

Показатели противовирусного иммунитета у новорожденных с цитомегаловирусной инфекцией в случаях позднего обнаружения ДНК цитомегаловируса

Л. В. КРАВЧЕНКО

Ростовский государственный медицинский университет МЗ РФ,
Ростов-на-Дону, Российская Федерация

Цель: изучить показатели противовирусного иммунитета у новорожденных с цитомегаловирусной инфекцией (ЦМВИ), родившихся у матерей с хроническими воспалительными гинекологическими заболеваниями, в случаях позднего обнаружения ДНК цитомегаловируса (ЦМВ) в крови и в моче.

Методы: обследовано 147 новорожденных с неспецифической клинической симптоматикой. Проведено типирование лимфоцитов к кластерам дифференцировки CD3+, CD69+, CD71+, CD95+ с помощью моноклональных антител, фирмы IMMUNOTECH (Франция). Экспрессию мембранных маркеров иммунокомпетентных клеток определяли на проточном лазерном цитофлуориметре «BeckmanCOULTER» EpicsXLII.

Результаты. У 123 новорожденных ЦМВИ подтверждена положительным результатом ПЦР, у 24 получен отрицательный результат. В возрасте от 1,5 до 3 месяцев у 24 детей, имевших на 1 месяце отрицательный результат ДНК-диагностики, был обнаружен ЦМВ в крови или моче и нарастание анти ЦМВ IgG, позволившие установить диагноз ЦМВИ.

Предложена формула зависимости прогноза ЦМВИ от содержания в сыворотке крови лимфоцитов с рецепторами CD69+ и CD95+ у новорожденных, имеющих неспецифическую клиническую симптоматику при позднем обнаружении ДНК цитомегаловируса.

Ключевые слова: новорожденные, цитомегаловирусная инфекция (ЦМВИ), интерферон

Parameters of Antiviral Immunity in Newborns with Cytomegalovirus Infection in Cases of Late Detection of Cytomegalovirus DNA

L. V. Kravchenko

Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russia

Objective: study of immune status indices in newborns in cases of late detection of cytomegalovirus (CMV) DNA in blood and urine.

Methods: 147 newborns with non-specific clinical symptoms were studied. Typing of lymphocytes relating to different clusters CD3+, CD69+, CD71+, CD95+ using monoclonal antibodies produced by IMMUNOTECH (France) have been performed. Expression of membrane markers of immunocompetent cells was measured on a laser flow cytofluorometer Beckman COULTER Epics XL II.

Results: In 123 newborns CMVI has been confirmed by the positive result of PCR, while in 24 newborns the negative result was obtained. In 24 three-month old babies, who had a negative result following DNA diagnostics in the first month of their life, cytomegalovirus in blood and urine and increase of anti-CMV IgG have been found, which allowed to diagnose CMVI.

The following formula reflecting the dependence of CMVI on CD69+ and CD95+ content in newborns having non-specific clinical symptoms in cases of late detection of CMV DNA has been offered.

Keywords: newborns, cytomegalovirus infection (CMVI), interferons

Для цитирования: Л. В. Кравченко. Показатели противовирусного иммунитета у новорожденных с цитомегаловирусной инфекцией в случаях позднего обнаружения ДНК цитомегаловируса. Детские инфекции. 2018; 17(3):34-37. doi.org/10.22627/2072-8107-2018-17-3-34-37

For citation: L. V. Kravchenko. Parameters of antiviral immunity in newborns with cytomegalovirus infection in cases of late detection of cytomegalovirus DNA. Detskie Infektsii=Children's Infections. 2018; 17 (3):34-37. doi.org/10.22627/2072-8107-2018-17-3-34-37

Контактная информация: Кравченко Лариса Вахтанговна, д.м.н., ведущий научный сотрудник отдела педиатрии, НИИ акушерства и педиатрии, Ростовский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Ростов-на-Дону, ул. Мечникова, 43; larakra@list.ru

Larisa V. Kravchenko, MD, lead researcher of the department of pediatric, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russia; larakra@list.ru; <http://orcid.org/0000-0002-0036-4926>

По данным Европейского регионального бюро ВОЗ, в различных странах мира отмечается рост заболеваемости цитомегаловирусной инфекцией (ЦМВИ), в связи с чем она отнесена к группе болезней, которые определяют будущее инфекционной патологии. В связи с особенностями иммунной системы новорожденных ante- и постнатальная диагностика ЦМВИ затруднена [1].

Без соответствующего лабораторного подтверждения только на основании клинических данных диагноз ЦМВИ не может быть установлен т.к. симптомы заболевания характеризуются неспецифичностью. Это относится и к субклинической форме, при которой у новорожденного отсутствуют клинические признаки заболе-

вания, а в течение первых месяцев жизни постепенно начинает формироваться задержка психомоторного развития и другие «поздние» проявления врожденной ЦМВИ [2–5].

Одна из проблем, с которой сталкиваются клиницисты при лечении герпесвирусной инфекции, является выраженность иммунных нарушений у больных. Доказано, что экспрессия на клеточной поверхности антигена CD95 характеризует способность клетки вступать в апоптоз, в регуляции которого участвуют цитокины. При вирусных инфекциях роль апоптоза как общего клеточного ответа связана с ограничением генерализации патологического процесса, включая воспаление. Макрофаги, фагоцитировавшие апоптотические клетки, способ-

Таблица 1. Характеристика и частота клинических симптомов у детей с цитомегаловирусной инфекцией на первом месяце жизни
Table 1. Characteristics and frequency of clinical symptoms in children with cytomegalovirus infection in the first month of life

Клинические симптомы Clinical symptoms	Группы, groups				
	ЦМВИ, тяжелая форма CMVI, severe form, n = 67		ЦМВИ, среднетяжелая форма CMVI, medium-weight form, n = 80		p*
	n	% от группы % of group	n	% от группы % of group	
Одышка/dyspnea	45	67,2	9	11,3	0,0001
Тахикардия/tachycardia	44	65,7	14	17,5	0,0001
Сосудистая дезадаптация/ cardiovascular deconditioning	58	86,6	38	47,5	0,0001
Лихорадка/fever	20	29,9	21	26,3	0,7
Менингоэнцефалит/ meningoencephalitis	9	13,4	0	0	0,0001
Геморрагический синдром/ hemorrhagic syndrome	16	23,9	4	5,0	0,001
Конъюгационная желтуха/ conjugated jaundice	23	34,3	32	40,0	0,5
Увеличение печени/hepatomegalia	38	56,7	15	18,8	0,0001
Гипербилирубинемия/hyperbilirubinemia	22	32,8	26	32,5	1,0
Гепатит/hepatitis	10	14,9	6	7,5	0,1
Лимфаденит/lymphadenitis	5	7,5	5	6,3	1,0
Пневмония/pneumonia	36	53,7	5	6,3	0,0001
Ринофарингит/nasopharyngitis	30	44,8	30	37,5	0,03
Везикулярная сыпь/vesicular exanthem	5	7,5	9	11,3	0,5
Аллергодерматит/allergodermia	16	23,8	16	20,0	0,7
Конъюнктивит/conjunctivitis	9	13,4	0	0	0,0006
Гипотрофия/hypotrophy	33	49,2	22	27,5	0,01

* — различия с показателями больных группы 1 статистически обоснованы при $p < 0,05$

ны ингибировать пролиферацию Т-лимфоцитов. Учитывая, что в настоящее время ЦМВИ рассматривается в качестве ведущего фактора формирования вторичных иммунодефицитов в детском возрасте, становится очевидной необходимость изучения особенностей иммунологических нарушений и выявления преморбидных факторов риска у детей с ЦМВИ [6–8].

Цель: изучить особенности показателей противовирусного иммунитета у новорожденных с цитомегаловирусной инфекцией (ЦМВИ) в случаях позднего обнаружения ДНК цитомегаловируса (ЦМВ) в крови и в моче.

Материалы и методы исследования

Проведен ретроспективный анализ клинико-лабораторных данных 147 новорожденных с ЦМВИ, родившихся у матерей с хроническими воспалительными

гинекологическими заболеваниями. Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией, принятой в июне 1964 г. (Хельсинки, Финляндия) и пересмотренной в октябре 2000 г. (Эдинбург, Шотландия), и одобрено локальным Этическим комитетом НИИ акушерства и педиатрии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Всем пациентам была проведена на первом месяце жизни ДНК диагностика ПЦР в моче и крови. У 123 детей диагноз ЦМВИ был подтвержден положительным результатом ПЦР, у 24 детей был получен отрицательный результат. В возрасте от 1,5 до 3 месяцев жизни у 24 детей, имевших на 1 месяце отрицательный резуль-

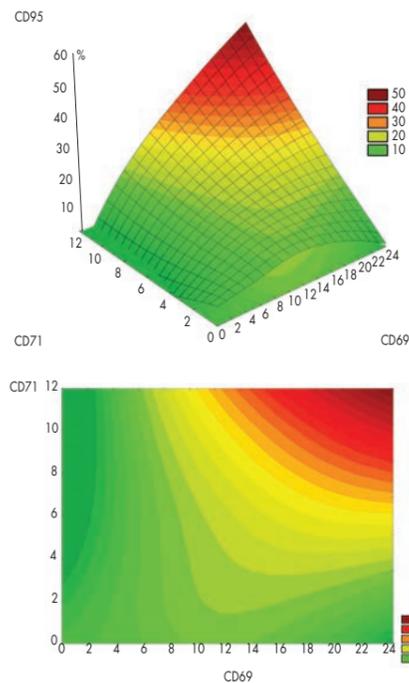


Рисунок 1. Зависимость уровня Т-лимфоцитов с рецепторами CD95 от уровня Т-лимфоцитов с рецепторами CD69, CD71 у детей без ЦМВИ. Оси отражают относительное количество лимфоцитов с рецепторами CD 69, CD 71, CD 95 в процентах
Figure 1. Dependence of the level of T-lymphocytes with CD95 receptors on the level of T-lymphocytes with CD69, CD71 receptors in children without CMVI. The axes reflect the relative number of lymphocytes with the receptors CD 69, CD 71, CD 95 in percent

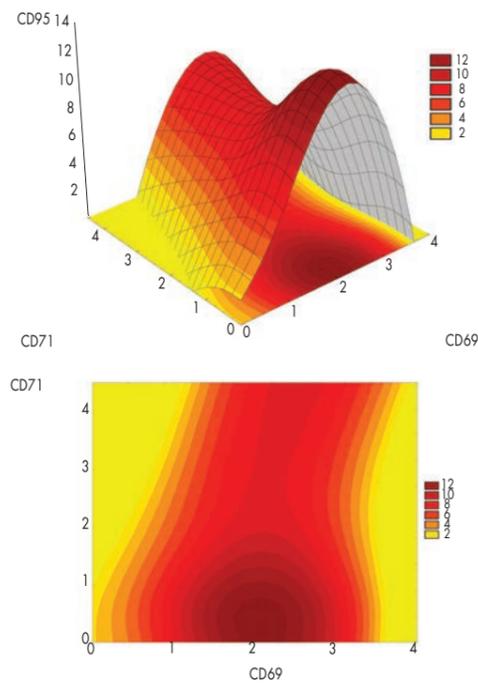


Рисунок 2. Зависимость уровня Т-лимфоцитов с рецепторами CD95 от уровня Т-лимфоцитов с рецепторами CD69, CD71 у детей при ЦМВИ. Оси отражают относительное количество лимфоцитов с рецепторами CD 69, CD 71, CD 95 в процентах
Figure 2. The dependence of T-lymphocytes to CD95 receptors on the level of T-cell receptor CD69, CD71 in children with CMV infection. The axes reflect the relative number of lymphocytes with the receptors CD 69, CD 71, CD 95 in percent

тат ДНК-диагностики, был обнаружен цитомегаловирус в крови или моче, и нарастание анти-ЦМВ- IgG, что позволило установить диагноз ЦМВИ.

Обнаружение возбудителя методом ПЦР проводилось с использованием наборов реагентов производства «Ампли Сенс» (ЦНИИ эпидемиологии, г. Москва) и оборудования, включающего многоканальный амплификатор ДНК «Терций» (производство ДНК-Технология г. Москва) с компьютером и программным обеспечением. Определение специфических антител классов IgG и IgM в сыворотке крови к цитомегаловирусу проводилось иммуноферментным методом (ИФА) с использованием стандартных наборов реактивов фирмы «Вектор-Бест», г. Новосибирск.

Экспрессию мембранных маркеров иммунокомпетентных клеток периферической крови определяли на проточном лазерном цитофлуориметре «Beckman-COULTER» EpicsXLII. Типирование лимфоцитов проводили с помощью моноклональных антител к кластерам дифференцировки CD3+, CD4+, CD8+, CD20+, CD69, CD71, CD95, фирмы IMMUNOTECH (Франция). Анализ корреляций 3-х признаков осуществлен графическим методом — карты линий уровня. Были также применены нелинейные методы, метод классификаций, диск-

риминантный анализ с оценкой точности, чувствительности, специфичности, прогностической ценности положительного и отрицательного результатов.

Для анализа многомерных нелинейных зависимостей использовали пакет PolyAnalyst 3.5 Pro, который позволяет от одновременного рассмотрения многих переменных перейти к рассмотрению синтезированной переменной в целях разделения двух групп.

Результаты и их обсуждение

В ходе проведенного исследования нами было показано, что при ЦМВИ в ряде случаев (16,3 %) обнаружение вируса и постановка диагноза имела место в возрасте старше 1 месяца. В то же время уже на первом месяце жизни у детей отмечалась клиническая симптоматика, которая носила неспецифический характер (табл. 1).

Полученные нами результаты согласуются с данными других исследователей о том, что отрицательный результат обследования ПЦР, полученный в первые дни жизни, не исключает возможности отсроченной реализации внутриутробной ЦМВИ [4].

Представленные трехмерные графики поверхностей (рис. 1, 2) убедительно демонстрируют выявленную

взаимосвязь между клетками с маркерами активации CD69, CD71, CD95 у новорожденных с ЦМВИ.

При незначительном повышении уровня лимфоцитов с маркерами активации CD69 и одновременном снижении клеток с маркерами активации CD71 отмечают наиболее высокие значения уровня CD95+ клеток. В противном случае (отсутствие ЦМВИ у новорожденного) при максимально повышенном уровне CD69 и CD71 отмечается наиболее высокий уровень CD95+. Выделение путем процедуры отсеивания статистически значимых для постановки диагноза ЦМВИ параметров (CD69 и CD95), объясняется тем, что индуцированный апоптоз в течение вирусной инфекции служит защитным механизмом элиминации вирус-инфицированных клеток.

Полученные данные позволили рассчитать формулу зависимости прогноза ЦМВИ у новорожденных, в случаях позднего обнаружения у них ДНК цитомегаловируса в моче или крови, однако имеющих с рождения неспецифическую клиническую симптоматику:

$$2,9 \times CD69 : (0,14 + CD69) \leq CD95 : (0,58 + CD69) < 2,9 \times CD69 : (0,14 + CD69) + 1,15$$

Прогноз цитомегаловирусной инфекции достоверен при выполнении данного неравенства с точностью 63%. В тоже время с точностью 95% следует исключить инфекцию, вызванную цитомегаловирусом, у новорожденного, если неравенство не выполняется ($p < 0,00001$). Чувствительность метода — 62%, специфичность — 92%. Прогностическая ценность положительного и отрицательного результата — 7,5 и 2,5 соответственно.

Обсуждая полученные результаты, необходимо отметить, что в отличие от контрольной группы, при ЦМВИ у детей отмечалась сниженная экспрессия на лимфоцитах маркера активации CD69 и практически отсутствие рецепторов к трансферрину (CD71), в то время когда уровень CD95 стремился к максимуму. Предполагается, что именно контакт рецептора с содержащимся в сыворотке трансферрином служит запускающим пролиферацию Т-клеток механизмом и, следовательно, его отсутствие нарушает этот механизм.

Несмотря на то, что эти изменения носят неспецифический характер, они являются значимыми для врача — педиатра и позволяют выделять детей группы риска, которым необходимо в обязательном порядке провести повторное обследование мочи на ПЦР в течение первых трех месяцев жизни, независимо от результатов первичного анализа и назначить превентивную терапию антицитомегаловирусным иммуноглобулином неонатотект.

Выводы

Полученная статистическая модель позволяет прогнозировать отсутствие ЦМВИ у новорожденных в случаях позднего обнаружения ДНК ЦМВ в крови и в моче у детей первых трех месяцев жизни с неспецифической

клинической симптоматикой, родившихся у матерей с хроническими воспалительными гинекологическими заболеваниями с точностью 95%. При прогнозировании наличия ЦМВИ точность прогноза заболевания составляет 63%. Прогноз ЦМВИ, не подтвержденной еще на первом месяце жизни ДНК-диагностикой, делает возможным своевременно начать специфическую терапию, следуя предписанным терапевтическим протоколом.

Литература/References:

1. Краснов В.В., Обрядина А.П. Клинико-лабораторная характеристика цитомегаловирусной инфекции у детей. Практическая медицина. 2012; 62 (7): 137–139. [Krasnov V.V., Obryadina A.P. Clinical and laboratory characteristics of cytomegalovirus infection in children. *Prakticheskaya Meditsina*. 2012; 62 (7): 137–139 (in Russ.)].
2. Кистенева Л.Б. Роль цитомегаловирусной инфекции в формировании перинатальной патологии. Детские инфекции. 2013; 3: 44–47. [Kisteneva L.B. The role of cytomegalovirus infection in the formation of perinatal pathology. *Detskie Infektsii=Children's Infections*. 2013; 3: 44–47 (in Russ.)].
3. Мангушева Я.Р., Хаетынова И.М., Мальцева Л.И. Цитомегаловирусная инфекция у детей. Практическая медицина. 2014; 83 (7): 11–14. [Mangusheva Ya.R., Khaetynova I.M., Maltseva L.I. Cytomegalovirus infection in children. *Prakticheskaya Meditsina*, 2014; 83 (7): 11–14 (in Russ.)].
4. Клинические рекомендации (протоколы) по неонатологии / ред. Д.О. Иванов. СПб: Информ-Навигатор, 2016; 464. [Clinical recommendations (protocols) for neonatology / ed. D.O. Ivanov. St. Petersburg. SPb: Inform-Navigator. 2016. (in Russ.)].
5. Кравченко Л.В. Неврологическая симптоматика у новорожденных детей с цитомегаловирусной инфекцией. ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2013; 5 (3): 52–58. [Kravchenko L.V., Afonin A.A. Neurological symptomatology in newborn babies with cytomegalovirus infection. *VICH-infekciya i Immunosupressii*. 2013; 5 (3): 52–58 (in Russ.)].
6. Сомова Л.М., Беседнова Н.Н., Плехова Н.Г. Апоптоз и инфекционные болезни. Инфекция и иммунитет. 2014; 4(4): 303–18. [Somova L.M., Besednova N.N., Plekhova N.G. Apoptosis and infectious diseases. *Infekciya i Immunitet*. 2014; 4(4): 303–18. (in Russ.)].
7. Кравченко Л.В., Афонин А.А., Демидова М.В. Нарушение иммунной системы при герпесвирусной инфекции. Детские инфекции 2012; 1(11): С. 33–37. [Kravchenko L.V., Afonin A.A., Demidova M.V. Infringements of Immune System at Herpes Virus Infection. *Detskie Infektsii=Children's Infections*. 2012; 1(11): С. 33–37. (in Russ.)].
8. Кравченко Л.В. Уровень цитокинов при Эпштейна-Барр вирусной инфекции у новорожденных и детей первых месяцев жизни. Современные проблемы науки и образования. 2017; 2: С. 79. [Kravchenko L.V. Level of cytokines at children in first mouths of life with the infection caused by the Epstein-Barr virus. *Sovremennye Problemy Nauki i Obrazovaniya*. 2017; 2: С. 79. (in Russ.)].

Конфликт интересов: Авторы подтвердили отсутствие конфликта интересов, финансовой поддержки, о которых необходимо сообщить.

Conflict of interest: The authors confirmed the absence conflict of interest, financial support, which should be reported.