Т-хелперов/индукторов (CD4+-лимфоцитов) не было значительным и, в среднем, составило  $790 + 350$  кл/мм<sup>3</sup> (при норме 600 — 1900 кл/мм<sup>3</sup>). Уменьшение количества CD4 клеток менее 350 в мм<sup>3</sup> зафиксировано лишь у 5.5% женщин. Глубокой иммуносупрессии с уровнем CD4-лимфоцитов менее 200 кл/мм<sup>3</sup> не зафиксировано ни в одном случае. Средняя величина относительного количества CD4-клеток составила  $32.5 + 4.2\%$  (при норме 35 — 65%). Содержание Т-супрессоров (CD8+-лимфоцитов) было умеренно повышено как в абсолютном ( $950 + 70$  кл/мм<sup>3</sup>, при норме 300 — 800 кл/мм<sup>3</sup>), так и в процентном ( $38.5 + 6.3\%$ , при норме 12 — 30%) отношениях. Соотношение CD4/CD8 составило  $0.95 + 0.14$  (норма — более 1). Нами не отмечена корреляция между степенью выраженности изменений в иммунной системе и наличием активной ЦМВИ (присутствием ДНК ЦМВ в крови). Отсутствие выраженных иммунологических нарушений у наблюдаемых женщин, позволяет в определенной степени экстраполировать изложенные ниже результаты работы на контингент женщин, не инфицированных ВИЧ.

Факт трансплацентарного инфицирования ЦМВ плода был доказан в 11 случаях: самопроизвольное прерывание беременности на ранних сроках (1), гибель плода (1) (с обнаружением ДНК ЦМВ в аутопсийных материалах), выявление ДНК ЦМВ в крови или моче на 1-й неделе жизни ребенка (9 детей). Соответственно, врожденная ЦМВИ диагностирована в 8.5% случаев. Антенатальное инфицирование плода установлено у 21.9% женщин, имевших ДНК ЦМВ в слюне, 29.2% женщин с ДНК ЦМВ в моче и 58.3% женщин с наличием ДНК ЦМВ в лейкоцитах крови. Отметим, что заражения

плода не было ни у одной женщины с наличием ДНК ЦМВ лишь в слюне, но имело место в случаях содержания ДНК ЦМВ только в моче или только в крови.

Среди 9 новорожденных, инфицированных ЦМВ в период внутриутробного развития, один ребенок был недоношенным, родившимся на сроке 29 недели беременности, трое имели признаки гипотрофии 1 — 2 степени. В 8 случаях диагностирована внутриутробная гипоксия, чаще проявляющаяся синдромом возбуждения, в 2 случаях имел место синдром дыхательных расстройств, у 2 детей — общий отечный синдром. Состояние трех младенцев расценивалось по шкале Апгар менее 6 баллов. В первые сутки после рождения 4 ребенка имели тяжелое состояние, четверо — средней тяжести.

Положительное и отрицательное значения лабораторных признаков активной репликации ЦМВ как факторов риска врожденной ЦМВИ показаны в таблице 1. Как следует из представленных данных, отрицательное прогностическое значение различных лабораторных маркеров ЦМВИ было высоким. Так риск трансплацентарного заражения плода ЦМВ составил менее 4%, если мать не имела в крови или моче ДНК вируса. Вместе с тем, положительное прогностическое значение таких широко используемых в практическом здравоохранении лабораторных критериев, как низкоавидные противоцитомегаловирусные иммуноглобулины класса G, высокие титры анти-ЦМВ IgG, присутствие ЦМВ в слюне или моче для определения риска заражения плода цитомегаловирусом, оказалось низким. Умеренную прогностическую ценность несет обнаружение специфических антител класса IgM. Наиболее высокое положительное прогностическое значение имело наличие ДНК ЦМВ в крови. Почти 60% женщин с наличием в крови ДНК ЦМВ родили инфицированных цитомегаловирусом детей.

У 7 младенцев с отрицательными результатами анализов на первой неделе жизни ДНК ЦМВ была выявлена в крови и/или моче в возрасте одного месяца. Учитывая, что дети находились на искусственном вскармливании и им не проводили трансфузии крови и ее препаратов, наиболее вероятно их инфицирование в интранатальном периоде, а не на раннем неонатальном (первые 7 суток жизни) периоде. Следовательно, из 18 случаев внутриутробной ЦМВ-инфекции антенатальное заражение имело место в 11 (61%), интранатальное — в 7 (39%). Частота внутриутробной ЦМВИ составила 13.8%. Внутриутробная ЦМВИ диагностирована у детей одиннадцати из 32 женщин с наличием ДНК ЦМВ в слюне (34.4%), десяти из 24 женщин с ДНК ЦМВ в моче (41.7%) и десяти из 12 женщин с наличием ДНК ЦМВ в цельной крови (83.3%).

Положительное и отрицательное значения лабораторных маркеров активной репликации вируса как факторов риска внутриутробной ЦМВИ показаны в таблице 2. Как и в случае врожденной ЦМВИ, при внутриутробной инфекции отрицательное прогностическое значение различных специфических лабораторных маркеров как факторов риска заражения ЦМВ ребенка в период внутриутробного развития или во время родов достаточно высокое, а положительное прогностическое значение таких лабораторных показателей, как наличие антител класса IgM к ЦМВ, низкоавидных противоцитомегаловирусных иммуноглобулинов класса G, ранних анти-ЦМВ IgG, повышение титров IgG, присутствие цитомегаловируса или ДНК ЦМВ в слюне или моче, — низкое.

Высокое положительное (83.3%) и наиболее высокое отрицательное (93.2%) значение для определения риска внутриутробной ЦМВИ имело определение ДНК ЦМВ в крови ВИЧ-инфицированной беременной женщины. Данные результаты свидетельствуют о серьезном риске заражения цитомегаловирусом ребенка в случае обнаружения ДНК ЦМВ в крови у матери. Указанный факт подтверждается и рядом последних зарубежных публикаций [17, 21]. Необходимо отметить, что исследование на наличие ДНК ЦМВ в крови особенно важно для ВИЧ-инфицированных беременных женщин, у которых не рекомендовано проведение амниоцентеза и кордоцентеза по причине высокого риска инфицирования плода вирусом иммунодефицита человека.

Для повышения значимости обнаружения ДНК ЦМВ в крови как фактора риска заражения ЦМВ плода и новорожденного необходимо проводить количественную оценку содержания ДНК вируса в крови беременной женщины. Определение концентрации ДНК ЦМВ в биологических материалах (прежде всего в крови), возможно, является ключом к разрешению многих вопросов, касающихся врожденной ЦМВИ не только у ВИЧ-инфицированных, но и ВИЧ-серонегативных беременных женщин.

Наличие ДНК ЦМВ в крови беременной женщины является признаком высокой активности инфекционного процесса. По-видимому, именно тем беременным женщинам, у которых обнаруживается вирус в крови, необходимо проводить иммунопрофилактическую терапию иммуноглобулином с высоким содержанием противоцитомегаловирусных антител (так называемым «гипериммуноглобулином») для предотвращения трансплацентарной передачи цитомегаловируса или для смягчения последствий, если заражение вирусом плода уже произошло.

#### **Выводы**

*1. Абсолютное большинство (96.9%) ВИЧ-инфицированных беременных женщин имеет антитела класса IgG к цитомегаловирусу.*

*2. Для беременных ВИЧ-инфицированных женщин характерна высокая частота выявления лабораторных признаков активной репликации цитомегаловируса (присутствие ДНК ЦМВ в крови — в 9.2% случаев). Значительна частота обнаружения ДНК ЦМВ в материалах соскобов из цервикального канала — 33.3% случаев.*

*3. Врожденная цитомегаловирусная инфекция у детей ВИЧ-инфицированных матерей имеет место значительно чаще (8.5% случаев), по сравнению с младенцами, матери которых не страдают ВИЧ-инфекцией. Внутриутробная ЦМВ-инфекция была диагностирована у 13.8% детей.*

*4. Выявление методом ПЦР ДНК ЦМВ в крови ВИЧ-инфицированной беременной женщины является достоверным признаком активной репликации ЦМВ и служит маркером высокого риска антенатального и интранатального заражения данным вирусом ребенка. Исследование крови и мочи женщин на наличие ДНК ЦМВ следует проводить в каждом триместре беременности.*