

**ЛЕГОТИНА НАТАЛЬЯ СЕРГЕЕВНА**

**ОПТИМИЗАЦИЯ ДИАГНОСТИКИ И ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ  
ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКОЙ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ  
У ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА**

14.01.08 – педиатрия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Пермь – 2016

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России)

**Научный руководитель**

доктор медицинских наук, профессор

**Львова Ирина Иосифовна**

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук, профессор,  
заведующий кафедрой инфекционных  
болезней и клинической иммунологии  
ФГБОУ ВО «Уральский  
государственный медицинский  
университет» Минздрава России

**Сабитов Алебай Усманович**

доктор медицинских наук, профессор,  
главный научный сотрудник  
лаборатории иммунологии воспаления  
ФГБУН Институт иммунологии и  
физиологии УрО РАН

**Тузанкина Ирина Александровна**

**Ведущая организация:** федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ижевская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится 15 декабря 2016 г. в 9:00 на заседании диссертационного совета Д 208.067.02 при ФГБОУ ВО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России, г. Пермь, 614000, ул. Петропавловская, 26.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России, г. Пермь, 614000, ул. Петропавловская, 26 и на сайтах [www.psma.ru](http://www.psma.ru) и [www.vak.ed.gov.ru](http://www.vak.ed.gov.ru).

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2016г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

**Минаева Наталия Витальевна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** Особенностью современной патологии детей раннего возраста является широкая распространённость инфекций герпесвирусной группы, которые способны активироваться на фоне нарушения иммунной защиты, оказывая при этом дополнительное иммуносупрессивное действие и вызывая общую сенсibilизацию организма. Цитомегаловирусная инфекция (ЦМВИ) вызывается условно патогенными внутриклеточными  $\beta$ -герпесвирусами человека 5 типа (HHV-5), является самой распространенной оппортунистической инфекцией с вертикальной трансмиссией в 95% случаев, занимает второе место после ВИЧ по иммунодепрессивной активности и выявляется в 67,3% тяжёлых форм внутриутробных инфекций (ВУИ) с полиорганными поражениями [Краснов В.В., 2006; Schleiss M.R., 2009; Симованьян Э.Н., 2011; Новиков М.Ю., 2011; Сабитов А.У., 2013; Исаков В.А., 2013; Щербак В.А. и соавт., 2013; Albanna E.E., 2013].

К полиорганности поражений приводит способность вирусов цитомегалии к активной репликации во всех органах и тканях организма ребенка при активации и реактивации инфекционного процесса на фоне возникшей иммуносупрессии [Романцов М.Г. и соавт., 2010; Санталова Г.В. и соавт., 2013; Любошенко Т.М. и соавт., 2014]. Прогрессирующая иммунная недостаточность замыкает круг патологических реакций формированием хронической формы болезни. Клинические проявления хронической ЦМВИ у амбулаторных пациентов неспецифичны и представлены иммунопатологическими синдромами: самым распространенным – синдромом нарушения противоинфекционной защиты (СНПЗ) или инфекционным, а также аллергическим, лимфопролиферативным и реже аутоиммунным, и их сочетаниями [Тузанкина И.А., 2008; Долгих Т.И. и соавт., 2011; Савенкова М.С., 2016]. В Пермском крае частота встречаемости хронической формы цитомегалии - клинического маркера СНПЗ среди детей раннего возраста из-за характерной для них незрелости и функциональной нестабильности иммунной системы достигает 24,6% [Львова И.И., 2006]. К группе высокого риска активации латентной или реактивации хронической ЦМВИ относятся дети раннего возраста из группы часто болеющих детей (ЧБД), численность которой колеблется в различных регионах России от 7 до 75% [Баранов А.А., Альбицкий В.Ю., 2003; Минаева Н.В., 2011; Бабаченко И.В., 2012].

Диагностика и оценка эффективности терапии хронической ЦМВИ у детей раннего возраста в амбулаторных условиях нуждается в научно обоснованной оптимизации, что и определяет актуальность исследования.

Неблагоприятные отдаленные последствия, широкая распространенность бессимптомных форм при латентном течении инфекции, множество путей передачи, отсутствие вакцинопрофилактики послужили основанием для включения ЦМВИ Европейским бюро ВОЗ в группу заболеваний, определяющих будущее инфекционной патологии в XXI веке [Симованьян Э.Н., 2011].

В настоящее время для лабораторной верификации ЦМВИ используются следующие методы: вирусологический – «золотой» стандарт диагностики, но дорогой и трудоёмкий; цитологический с крайне низкой чувствительностью; иммуноферментный анализ (ИФА): IgM, IgG и индекс avidности IgG (ИА%) – косвенный; полимеразная цепная реакция (ПЦР)

для амплификации ДНК качественным и количественным способом в реальном времени – прямой метод исследования. Каждый метод имеет определённое научно-практическое значение. Однако, благодаря высокой специфичности и чувствительности ПЦР осуществляется детекция ДНК ЦМВ с определением количества в органах, тканях, биологических жидкостях, таких как слюна и моча, что позволяет установить этиологический диагноз неинвазивным методом, наиболее приемлемым в педиатрической практике [Vincent E., 2007; Куш А.А., 2009; Долгих Т.И. и соавт., 2011; Hayden R.T., 2013].

Оптимизация диагностики и оценки эффективности терапии хронической ЦМВИ у детей раннего возраста в амбулаторных условиях может базироваться на применении неинвазивной количественной детекции ДНК ЦМВ в слюне и моче (количество копий/мл) методом ПЦР. Информативный, быстрый и точный способ определения уровня вирусывыделения может быть использован как для оценки интенсивности вирусной репликации в динамике, так и для оценки эффективности базисной терапии ЦМВИ.

Данные о научных исследованиях по сопоставлению интенсивности вирусывыделения с клинико-лабораторными показателями при хронической ЦМВИ у иммунокомпromетированных амбулаторных пациентов раннего возраста отсутствуют.

Следовательно, совершенствование диагностики хронической ЦМВИ у детей раннего возраста и оценки эффективности терапии является актуальным, а внедрение разработанной технологии в педиатрическую практику необходимым.

#### **Степень разработанности темы исследования**

Сведения об оптимизации диагностики и оценки эффективности терапии хронической ЦМВИ у детей раннего возраста в амбулаторных условиях отсутствуют.

#### **Цель исследования**

Оптимизировать диагностику и оценку эффективности терапии хронической цитомегаловирусной инфекции в фазе реактивации у ЧБД в возрасте 1-3 лет с помощью контроля динамики уровня вирусывыделения методом количественной ПЦР в реальном времени.

#### **Задачи исследования**

1. Проанализировать особенности регистрации цитомегаловирусной инфекции у детей раннего возраста на уровне первичной медико-санитарной помощи.
2. Провести ранжирование уровня вирусной нагрузки по результатам количественного метода ПЦР для оценки реактивации хронической ЦМВИ и сопоставить с серологическими методами диагностики и клиническими данными.
3. Разработать методику применения количественного определения вирусной нагрузки методом ПЦР для оценки эффективности терапии реактивации хронической ЦМВИ у детей раннего возраста в амбулаторных условиях.

### **Научная новизна и теоретическая значимость исследования**

Определен характер современных клинико-лабораторных проявлений реактивации хронической ЦМВИ у детей раннего возраста из группы ЧБД; впервые проведено ранжирование уровня вирусовыделения ДНК ЦМВ при реактивации хронической ЦМВИ и сопоставление его с клиническими и традиционными лабораторными диагностическими тестами; дано научное обоснование объективного контроля терапии на основании количественного определения уровня вирусовыделения ДНК ЦМВ.

### **Практическая значимость работы**

Разработка и внедрение в амбулаторную практику количественного определения уровня вирусовыделения ДНК ЦМВ в ПЦР для контроля терапии на основании ранжированной вирусной нагрузки с учетом анализа клинико-эпидемиологических факторов риска позволит оптимизировать диагностику, лечение и оценку эффективности терапии реактивации хронической цитомегаловирусной инфекции у ЧБД раннего возраста.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. У ЧБД раннего возраста с реактивацией хронической ЦМВИ количественный не инвазивный метод определения уровня ВН в ПЦР из слюны и мочи отражает степень репликативной активности ЦМВИ и может использоваться для оценки тяжести инфекционного процесса и контроля эффективности проводимой терапии.
2. Наиболее информативной средой для скринингового обследования при реактивации хронической ЦМВИ является слюна с чувствительностью метода (Se) 95,0%, специфичности (Sp) - 74,0%, наименее информативной – кровь, с детекцией вируса цитомегалии лишь в 2,6% случаев.
3. Показатели уровня ВН, соответствующие реактивации хронической ЦМВИ для среды «слюна»  $> 3,931g$  (Se =0,93, Sp=1,0) копий/мл, для среды «моча»  $> 3,11g$  (Se=0,72, Sp=0,83) копий/мл.

### **Внедрение результатов работы**

Результаты исследования внедрены в работу участковой педиатрической службы ГБУЗ ПК «ДКБ имени П.И. Пичугина», в учебный процесс на кафедре детских инфекционных болезней и на кафедре клинической лабораторной диагностики ФДПО ФГБОУ ВО Пермского государственного медицинского университета им. академика Е.А. Вагнера Министерства здравоохранения Российской Федерации.

### **Апробация работы**

Материалы диссертации доложены на 87-й итоговой научной конференции ПГМА (Пермь, 2013) на английском языке; на Всесоюзной конференции по проблемам пульмонологии у детей (Пермь, 2013); на конференциях инфекционистов Пермского края по проблемам герпесвирусных инфекций у детей и особенностям их вакцинопрофилактики (Пермь, 2013; 2014); на городской конференции по проблемам лабораторной оценки эффективности терапии оппортунистических инфекций у детей (Пермь, 2014); на XIII Конгрессе детских инфекционистов России «Актуальные вопросы

инфекционной патологии и вакцинопрофилактики у детей» (Москва, 2014); на краевой конференции инфекционистов «Актуальные вопросы инфекционной патологии» (Пермь, 2015).

Апробация работы проведена на межкафедральном заседании сотрудников кафедр педиатрического профиля 27.06.2016г.

### **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 9 научных работ, в том числе 4 в журналах, рекомендованных ВАК РФ, 2 - в журналах, входящих в базу Scopus.

Получен патент на изобретение: Способ оценки эффективности терапии хронической цитомегаловирусной инфекции у детей: пат. 2566074 Рос. Федерация: МКП<sup>8</sup> G 01 N 33/35 / Леготина Н.С., Львова И.И., Дерюшева А.В.; заявитель и патентообладатель ГБОУ ВПО Пермская государственная медицинская академия имени академика Е.А. Вагнера Минздрава России. – № 2014143038/15, заявл. 24.10.14, опубл. 20.10.15, Бюл. №29. – 6 с.

### **Личный вклад автора**

Автором самостоятельно проводилось: планирование и организация исследования; анализ данных официальной статистики по ПК и РФ и первичной медицинской документации; клиническое обследование в динамике; анализ параклинических результатов обследования; беседы с родителями; назначение иммунотерапии и контроль за ее фактическим выполнением; оценка эффективности терапии; анализ полученных данных; статистическая обработка материалов исследования; внедрение результатов исследования.

### **Объем и структура работы**

Диссертационная работа изложена на 150 страницах печатного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 3 глав собственных исследований, заключения, выводов, списка литературы, состоящего из 116 источников литературы, в том числе 83 отечественных и 33 зарубежных. Диссертация иллюстрирована 21 рисунком, 32 таблицами, включает 4 клинических примера.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследования**

Набор основной группы (ОГ) проводился в течение 2013-2014 гг. на консультативных приемах детей изучаемой возрастной группы с верифицированной ЦМВИ, направленных из поликлиник г. Перми на кафедру детских инфекционных болезней ПГМУ (сплошной метод).

Критерии включения: возраст 1-3 года; наличие серологических маркеров активной ЦМВИ (IgM и /или низкоavidные IgG к ЦМВ). Критерии исключения: гестационный возраст - менее 36 недель в анамнезе; тяжелая врожденная патология неинфекционного

генеза (врожденные пороки сердца (ВПС), врожденные пороки центральной нервной системы (ВП ЦНС), врожденные пороки мочевыводящей системы (ВП МВС), муковисцидоз и др.); тяжелая рецидивирующая аллергическая патология (бронхиальная астма, рецидивирующий отек Квинке и др.).

Всего скринировано 216 детей. Серологические маркеры активности ЦМВИ были подтверждены только у 157 направленных пациентов. Из них не вошли в исследование 45 детей, согласно критериям исключения. Таким образом, в проспективное сравнительное исследование было включено 112 пациентов с лабораторными маркерами реактивации хронической ЦМВИ, составивших ОГ.

Для оценки активности вирусной репликации ЦМВ при первичном обследовании служила количественная ПЦР из крови, мочи и слюны. Выявление ДНК ЦМВ и определение его количественного содержания проводили методом ПЦР в режиме реального времени с использованием тест-систем «АмплиСенс® CMV-скрин/монитор-FL» (Россия).

В качестве группы сравнения (ГС) были набраны случайным способом в тот же период времени 67 детей также в возрасте 1-3 лет из диспансерной группы ЧБД, находящиеся под наблюдением у участковых педиатров разных поликлиник ДГКБ им. П.И. Пичугина.

Критерии включения: возраст - 1-3 года; отсутствие указания в анамнезе на ЦМВИ и отсутствие серологических маркеров активной инфекции на момент включения в исследование. Критерии исключения: гестационный возраст менее 36 недель в анамнезе; тяжелая врожденная патология неинфекционного генеза (ВПС, ВП ЦНС, ВП МВС, муковисцидоз и др.); тяжелая рецидивирующая аллергическая патология.

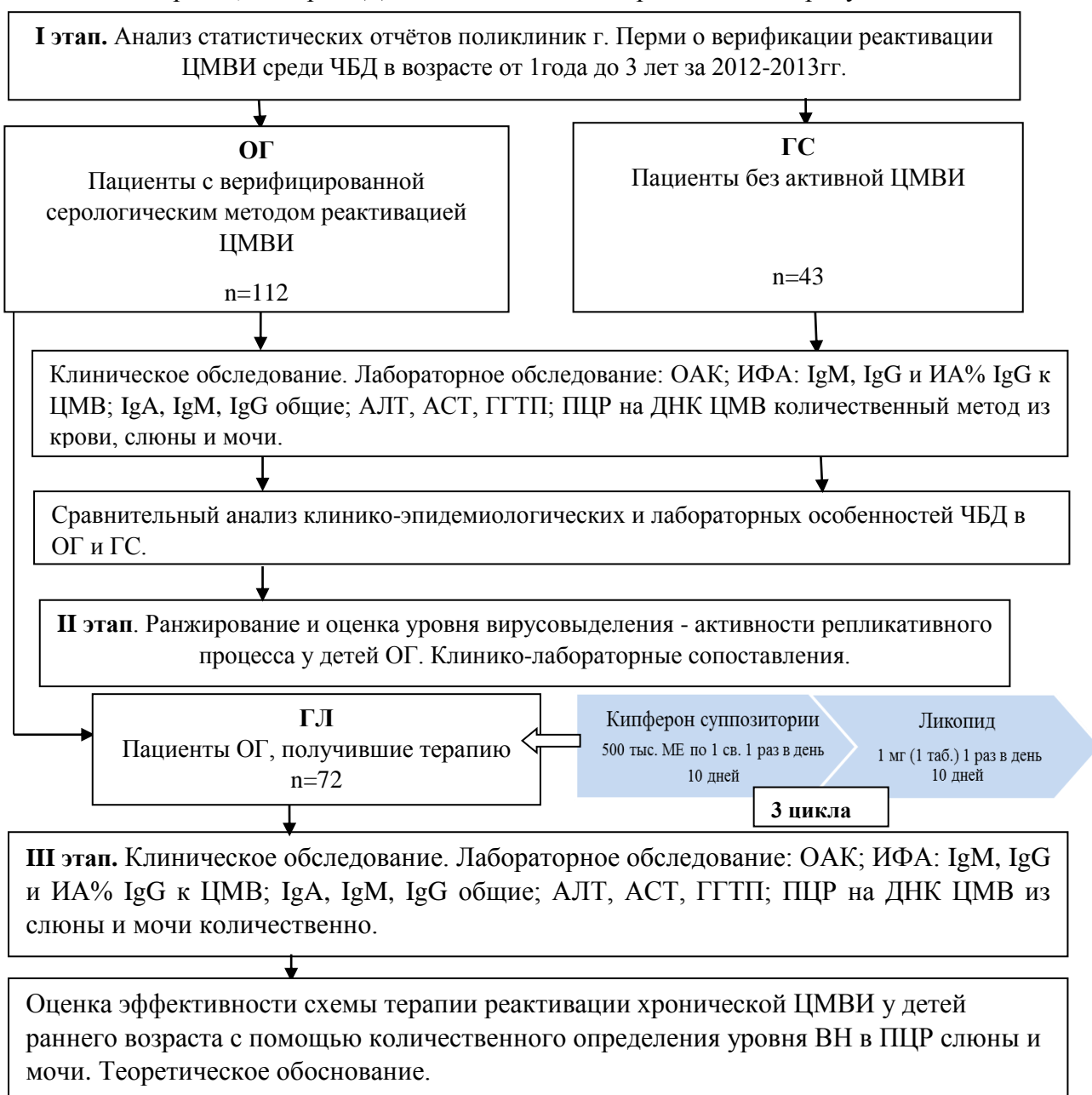
Из 67 направленных детей в исследование не вошли 24 человека, согласно критериям исключения. Таким образом, в проспективное сравнительное исследование без лабораторных маркеров реактивации хронической ЦМВИ было включено 43 пациента, составивших ГС.

В группу лечения (ГЛ) вошли пациенты из ОГ (n=112), за исключением 40 пациентов согласно критериям исключения. Критерий включения: амбулаторные пациенты 1-3 лет с активной ЦМВИ из ОГ. Критерии исключения: наличие антител к ИФ-альфа, пролонгированная интерферонотерапия в анамнезе в течение последних 3 месяцев. Таким образом, группу лечения (ГЛ) составили 72 человека.

Лечение хронической ЦМВИ в стадии реактивации проводилось по трехкратной схеме медикаментозной иммунотерапии с чередованием 10 дневного приёма препаратов: интерферон человеческий рекомбинантный альфа-2 $\beta$ +комплексный иммуноглобулиновый препарат (КИПферон® 500 000 МЕ) и глюкозаминилмурамил дипептид (Ликопид) с дальнейшим динамическим наблюдением в течение 3 месяцев и мониторингом вирусовыделения из слюны и мочи, а также иммунологических и других лабораторных показателей, в целях оценки эффективности лечебных мероприятий.

После одного курса терапии проводилось повторное обследование на ДНК ЦМВ в количественной ПЦР в слюне и моче, а также мониторинг выявленных ранее

лабораторных отклонений. Исследования проводились в независимой лаборатории ООО «МедЛабЭкспресс», г. Пермь. Дизайн исследования представлен на рисунке 1.



**Статистические методы исследования.** Обработку полученных результатов исследования проводили на персональном компьютере с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 10 фирмы StatSoftInc. (США). Для оформления результатов исследований применялись пакеты из системы «Microsoft Excel 2010».

При анализе данных связи между номинальными и порядковыми переменными рассчитывали с использованием критериев хи-квадрат ( $\chi^2$ ) на основании таблиц сопряженных признаков. Расчет корреляций между метрическими и порядковыми переменными проводили с использованием корреляций по Пирсону и Спирмену; при



сравнении независимых выборок применяли t-test. Статистические решения принимали для критериев: t-test, и при расчете коэффициентов корреляции, критерия  $\chi^2$  и дисперсионного анализа на 5% уровне значимости.

Рассчитывали чувствительность (Se) и специфичность (Sp) количественного ПЦР-метода для исследуемых сред. Построена таблица 2x2 частот, содержащая истинно положительные результаты (TP), ложно-отрицательные (FN), истинно-отрицательные (TN) и ложноположительные результаты (FP). Чувствительность и специфичность предикторов оценена при помощи ROC-анализа: построен график (ROC-кривая) зависимости истинно положительного уровня (чувствительности) от ложноположительного (1 - специфичность, или предательность) для различных возможных значений предикторов. Для построения математической модели использовали регрессионный анализ. Вариабельность показателей частоты ЦМВИ у детей из диспансерной группы ЧБД разных районов г.Перми оценивали при помощи однофакторного дисперсионного анализа ANOVA.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

По данным статистических отчетов поликлиник г. Перми за 2012-2013 год, доля детей с верифицированной ЦМВИ среди часто болеющих амбулаторных пациентов раннего возраста (7,2%, 1712/23786) в условиях детских поликлиник г. Перми составила, в среднем, 23,1% (396/1712) (табл. 1).

Таблица 1

Анализ данных официальных отчетов детских поликлиник города Перми о частоте выявляемости ЦМВИ у ЧБД 1-3 лет из группы за 2012-2013г.

Район г. Перми	Всего детей	Всего ЧБД		ЦМВИ	
		абс.	%	абс.	%
Ленинский	1494	87	5,8	32	36,8
Свердловский	3617	510	14,1	135	26,5
Кировский	5582	338	6,1	142	42
Мотовилихинский	5633	83	1,5	13	15,7
Индустриальный	3189	340	10,7	38	11,2
Дзержинский	4253	354	8,3	36	10,2
Всего	23768	1712	7,2	396	23,1

По результатам дисперсионного анализа ANOVA, получены убедительные данные для отбрасывания нулевой гипотезы об отсутствии различий между группами (критерий  $F=5,3$ ,  $p=0,03$ ). Статистически достоверная вариабельность показателей частоты ЦМВИ у детей из диспансерной группы ЧБД разных районных детских поликлиник может быть связана с отсутствием единых подходов к клинико-эпидемиологическому обоснованию диагноза и лабораторному подтверждению. Алгоритм на основе клинико-

эпидемиологического анализа внедрен в работу детских поликлиник Свердловского района в целях оптимизации диагностики (рис. 2).



Рис. 2. Алгоритм постановки диагноза и контроля терапии хронической ЦМВИ у детей раннего возраста

Сравнительный клинко-эпидемиологический анализ здоровья ЧБД с верифицированной реактивацией хронической ЦМВИ и без признаков активной

инфекции позволил выявить достоверные статистически значимые отличия, касающиеся факторов риска антенатального периода, способствующие гипоксии плода и активации оппортунистических вирусных инфекций, а именно, угроза прерывания беременности – чаще в 1,6 раза в ОГ; хроническая ФПН - в 1,8 раз в ОГ. Данные УЗИ-скрининга новорожденных: поражения ЦНС - чаще в 3 раза в ОГ; почек - в 2,8 раз в ОГ; печени – в 3 раза в ОГ.

Серологические маркёры высокого риска ЦМВИ у беременных матерей, многофакторность риска во всех случаях и тяжелая патология, потребовавшая госпитализации в ОРИТ в периоде новорожденности имели место только при верифицированной активной ЦМВИ.

В отличие от ГС в ОГ достоверно чаще в 2,6 раза имели место частые ОРВИ с ранним началом (с первых месяцев жизни); в 4,2 раза - длительный субфебрилитет; в 2,3 – 2 раза лимфопролиферативный синдром с гипертрофией миндалин 1-2 степени и аденоидитом 1-2 степени; в 2 раза - атопический дерматит.

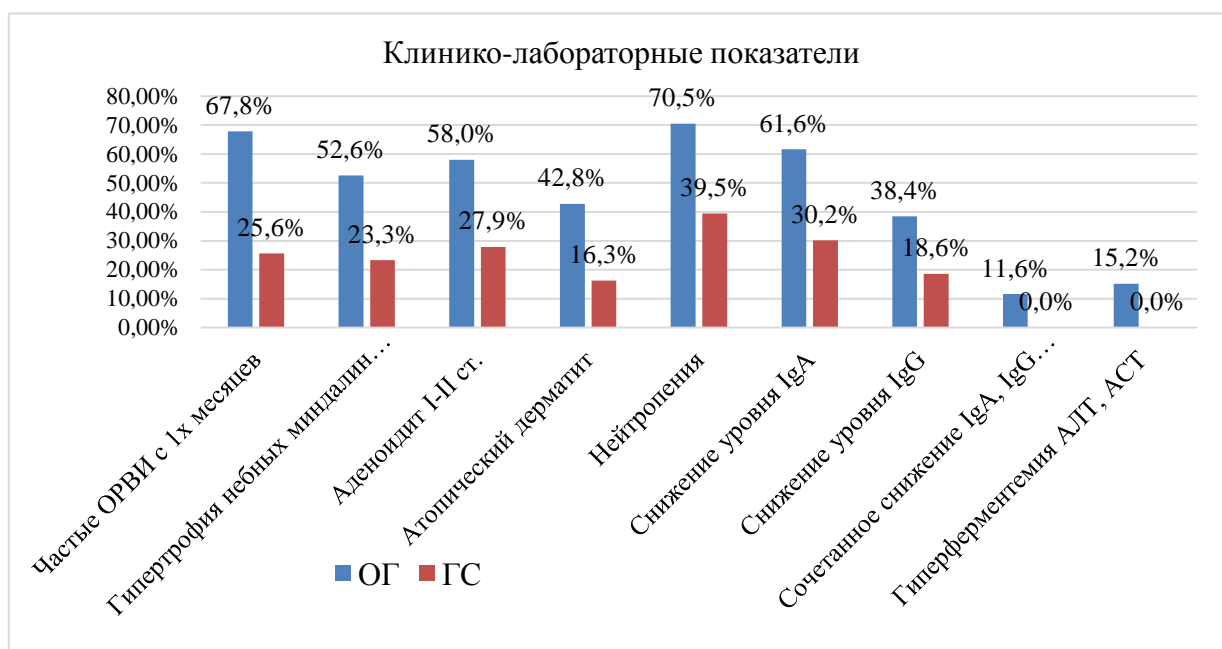


Рис. 3. Сравнительная диаграмма достоверных отличий частот клинико-лабораторных признаков в ОГ и ГС.

Лабораторные проявления хронической ЦМВИ такие, как нейтропения, были выявлены в 1,8 раз чаще, а снижение показателей IgA - в 2,4 раза. Нейтропения в сочетании с гипоиммуноглобулинемией IgG и IgA имела место только при верификации активной инфекции, также как сочетанная гиперферментемия АЛТ и АСТ. Сравнительная диаграмма достоверных отличий частот клинико-лабораторных признаков в ОГ и ГС представлена на рисунке 3.

При серологическом обследовании детей ОГ специфические IgM к ЦМВ были обнаружены в 51,8% (58/112) случаев, а IgG с низким индексом авидности (ИА) (<30%) в

48,2% (54/112). Авидность IgG определялась только у детей, в сыворотке крови которых были выявлены антитела к ЦМВ класса IgG (100/112). Значения ИА распределились следующим образом: в 66% (66/100) – ниже 30%, в 26% (26/100) в диапазоне от 30 до 60%, и в 8,0% (8/100) - в диапазоне более 70%. Анализируя полученные значения ИА IgG к ЦМВ, можно сделать вывод, что у 66,0% детей реактивация ЦМВИ произошла не позднее 3 месяцев к моменту обследования, в 26,9% случаев с момента инфицирования прошло от 3 до 6 месяцев, и лишь в 8,0% недавняя реинфекция исключалась, однако эти пациенты имели IgM, как показатели активности инфекционного процесса.

Количественные показатели ВН, полученные в результате ПЦР-анализа в исследуемых средах, для дальнейшей статистической обработки были ранжированы следующим образом:

1.  $VH \geq 6,0 \lg$  - высокая вирусная нагрузка (ВВН).
2.  $4,0 \lg \leq VH < 6,0 \lg$  - средняя вирусная нагрузка (СВН).
3.  $VH < 4,0 \lg$  - низкая вирусная нагрузка (НВН).

У детей с активной хронической ЦМВИ (ОГ) с помощью ПЦР в реальном времени верификация ДНК ЦМВ составила: в крови у 2,6 % (3/112) детей, в моче - 81,3% случаев с низкой и средней степенью нагрузки; в слюне - 95,5% случаев со средней и высокой степенью нагрузки в подавляющем большинстве исследований (92,0%). Хотя бы в одной среде ДНК ЦМВ обнаруживалась у всех (100%) пациентов ОГ. Вирусная ДНК не определялась в 18,7% (21/112) случаев - в моче, в слюне 4,5% (5/112),  $p=0,002$ . При сравнительном анализе ВН ЦМВ в моче и слюне детей ОГ выявлены достоверные различия значений медиан: в моче - 3,7lg копий ДНК/мл (ДИ 3,1;7,9), в слюне – 4,9lg копий ДНК/мл (ДИ 4,8;5,3) ( $t=-4,8$ ,  $p=0,0001$ ).

В крови величина ВН составила 2,6lg, сочетаясь во всех трех случаях с обнаружением антител классов IgM при средних значениях ИА (от 43,0 до 56,0%). Для дальнейшего сравнительного анализа значения ВН в крови не использовались, ввиду их незначительного количества.

В ходе исследования ВН у детей ОГ установлено, что в моче низкая и средняя степень ВН распределена равномерно: 39,2% и 42,0%, соответственно, высокая степень не выявлялась. В слюне доля низкой ВН составила только 7,1%, что достоверно меньше, чем в моче ( $p=0,001$ ); доля средней ВН - 61,6%, что достоверно выше ( $p=0,005$ ). Высокая степень вирусной нагрузки имела место только в слюне, составив 26,8%.

В ГС показатель верификации ДНК ЦМВ составил: в моче - 7%, в слюне - 25,6% только в низких количествах, не более 4lg. Только в слюне детей с активной хронической ЦМВИ (ОГ) выявлена высокая ВН, составившая 26,8%, что в пересчете на копии в мл соответствует 1 000 000 коп/мл и более. В группе сравнения ДНК ЦМВ в крови не была обнаружена. Выявление в моче составило 6,9% (3/43), в слюне - 25,5% (11/43) при диапазоне значений в пределах  $\leq \lg 4$ , что соответствует низкой ВН.

Таблица 2

## Ранжирование вирусной нагрузки ДНК ЦМВ в моче и слюне в ОГ и ГС

Степень ВН	ОГ				P	ГС				P
	Моча (n=112)		Слюна (n=112)			Моча (n=43)		Слюна (n=43)		
	Абс.	Доля (%)	Абс.	Доля (%)		Абс.	Доля (%)	Абс.	Доля (%)	
0	21	18,7	5	4,5	0,002	40	93,0	32	74,4	0,04
Низкая	44	39,3	8	7,1	0,001	3	7,0	11	25,6	0,04
Средняя	47	42,0	69	61,6	0,005	0	0	0	0	0
Высокая	0	0	30	26,8	0,003	0	0	0	0	0

Сравнительный анализ полученных данных в ОГ и в ГС показал: что в крови амбулаторных пациентов раннего возраста из группы ЧБД ДНК вируса определяется крайне редко, составляя 2,6% только у детей с верифицированной активной ЦМВИ (ОГ), причем в количествах, равных пределу чувствительности метода (2,6 lg). У данной категории пациентов в качестве диагностического лабораторного метода ПЦР крови на ЦМВ не может быть скрининговым тестом. В моче вирус цитомегалии определяется достоверно чаще, чем в крови: в ОГ в 81,3% всех случаев, только в низкой и средней степени ВН, против 7,0% случаев в ГС и только в низкой степени ВН ( $\chi^2=66,7$ ,  $p=0,001$ ) (табл.2).

С целью решения задачи сопоставления лабораторных показателей прямого количественного метода ПЦР на ДНК ЦМВ и клинических проявлений реактивации хронической ЦМВИ у детей ОГ пациенты были разделены на 2 подгруппы: ОГ1 – с высокой ВН в слюне (30/112), ОГ2 – со средней и низкой ВН в слюне (77/112). 5 пациентов были исключены из этой части исследования ввиду отрицательного показателя ВН в слюне при первичном обследовании.

Выявлены особенности уровня вирусовыделения из слюны в зависимости от возраста у детей в исследуемых группах: высокий уровень ВН достоверно чаще имел место в возрасте до 1,5 лет, а в возрасте 2,5 - 3 лет отсутствовал. Снижение вирусовыделения с увеличением возраста пациентов, начиная с 1,5 лет, прослеживалось и в группе с более низким уровнем ВН (ОГ2).

Частота встречаемости инфекционного и лимфопролиферативного синдромов в зависимости от высоты показателя ВН не имела достоверных различий. Однако полиаденопатия достоверно чаще встречалась в ОГ1 у самых младших детей, что можно расценить как иммунный ответ на активную репликацию лимфотропного  $\beta$ -герпесвируса (ЦМВ) в организме иммунокомпromетированного ребенка. Аллергический синдром также достоверно чаще встречался у детей с высокими показателями вирусовыделения из слюны (табл. 3).

Сравнительная характеристика иммунопатологических синдромов в ОГ1 и ОГ2

Клинические проявления хронической ЦМВИ	ОГ1 n = 30		ОГ2 n=77		$\chi^2$	P
	Абс.	%	Абс.	%		
<b>Инфекционный синдром</b>	30	100	75	97,4	0,794	0,92
ОРВИ с первых месяцев жизни	24	80	50	64,9	1,6	0,2
ОРВИ, не поддающиеся традиционной терапии	12	40	20	25,9	1,4	0,23
Хронический тонзиллит	2	6,7	19	24,7	4,439	0,05
Длительный субфебрилитет	8	26,7	8	10,4	4,498	0,05
Индекс резистентности	0,72		0,69		-	-
<b>Лимфопролиферативный синдром</b>	13	43,3	38	49,3	0,11	0,73
Полиаденопатия	7	23,3	5	6,5	6,148	0,03
Гипертрофия небных миндалин I-II ст.	10	33,3	31	40,2	0,44	0,65
Гипертрофия небных миндалин III ст.	2	6,7	14	18,2	2,251	0,23
Аденоид I-II ст.	11	36,7	29	37,7	0,009	0,89
Аденоид III ст.	2	6,7	10	13	0,866	0,55
Гепатомегалия	10	33,3	10	13	5,881	0,03
Спленомегалия	4	13,3	10	13	0,002	0,78
<b>Аллергический синдром</b>	20	66,7	31	40,3	6,035	0,02
Атопический дерматит	18	56,7	29	37,7	4,373	0,06
Обструктивный бронхит	5	16,7	4	5,2	3,688	0,12

В результате анализа чувствительности (Se) и специфичности (Sp) ПЦР-метода из слюны и мочи для диагностики ЦМВИ выявлено, что чувствительность (Se), выражающая долю пациентов с активной ЦМВИ, точно идентифицированных тестом по среде - моча, равна:  $Se = 91/112 = 0,81$  (81,0%). Специфичность (Sp), выражающая долю пациентов без активной ЦМВИ, которые точно идентифицированы тестом по среде – моча, равна  $Sp = 41/43 = 0,95$  (95,0%).

Чувствительность (Se), выражающая долю пациентов с активной ЦМВИ, точно идентифицированных тестом по среде - слюна, равна:  $Se = 107/112 = 0,95$  (95,0%), SEM=0,02, ДИ (0,92;0,98). Специфичность (Sp), выражающая долю пациентов без активной ЦМВИ, которые точно идентифицированы тестом по среде - слюна, равна:  $Sp = 32/43 = 0,74$  (74,0%).

Построен график (ROC-кривая) зависимости истинно положительного уровня (чувствительности) от ложноположительного (1 - специфичность, или представительность) для различных возможных значений вирусной нагрузки (предиктора). Точность теста определяется с помощью площади под ROC-кривой (AUC). Идеальный тест имеет значение AUC, равное 1. В нашем случае для ПЦР мочи AUC=0,83 (ДИ 0,77-0,89), для ПЦР слюны - AUC=0,96 (ДИ 0,94-0,99). Определен оптимальный порог отсечения (cut off value) – то значение ВН, при котором сумма чувствительности и

специфичности для данного теста максимальна, и которая показывает, после какого значения вероятности один класс сменяется другим, в нашем случае оптимальный порог cut off =3,1lg (Se =0,72, Sp=0,83) для среды «моча», cut off =3,93 lg (Se =0,93, Sp=1,0) – для среды «слюна». Точка отсечения в 3,1lg для среды «моча» значит, что все значения  $VH \leq 3,1lg$ , могут трактоваться, как не имеющие активной ЦМВИ. А для среды «слюна» - 3,93 lg значит, что все значения  $VH \leq 3,93lg$ , могут трактоваться, как не соответствующие активной ЦМВИ.

Получены коэффициенты согласия математических моделей для двух биологических сред: для биологической среды «моча» коэффициент согласия модели  $R^2=0,29$ , означает, что модель объясняет только 29,0% всех случаев, для среды «слюна»  $R^2=0,64$ , что гораздо выше ( $p=0,001$ ) и говорит о возможном практическом применении данной модели. Результаты проведенного ROC-анализа, также подтверждают приоритетную возможность использования, особенно в качестве скрининга, ПЦР-исследования слюны.

В результате проведенного корреляционного анализа взаимосвязи высоты ВН с бинарным исходом «ЦМВИ активна» / «ЦМВИ неактивна» (1/0), для среды слюна коэффициент корреляции = 0,79 (прямая сильная связь), для среды моча = 0,53 (прямая связь средней силы).

Таким образом, тяжесть клинических проявлений активной хронической ЦМВИ у детей из группы ЧБД находится в прямой связи с репликативной активностью вируса, проявляющейся в интенсивности вирусывыделения. Предложенное ранжирование ВН может служить критерием оценки степени тяжести активной хронической ЦМВИ.

Оценка клинической эффективности терапии хронической активной ЦМВИ в группе ЧБД, из которых была сформирована группа лечения (ГЛ) (72/112), заключалась в сравнении иммунопатологических синдромов и лабораторных отклонений до и через 3 месяца после начала терапии.

Среди пациентов ГЛ инфекционный синдром был у всех детей (100%). Субфебрилитет отмечался у 16,7% (12/72), купировался после курса лечения в 83,3% (10/12) случаев. Кратность ОРВИ составляла 3-5 эпизодов за 6 месяцев наблюдения; индекс резистентности до лечения за полгода ретроспективного анализа в ГЛ - 0,7, а за 3 месяца лечения и наблюдения проспективно – 0,4.

Лимфопролиферативный синдром регистрировался в ГЛ до лечения у 47,2% (34/72), после лечения – 30,5% (22/72). Аллергический синдром присутствовал у 62,5% (45/72) до лечения, проявления аллергии в виде алергодерматоза (42/72) были купированы после окончания терапии – у 38,1% (16/42). С рецидивирующими БОС в ГЛ вошли 5 человек, за время терапии у 2 были однократные эпизоды БОС во время интеркуррентных ОРВИ (табл. 4).

Сравнительная характеристика иммунопатологических синдромов в ГЛ до и после терапии

Клинические проявления хронической ЦМВИ	ГЛ до лечения n =72		ГЛ после лечения n = 72		$\chi^2$	P
	Абс.	%	Абс.	%		
Длительный субфебрилитет	12	16,7	2	2,8	7,9	0,01
Индекс резистентности	0,7		0,4		-	-
<b>Лимфопролиферативный синдром</b>	34	47,2	22	30,5	4,2	0,05
Полиаденопатия	8	11,1	0	0	8,47	0,01
Гипертрофия небных миндалин I-ст.	30	41,6	21	29,2	2,46	0,68
Гипертрофия небных миндалин III ст.	11	15,3	9	8,3	0,23	0,07
Аденоид I-II ст.	28	38,9	17	23,6	3,9	0,07
Аденоид III ст.	9	12,5	5	7	1,26	0,39
Гепатомегалия	14	19,4	6	8,3	3,7	0,09
Спленомегалия	8	11,1	1	1,4	5,8	0,05
<b>Аллергический синдром</b>	45	62,5	31	43	5,5	0,03
Атопический дерматит	42	58,3	29	40,3	4,7	0,04
Обструктивный бронхит	5	6,9	2	2,8	1,35	0,43

В ГЛ до начала терапии лейкопения отмечалась у 22,2% (16/72), лейкоцитоз – у 13,9% (10/72). После терапии лейкопения купирована у 68,7% (11/16), лейкоцитоз в ГЛ после терапии был диагностирован у 3 пациентов и связан с наложением интеркуррентных заболеваний. Нейтропения купирована у 55,3% (26/47). Среди детей, у которых нейтропения была купирована не полностью, отмечалось повышение абсолютных показателей нейтрофилов, снижения зарегистрировано не было. Показатели лимфоцитов нормализовались у 60,5% (23/38).

Иммуноглобулины А и G нормализовались в 71,4% (30/42) и 67,8% (19/28) случаев, соответственно. Частота комбинированного дефицита иммуноглобулинов А и G также достоверно снизилась – 31,9% (23/72) против 11,1% (8/72). После терапии не было выявлено сочетанного снижения общих иммуноглобулинов с нейтропенией. Достоверные отличия получены по частоте гиперферментемии АЛТ и АСТ, отражающей поражение печени (табл. 5).



Таблица 5

Лабораторные показатели отклонений гемограммы и гуморального иммунитета у детей  
ГЛ до и после терапии

Лабораторные показатели	ГЛ до терапии n= 72		ГЛ после терапии n = 72		$\chi^2$	P
	Абс.	%	Абс.	%		
Лейкопения	16	22,2	5	6,9	6,75	0,01
Лейкоцитоз	10	13,9	3	4,2	4,14	0,08
Нейтропения	47	65,3	21	29,2	18,84	0,001
Лимфоцитоз	22	30,5	10	13,9	5,79	0,02
Лимфоцитопения	16	22,2	5	6,9	6,75	0,01
Нейтропения с лимфоцитопенией	9	12,5	2	2,8	4,82	0,06
Снижение иммуноглобулина А	42	58,3	12	16,7	26,7	0,002
Снижение иммуноглобулина G	28	38,8	9	12,5	13,1	0,001
Сочетанное снижение иммуноглобулинов А и G	23	31,9	8	11,1	9,25	0,001
Сочетанное снижение иммуноглобулинов А, М и G	10	13,9	2	2,8	5,82	0,03
Сочетанное снижение общих иммуноглобулинов с нейтропенией	9	12,5	0	0	9,6	0,001
Повышение АЛТ и АСТ	12	16,7	3	4,2	6,03	0,02

После проведенного курса лечения достоверно снизилась доля детей, имевших маркеры активной ЦМВИ: IgM к ЦМВ после лечения не определялись, доля низких значений индекса авидности до лечения составляла 41,5% (25/60), после лечения – 5,0% (3/59) ( $\chi^2 = 20,1$ ,  $p=0,011$ ). Доля значений индекса авидности более 60% после лечения достоверно повысилась - 45,8% (27/59) против 17,0% (10/60),  $\chi^2 = 10,4$ ,  $p=0,001$ .

Сравнительный анализ показал, что после лечения произошли достоверные изменения вирусывыделения в биологических средах. Так, достоверно увеличилась доля детей с отрицательным значением ПЦР в моче (51,3 против 22,3%,  $p=0,001$ ). Почти в 5 раз увеличилась доля детей с низкой ВН в слюне (5,5 против 45,8%,  $p=0,001$ ), и также достоверно уменьшились доли детей со средней и высокой ВН (табл. 6).

Таблица 6.

Ранжирование вирусной нагрузки ДНК ЦМВ в моче и слюне до и после лечения

Степень вирусной нагрузки	В моче - моча (n=72), доля (%), (абс. знач.)		P	В слюне - слюна (n=72), доля (%), (абс. значения)		P
	До лечения	После лечения		До лечения	После лечения	
ВН=0	22,3(16/72)	51,3(37/72)	0,001	7,0(5/72)	11,1(8/72)	0,56
ВН низкая	43,0(31/72)	25,0(18/72)	0,03	5,5(4/72)	45,8(33/72)	0,001
ВН средняя	33,3(25/72)	23,6(17/72)	0,19	66,6(48/72)	40,3(29/72)	0,003
ВН высокая	0	0		20,8(15/72)	2,8(2/72)	0,001

## ВЫВОДЫ

1. Частота выявляемости реактивации хронической ЦМВИ у ЧБД раннего возраста в детских поликлиниках г. Перми в среднем составляет 23,1% с достоверной вариабельностью показателей, что связано с отсутствием единых подходов к обоснованию диагноза и лабораторному подтверждению.
2. Уровень ВН из слюны и мочи, установленный в количественной ПЦР, отражает степень репликативной активности ЦМВ и находится в прямой корреляционной связи средней силы с серологическими маркерами активной ЦМВИ (IgM и низким ИА IgG) и определяет клиничко-лабораторные проявления реактивации хронической ЦМВИ: длительный субфебрилитет, полиаденопатию, гепатомегалию и аллергический синдром, а также нейтропению, гипоиммуноглобулинемию А и G и гиперферментемию АЛТ, АСТ, ГГТП.
3. В качестве методики оценки эффективности терапии хронической ЦМВИ предложено использование определения уровня ВН в ПЦР из слюны и мочи до и через 3 месяца после начала терапии. Высокой эффективностью терапии считается снижение ВН на  $2\log_{10}$  и более (в 100 и более раз); умеренной эффективностью - снижение более, чем на 1 и менее  $2\log_{10}$  (менее 100 и более 10 раз); низкой эффективностью - снижение менее, чем на  $1\log_{10}$  (менее, чем в 10 раз). Свидетельством неактивной ЦМВИ является уровень ВН в слюне ниже  $3,9\log$  и в моче ниже  $3,1\log$  копий ДНК/мл.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В целях совершенствования диагностики хронической ЦМВИ у детей раннего возраста в амбулаторных условиях педиатру необходимо проводить клиничко-эпидемиологический анализ перинатального периода жизни ребенка в соответствии с предложенным алгоритмом, опираясь на достоверные предикторы: угроза прерывания беременности, хроническая фетоплацентарная недостаточность, серологические маркеры высокого риска ЦМВИ во время беременности, данные УЗИ-скрининга новорожденного о поражении ЦНС, почек; многофакторность риска и тяжелая патология, потребовавшая госпитализации в ОРИТ в периоде новорожденности.
3. Верификация реактивации хронической ЦМВИ может осуществляться с помощью количественного определения уровня ВН в ПЦР на ДНК ЦМВ из слюны и мочи с оценкой тяжести клинической формы по уровню ВН в соответствии с ранжированием:  $VH \geq 6,0\lg$  - высокая (ВВН);  $4,0 \lg \leq VH < 6,0\lg$  - средняя (СВН);  $VH < 4,0\lg$  - низкая (НВН). Критерием реактивации хронической ЦМВИ следует считать уровень ВН для среды «слюна» =  $3,93\lg$  ( $Se=0,93$ ,  $Sp=1,0$ ) копий/мл, для среды «моча» =  $3,1\lg$  ( $Se=0,72$ ,  $Sp=0,83$ ) копий/мл.
4. Оценка эффективности терапии хронической ЦМВИ у детей раннего возраста в амбулаторных условиях помимо критериев положительной клинической динамики заболевания и серологических показателей, должна базироваться на динамике уровня ВН

из слюны и мочи, с длительностью лечебных мероприятий до снижения уровня ВН из слюны и мочи, свидетельствующего об отсутствии активной ЦМВИ: для среды «слюна» ниже  $3,9 \log$ , для среды «моча» ниже  $3,1 \log$  копий ДНК/мл.

### Перспективы дальнейшей разработки темы

Полученные результаты исследования позволяют сформулировать направления дальнейшей разработки темы: - установить необходимую длительность терапии реактивации хронической ЦМВИ до перехода в латентную форму инфекции в зависимости от исходной ВН; - провести фармако-экономический анализ различных схем терапии реактивации хронической ЦМВИ.

### Список опубликованных работ по теме диссертации

1. Львова И.И. Значение цитомегаловирусной инфекции в генезе внезапной смерти детей раннего возраста. [Электронный ресурс] / И.И. Львова, Г.Г. Фрейнд, А.В. Дерюшева, Н.С. Леготина, Е.В. Сидор // Здоровье семьи – 21 век: электронное периодическое издание. - 2013. - № 1(1). – URL: <http://fh-21.perm.ru/download/2013-1-10.pdf> (из перечня ВАК)
2. Леготина Н.С. Клинико-лабораторные критерии диагностики хронической цитомегаловирусной инфекции у детей раннего возраста. / Н.С. Леготина, И.И. Львова, А.В. Дерюшева // Пермский медицинский журнал. – 2015. - т. XXXII. - №3. - С. 63-69. (из перечня ВАК)
3. Львова И.И. Клинико-лабораторные особенности герпесвирусной инфекции 6 типа у иммунокомпрометированных детей, наблюдающихся в детской поликлинике. / И.И. Львова, А.В. Дерюшева, Н.С. Леготина, Е.В. Сидор // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2013. - №4. - С. 35-38. (из перечня ВАК)
4. Львова И.И. Тяжелая форма висцерального лейшманиоза у ребенка раннего возраста на фоне активации оппортунистических герпесвирусных инфекций. / И.И. Львова, Н.С. Леготина, А.В. Дерюшева, Г.В. Батракова, Т.В. Гирёва, Н.В. Банько, Е.Ю. Уварова, Э.Ф. Рамазанова, Е.П. Лазуков // Пермский медицинский журнал. – 2015. - т. XXXII. - №3. - С. 136-140. (из перечня ВАК)
5. Shurygin A.A. The prevention of herpes-viral infections with interferon therapy in combined treatment of pulmonary tuberculosis. / A.A. Shurygin, I.I. Lvova, A.V. Deryusheva, A.A.Varankina, N.S. Legotina // Life Sci. J. - 2014. - 11(9s) – P. 125-128. (ISSN:1097-8135). <http://www.lifesciencesite.com>. 23 (из базы данных Scopus)
6. Lvova I.I. Improvement of Control the Efficiency of Treatment of Cytomegalovirus Infection in Children. / I.I. Lvova, N.S. Legotina, A.V. Deryusheva // World Applied Sciences Journal. – 2013. - 25 (7). - P. 1023-1026. (из базы данных Scopus)
7. Legotina N.S. Quantitative PCR in estimation of chronic cytomegalovirus infection therapy. / Legotina, N.S., I.I. Lvova // Book of abstracts of the scientific conference in foreign languages with an international participation for the scientific-teaching stuff of the Academy. – 2014 - P. 11-12.
8. Legotina N.S. Viral load dynamics as a criterion of therapy efficiency for cytomegalovirus infection in children. /N.S. Legotina// Book of abstracts of the scientific

conference in foreign languages with an international participation for the scientific-teaching staff of the Academy. – 2014 - P. 8-11.

9. Леготина Н.С. Клинико-лабораторные маркёры внутриутробного инфицирования при хронической цитомегаловирусной инфекции у иммунокомпрометированных амбулаторных пациентов. / Н.С. Леготина, И.И. Львова, А.В. Дерюшева // Актуальные вопросы педиатрии: материалы межрегион. науч.-практ. конф. с междунар. участием. – Пермь. - 2015. – с. 72-76.

### **Патент на изобретение**

Способ оценки эффективности терапии хронической цитомегаловирусной инфекции у детей: пат. 2566074 Рос. Федерация: МКП<sup>8</sup> G 01 N 33/35 / Леготина Н.С., Львова И.И., Дерюшева А.В.; заявитель и патентообладатель ГБОУ ВПО Пермская государственная медицинская академия имени академика Е.А. Вагнера Минздрава России. – № 2014143038/15, заявл. 24.10.14, опубл. 20.10.15, Бюл. №29. – 6 с.

### **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

АЛТ	- аланинаминотрансфераза
АСТ	- аспаргинаминотрансфераза
ВН	- вирусная нагрузка
ВУИ	- внутриутробная инфекция
ГС	- группа сравнения
ДИ	- доверительный интервал
ЧБД	- часто болеющие дети
ИА	- индекс avidности
ИФА	- иммуноферментный анализ
ОАК	- общий анализ крови
ОГ	- основная группа
ОРВИ	- острая респираторная вирусная инфекция
ОРИТ	- отделение реанимации и интенсивной терапии
ПЦР	- полимеразно-цепная реакция
УЗИ	- ультразвуковое исследование
ЦМВ	- цитомегаловирус
ЦМВИ	- цитомегаловирусная инфекция
IgA	- иммуноглобулин А
IgG	- иммуноглобулин G
IgM	- иммуноглобулин М

ЛЕГОТИНА НАТАЛЬЯ СЕРГЕЕВНА

**Оптимизация диагностики и оценки эффективности  
терапии хронической цитомегаловирусной инфекции  
у детей раннего возраста**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

---

Подписано в печать 10.10.2016. Тираж 100 экз.  
Усл. печ. л. 1,0. Формат . Заказ № /2016

---

Отпечатано с готового оригинал-макета  
в типографии издательства Пермского национального  
исследовательского политехнического университета  
614990, г. Пермь, Комсомольский пр., 29, к. 113.  
Тел.: (342) 219-80-33