

Оптимизация диагностики цитомегаловирусной инфекции у детей младшего возраста

А. В. ПЕРМЯКОВА, Н. С. ПОСПЕЛОВА, И. И. ЛЬВОВА

ФГБОУ ВО Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера Минздрава РФ, Пермь

Представлены результаты лабораторного обследования 520 детей в возрасте 1—3 лет. Обследование проводилось с целью определения ДНК цитомегаловируса в различных биологических средах, методом полимеразной цепной реакции у детей, с острой цитомегаловирусной инфекцией в форме инфекционного мононуклеоза.

Установлены различия вирусывыделения в кровь, слюну, и мочу: медиана вирусной нагрузки для слюны составляет 4,9 lg копий ДНК/мл, крови — 3,4 lg копий ДНК/мл, мочи — 3,85 lg копий ДНК/мл. С помощью математического моделирования установлены «пороговые» значения вирусной нагрузки, определяющие клиническую вероятность развития острой ЦМВИ, что дает возможность более точного и своевременного назначения этиотропной терапии.

Ключевые слова: цитомегаловирус, дети, вирусывыделение, полимеразная цепная реакция, вирусная нагрузка

Optimization of Diagnosis of Cytomegalovirus infection in Young Children

A. V. Permyakova, N. S. Pospelova, I. I. Lvova

Perm Medical State University named after E.A. Wagner, Perm, Russia

The results of a laboratory examination of 520 children aged 1—3 years are presented. The examination was conducted to determine the DNA of cytomegalovirus in children with acute cytomegalovirus infection in various biological media by polymerase chain reaction.

The differences in the virus shedding into the blood, saliva, and urine are established: the median of the viral load for saliva is 4.9 lg copies of DNA/ml, the blood 3.4 lg copies of DNA/ml, urine — 3.85 lg copies of DNA/ml. The cut of extreme values of the viral load are determined with the help of mathematical modeling which determine the clinical probability of developing acute CMV infection which allows for more accurate and timely assignment of etiotropic therapy.

Key words: cytomegalovirus, children, virus excretion, polymerase chain reaction, viral load

Для цитирования: А. В. Пермякова, Н. С. Поспелова, И. И. Львова. Оптимизация диагностики цитомегаловирусной инфекции у детей младшего возраста. Детские инфекции. 2018; 17(3):51-56. doi.org/10.22627/2072-8107-2018-17-3-51-56

For citation: A.V. Permyakova, N.S. Pospelova, I.I. Lvova. Optimization of diagnosis of cytomegalovirus infection in young children. Detskiye Infektsii=Children's Infections. 2018; 17 (3):51-56. doi.org/10.22627/2072-8107-2018-17-3-51-56

Контактная информация: Пермякова Анна Владимировна, к.м.н., доцент кафедры детских инфекционных болезней, ПГМУ имени ак. Е.А. Вагнера, Пермь, РФ; derucheva@mail.ru; orcid.org/0000-0001-5189-0347

A. Permyakova, PhD, Associate Professor, Department of Pediatric Infectious Diseases of Perm State Medical University, Perm, Russia; derucheva@mail.ru

Особенностью современной патологии детей раннего возраста является широкая распространённость инфекций герпесвирусной группы. Одним из значимых патогенов в семействе герпесвирусов является цитомегаловирус (ЦМВ). Цитомегаловирусная инфекция (ЦМВИ), вызываемая условно-патогенным внутриклеточным β -герпесвирусом 5 типа, имеет широкое распространение среди детей младшего возраста. По данным различных авторов инфицированность детей ЦМВ в последние годы повысилась на 30,0%, а среди новорожденных она возросла в 2,1 раза [1, 2]. После заражения, патогенетически, возможно развитие трех вариантов инфекционного процесса: первичное инфицирование ранее не болевшего человека, эндогенная реактивация вируса при латентном течении инфекционного процесса, экзогенная реинфекция другим штаммом ранее инфицированного индивида [3]. Первичное инфицирование цитомегаловирусом приходящееся на ранний детский возраст, может протекать как бессимптомно, так и в виде инфекционного мононуклеоза. Клинические проявления ЦМВ-реактивации/реинфекции неспецифичны, имеют много общего с другими герпесвирусными инфекциями, что не позволяет диагностировать заболевание только по клиническим признакам, поэтому лабораторная диагностика ЦМВИ и клиническая интерпретация результатов являются актуальными для практической педиатрии. В настоящее время в России для лабораторной ве-

рификации цитомегаловируса используются различные методы, в том числе, полимеразная цепная реакция (ПЦР), имеющая высокую специфичность и чувствительность.

Цель исследования: оптимизировать лабораторную диагностику цитомегаловирусной инфекции у детей путем определения количества ДНК цитомегаловируса в различных биологических средах при острой форме инфекции.

Материалы и методы исследования

Для решения поставленных задач обследовано 455 детей, направленных на прием педиатра-инфекциониста с явлениями острой респираторной инфекции (ОРИ) для выделения группы пациентов с острой (первичной и реактивированной) ЦМВ-инфекцией: у 351 ребенка имелись маркеры ЦМВ-инфекции, у 65 из них установлена острая форма ЦМВИ, эти дети составили основную группу исследования. Группу сравнения составили 43 ребенка с ОРИ, у которых маркеры острой ЦМВИ отсутствовали. Инфицирование цитомегаловирусом определяли по обнаружению следующих маркеров: прямых — ДНК вируса в крови, слюне и моче методом количественной ПЦР, косвенных — анти-IgM, анти-IgG антител, серологически. Согласно классификации отечественных авторов, маркерами острой формы ЦМВИ считали обнаружение ДНК ЦМВ в крови, наличие анти-ЦМВ IgM, причем при отсутствии анти-ЦМВ IgG определяли первичную инфекцию, при наличии анти-ЦМВ IgG — реактивацию [5]. Наличие ДНК ЦМВ в слю-

не/моче, без ДНК-емии расценивалось как проявление латентной формы инфекции. Критерии включения в группы исследования: возраст 1—3 года; наличие маркеров острой ЦМВИ (ДНК ЦМВ в крови) — для основной группы и отсутствие ДНК ЦМВ в крови — для группы сравнения, информированное согласие родителей (законных представителей) на участие в исследовании. Не включались в исследование дети с тяжелой врожденной патологией, острыми формами инфекции, вызванными другими герпесвирусами, бактериальными возбудителями (коклюш и пр). В качестве контроля было обследовано 65 клинически здоровых детей 1—3 лет, для выявления маркеров ЦМВИ. Условием включения в группу здоровых было отсутствие признаков острой респираторной инфекции на момент осмотра, а также эпизодов ОРВИ за предшествующие 2—3 месяца. Все группы по полу и возрасту были сопоставимы между собой, пациенты изучаемых групп обследовались и наблюдались амбулаторно.

Проспективное сравнительное исследование заключалось в анализе клинических и лабораторных данных пациентов. Клинический метод заключался в обследовании детей по общепринятым методикам: сбор жалоб, изучение анамнеза жизни и заболевания и объективное обследование. Лабораторное обследование выполнялось по стандартному плану: клинический анализ крови, общий анализ мочи, биохимический анализ крови. Все пациенты были обследованы на наличие маркеров герпесвирусных инфекций: методом ПЦР определяли ДНК ЦМВ, ВЭБ, ВГЧ-6 в крови, в слюне и моче — только ДНК ЦМВ, при серологическом исследовании крови (ИФА) выявляли антитела классов IgM к ЦМВ, ВЭБ, IgG к ЦМВ. Определение видоспецифических антител класса IgG к ЦМВ проводилось по методу ИХЛА, с использованием набора реагентов «CMV IgG Immulite 2000 Systems» на автоматическом анализаторе Иммулайт2000 («Siemens», США), антитела класса IgM к ЦМВ определяли с помощью иммуноферментного анализа, количественно (в АЕ), на планшетном фотометре Stat-Fax 2100 («Awareness Technology», США). ПЦР в режиме реального времени (Real-time) проводили на анализаторе IQ-5Cycler («BioRad», США) с использованием набора реагентов «АмплиСенс®CMV-скрин/монитор-FL». Количество ДНК цитомегаловируса в исследуемых образцах (вирусную нагрузку, ВН) измеряли числом копий ДНК на миллилитр среды. Для удобства расчетов интегральная шкала количественной оценки (коп/мл) была заменена на логарифмическую (lg/ml). Порог чувствительности метода в пересчете на логарифмическую шкалу составляет 2,6 lg ДНК ЦМВ/мл. Вирусную нагрузку обозначали как $N \log 10$, где N — это степень, в которую возводится 10. Все полученные значения вирусной нагрузки ЦМВ ранжировались по следующей схеме: $BH \geq 6,0 \lg$ — высокая вирусная нагрузка, $4,0 \lg \leq BH < 6,0 \lg$ — средняя вирусная нагрузка, $BH < 4,0 \lg$ — низкая вирусная нагрузка [4].

Данные, полученные в результате исследования упорядочивались и систематизировались, определялся их исходный тип, вид распределения, что предполагало выбор метода статистического анализа. Количественные переменные, распределенные по нормальному закону, описывали при помощи следующих характеристик: среднее значение (M), ошибка среднего (m), с указанием доверительного интервала (ДИ). Связи между номинальными и

порядковыми переменными рассчитывали с использованием критериев хи-квадрат (χ^2) на основании таблиц сопряженных признаков.

Рассчитывали чувствительность (Se) и специфичность (Sp) количественного ПЦР-метода для исследуемых сред. Чувствительность выражает долю пациентов с острой ЦМВИ точно идентифицированных тестом, специфичность выражает долю пациентов без острой ЦМВИ также точно идентифицированных тестом. Для построения математической модели использовали регрессионный анализ. Поскольку зависимая переменная (наличие острой ЦМВИ у пациента) бинарна и подчиняется биномиальному закону распределения, применяли логистическую регрессию. Модель логит-регрессии представляет вероятность возникновения определенного события по значениям множества количественных переменных следующим образом: $\text{Logit}(p) = \ln(p/(1-p))$, где p является оценкой условной вероятности того, что пациент будет иметь острую ЦМВИ, а $(1-p)$ — это условная вероятность того, что пациент не будет иметь острую ЦМВИ. Отношение $(p/(1-p))$ определяет шансы, или относительную вероятность одной из двух этих ситуаций. Относительную вероятность того, что конкретный ребенок i будет иметь острую ЦМВИ, рассчитывали путем экспонирования представленного выше уравнения: $= 1 / (1 + e^{-z_i})$, где p_i — вероятность того, что произойдет интересующее событие, e — основание натурального логарифма, z_i — линейная комбинация предикторов, $z_i = a + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_kx_k$, где b — коэффициенты логистической регрессии. Проверку значимости модели осуществляли при помощи критерия χ^2 , отвергающего нулевую гипотезу, что все оцениваемые коэффициенты равны нулю, и коэффициента R^2 , характеризующего долю вариации результативного признака y , объясняемую регрессией, в общей вариации (дисперсии). Качество созданной математической модели оценивали при помощи построения ROC-кривой и определения площади под ней AUC (Area under ROC). С большими допущениями можно считать, что чем больше показатель AUC, тем лучшей прогностической силой обладает модель, «идеальное» значение равно 1,0. Обработку полученных результатов исследования проводили на персональном компьютере с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel 2010, STATISTICA 10, Deductor Studio, Biostat.

Результаты и их обсуждение

Острая цитомегаловирусная инфекция у всех детей основной группы протекала в форме инфекционного мононуклеоза. Типичная клиника заболевания имела место у 49,2% (32/65) детей основной группы. У остальных детей (50,8% 33/65) клиническая картина была стертой, гепатомегалия отсутствовала, лимфаденопатия отмечена у 75,7% (25/33) детей, лихорадка более 5 дней у 65,0% (21/33) детей. В группе сравнения острое респираторное заболевание протекало по типу ларинготрахеита у 35,0% (15/43), бронхита у 19,0% (8/43), фаринготонзиллита у 16,0% (7/43), отита (синусита и/или гайморита) у 28,0% (12/43) детей, признаки бронхообструктивного синдрома отмечены в 12,0% (5/43) случаев. Лимфаденопатия в группе сравнения отмечена у 16,2% (7/43) детей, длительность лихорадочного периода составляла 1—3 дня у 51,0% (22/43) пациентов, 4—6 дней — у 49,0% (21/43) детей. По результатам серологического обследования анти-ЦМВ

Таблица 1. Ранжирование вирусной нагрузки ЦМВ в моче и слюне (основная группа и группа сравнения)
Table 1. Ranking of CMV viral load in urine and saliva (main group and comparison group)

Viral load	In saliva				p	In urine				p
	Main group (n = 65)		Comparison group (n = 43)			Main group (n = 65)		Comparison group (n = 43)		
	Abs.	%	Abs.	%		Abs.	%	Abs.	%	
None	1	1,5	13	30,0	0,0001	13	20,0	20	46,5	0,007
Low	4	6,0	21	49,0	0,0001	27	41,0	23	53,5	0,307
Medium	47	72,0	9	21,0	0,0001	22	34,0	0	0,0	0,0001
High	13	20,0	0	0,0	0,005	3	5,0	0	0,0	0,163

IgG антитела выявлены у 57,0% (37/65) детей основной группы, 81,0% (35/43) детей группы сравнения и у 82,6% (38/46) клинически здоровых детей. Анти-ЦМВ IgM имели 55,4% (36/65) детей только в основной группе.

Методом ПЦР исследовали кровь, слюну и мочу. В крови ДНК цитомегаловируса обнаружена у всех пациентов основной группы, что являлось условием включения в исследование. В слюне детей основной группы ДНК ЦМВ определялась у 99,0% (64/65) детей, против 69,7% (30/43) в группе сравнения, и 60,0% (28/46) среди здоровых ($p = 0,0001$). В моче ДНК вируса определялась у 80,0% (52/65) детей основной группы, против 53,5% (23/43) в группе сравнения, и 26,0% (12/46) у клинически здоровых ($p = 0,007$). Таким образом, ПЦР-позитивных результатов в основной группе было больше как для слюны (99,0 против 69,7%, $p = 0,0001$), так и для мочи (80,0 против 53,5%, $p = 0,007$). Полученные в результате измерений значения вирусной нагрузки ранжировали по трем степеням — низкой, средней и высокой, вычисляли среднее значение и медиану. При сравнительном анализе медиан вирусной нагрузки в биологических средах детей основной группы, установлены достоверные отличия: кровь — $3,4 \lg \pm 0,2$ копий ДНК/мл (ДИ 3,4;3,7), слюна — $4,9 \lg \pm 0,1$ копий ДНК/мл (ДИ 4,8;5,4), моча — $3,85 \lg \pm 0,2$ копий ДНК/мл (ДИ 3,6;4,2), (критерий Крускала-Уоллиса $N = 7$, $df = 2$, $p = 0,0001$). В крови детей группы сравнения вирусная ДНК не обнаружена, в слюне медиана вирусной нагрузки составила $2,9 \pm 0,1 \lg$ копий ДНК/мл (ДИ 2,6;3,1), в моче — $2,8 \pm 0,1 \lg$ копий ДНК/мл (ДИ 2,6;3,0), без достоверных различий. У клинически здоровых детей вирусная ДНК в крови также не была обнаружена, медиана вирусной нагрузки для слюны составила $2,9 \pm 0,1 \lg$ копий ДНК/мл (ДИ 2,6;3,2), для мочи — $3,6 \lg$ копий ДНК/мл (ДИ 3,1;3,9). При распределении значений вирусной нагрузки по степеням, достоверные отличия определены только для слюны: в основной группе преобладали средние и высокие значения, составив 92% (против 9,0% в группе сравнения, $p = 0,0001$) (табл. 1).

Только в слюне детей основной группы определялась высокая степень вирусной нагрузки (20,0%). В крови все значения были низкими и средними. В моче детей основной группы низкая и средняя степень вирусной нагрузки составила 75,0% всех значений, высокая — 5,0%.

По наличию ЦМВ-маркеров группа сравнения оказалась сопоставима с группой практически здоровых детей,

так, серопозитивность к ЦМВ (IgG) составила 81,0 и 82,6% соответственно, вирусовыделение в слюне 69,0 и 60,0%, вирусовыделение в моче 53,0 и 26,0%. Определены медианы значений вирусной нагрузки: для слюны $2,9 \pm 0,1 \lg$ копий ДНК/мл в обеих группах, для мочи — $2,8 \pm 0,1 \lg$ копий ДНК/мл в группе сравнения, в группе здоровых — $3,6 \lg$ копий ДНК/мл. Распределение значений вирусной нагрузки в слюне здоровых детей было похоже на таковое в группе сравнения: доля отрицательных значений составила 39,2%, низких — 50,0%, средних — 10,8%, высоких значений не было. В моче здоровых детей высокие значения вирусной нагрузки отсутствовали, на долю низких и средних пришлось 26,0%. Очевидно, что в отсутствие ДНК-емии и анти-ЦМВ IgM, вышеперечисленные маркеры свидетельствуют об инфицировании и латентном течении инфекционного процесса. Таким образом, для дальнейшего построения математической модели острой цитомегаловирусной инфекции, использовали результаты основной группы и группы сравнения.

Надежность метода ПЦР для верификации цитомегаловируса в слюне и моче оценивали, рассчитав чувствительность и специфичность. В основной группе, при определении вирусной нагрузки в слюне 99,0% (64/65) образцов определялись как ПЦР-положительные, в группе сравнения — 69,7% (30/43). Построена таблица 2x2 частот. Таким образом, из 65 человек имеющих острую ЦМВИ, 64 имеют положительные результаты тестирования (истинно-положительные, TP), а 1 человек имеет отрицательный результат тестирования (ложно-отрицательный, FN), из 43 не имеющих острой ЦМВИ 13 человек имеют истинно-отрицательные (TN) результаты тестирования, а 30 имеют ложно-положительные результаты (FP). Таким образом, чувствительность (Se), выражающая долю пациентов с ЦМВИ, точно идентифицированных тестом по слюне равна: $Se = 64/65 = 0,98$ (98,0%), ДИ(0,92;0,99). Специфичность (Sp), выражающая долю пациентов без ЦМВИ, которые точно идентифицированы тестом, равна: $Sp = 13/43 = 0,36$ (36,0%), ДИ(0,31;0,39). Для того чтобы определить, с какой вероятностью пациент имеет/не имеет острую ЦМВИ при положительном результате ПЦР слюны, рассчитали прогностичность положительного результата теста (+ VP, positive predictive value), определяемую, как отношение доли пациентов с истинно положительным значением (TP), к общей доле положительных результатов (TP + FP), $+ VP = (TP)/(TP + FP)$; $+ VP$ (ПЦР слюны) = $64/94 =$

$= 0,68 = 68,0\%$, ДИ (0,61;0,75). Прогностичность отрицательного результата теста (-VP, negative Predictive value), определяемая, как вероятность отсутствия заболевания при отрицательном результате ПЦР-исследования слюны, рассчитывается как отношение доли пациентов с истинно-отрицательным значением (TN), к общему числу отрицательных результатов (TN + FN), $-VP = (TN) / (TN + FN)$; $-VP$ (ПЦР слюны) $= 13 / 14 = 0,92 = 92,0\%$, ДИ (0,91;0,98).

В практической работе, при проведении диагностического теста, врача, прежде всего, интересует, насколько высока вероятность болезни у лиц с положительным результатом и насколько она низка у лиц с отрицательным результатом, для определения этой вероятности рассчитали отношение правдоподобия (LR, like liho od ratio). Отношение правдоподобия для положительного результата, $LR(+)$: $LR(+) = Se / (1 - Sp)$, для отрицательного результата $LR(-)$: $LR(-) = (1 - Se) / Sp$. $LR(+)$ для ПЦР слюны $= 1,53$, $LR(-)$ для ПЦР слюны $= 0,06$. Полученное нами для положительного результата ПЦР слюны значение $LR(+)$ $= 1,53$ означает, что положительный результат, по-видимому, встречается в 1,5 раза чаще при острой форме ЦМВИ, чем при ее отсутствии.

При определении вирусной нагрузки в моче в основной группе 80,0% (52/65) проб определялись как ПЦР-положительные, в группе сравнения — 53,5% (23/43). Построена таблица 2x2 частот. Таким образом, из 65 человек с острыми формами ЦМВИ 52 имеет положительные результаты тестирования (истинно-положительные, TP), а 13 человек имеет отрицательные результаты тестирования (ложно-отрицательные, FN), из 43 детей группы сравнения, не имеющих острой ЦМВИ, 20 имеет истинно-отрицательные (TN) результаты тестирования, а 23 — ложно-положительные (FP). Таким образом, чувствительность (Se), выражающая долю пациентов с ЦМВИ, точно идентифицированных тестом по моче, равна $Se = 52 / 65 = 0,80$ (80,0%), ДИ (0,73;0,89). Специфичность (Sp), выражающая долю пациентов без ЦМВИ, которые точно идентифицированы тестом равна $Sp = 20 / 43 = 0,46$ (46,0%), ДИ (0,41;0,51). Прогностичность положительного результата теста + VP (ПЦР мочи) $= 52 / 75 = 0,69 = 69,0\%$, (ДИ 0,62;0,78). Прогностичность отрицательного результата теста -VP (ПЦР мочи) $= 20 / 33 = 0,6 = 60,0\%$, (ДИ 0,56;0,81). Отношение правдоподобия: $LR(+)$ для ПЦР мочи $= 1,48$, $LR(-)$ для ПЦР мочи $= 0,4$. Полученное для положительного результата ПЦР мочи значение $LR(+)$ $= 1,48$ означает, что положительный результат, встречается в 1,4 раза чаще при ЦМВИ, чем при ее отсутствии.

Подводя итоги оценки надежности тестирования ДНК ЦМВ в слюне и моче, следует заметить, что для обеих сред определена достаточно высокая чувствительность (доля больных точно идентифицированных тестом — 98% и 80,0%), и низкая специфичность, которая не дает возможности отделить здоровых от больных, таким образом, только качественного обнаружения присутствия ДНК ЦМВ в слюне и моче недостаточно для практического применения. Для повышения точности идентификации больных острой ЦМВИ методом ПЦР необходимо применить количественную методику, а именно рассчитать количество вируса (вирусную нагрузку) соответствующее острой стадии инфекции. Очевидно, что именно численное значение количества ДНК ЦМВ, при условии высокой чувствительности и специ-

фичности может быть использовано в качестве диагностического инструмента. Осуществить подобный расчет возможно при помощи математического моделирования.

Математическое моделирование осуществляли посредством регрессионного анализа. Независимой переменной модели (вход, предиктор) в нашем случае являлось значение вирусной нагрузки, выраженное десятичным логарифмом; зависимая переменная (отклик, выход) — наличие острой формы ЦМВИ у пациента (да/нет, 1/0). Поскольку зависимая переменная бинарна, применяя логит-преобразование в уравнении регрессии, вычислена вероятность того, что пациент классифицируется в ближайшую категорию зависимой переменной. Для построения математической модели классифицирующей распределение вирусной нагрузки в слюне учитывались 108 результатов ПЦР-анализа слюны (основная группа и группа сравнения). Получено линейное уравнение регрессии: $y = -6,68 + 1,75x$, где x -значение десятичного логарифма вирусной нагрузки. Далее, подставив любое значение вирусной нагрузки, в уравнение регрессии $p = 1 / (1 + e^{-(6,68 + 1,75x)})$, получили значение вероятности наличия острой ЦМВИ при данной вирусной нагрузке. Если рассчитанное значение вероятности «у» равно или больше 0,5, то данного больного следует отнести в группу больных, у которых острая ЦМВИ высоковероятна. Классификационная способность модели определялась по данным обучающей выборки и составила 95%. Чувствительность модели оказалась равной 88,0%, а специфичность — 87,5%.

В медицинской практике модель классификации пациентов на больных и здоровых называется диагностическим тестом. Чувствительный диагностический тест проявляется в гипердиагностике — максимальном предотвращении пропуска больных. Специфичный диагностический тест диагностирует только подлинно больных. Определение положительного и отрицательного события зависит от конкретной задачи. В нашем случае положительным определен класс «пациент больной острой формой ЦМВИ», отрицательным — «пациент без острой ЦМВИ». Идеальная модель обладает 100% чувствительностью и специфичностью. Однако на практике добиться этого невозможно, более того, невозможно одновременно повысить и чувствительность, и специфичность модели. Компромисс находится с помощью порога отсеечения, т.к. пороговое значение определяется соотношением чувствительности и специфичности. В этих случаях принято говорить о задаче нахождения оптимального порога отсеечения (optimal cut-off value). Порог отсеечения нужен для того, чтобы применять модель на практике, а именно относить новые примеры к одному из двух классов.

Для уточнения оптимального порога нужно задать критерий его определения, т.к. в разных задачах присутствует своя оптимальная стратегия. В нашем случае критерием выбора порогового значения был определен баланс между чувствительностью и специфичностью, т.е. когда $Se \approx Sp$: cut-off $= \min / Se - Sp$. Проведена оценка качества созданной модели с помощью построения ROC-кривой. Предиктор — результат решения диагностической задачи с помощью логистической регрессионной модели для каждого ребенка, включенного в матрицу обучающей информации (у, прогноз). Отклик — наличие (1) или отсутствие (0) острой ЦМВИ. Графически определен оптимальный порог отсеечения (cut-off value) — то значение вирусной нагрузки, при ко-

тором чувствительность приблизительно равна специфичности, и которая показывает, после какого значения вероятности один класс сменяется другим, в нашем случае оптимальный порог для значений вирусной нагрузки ДНК ЦМВ в слюне, cut-off = 4,1 lg (Se = 0,85, Sp = 0,83). Точка отсечения в 4,1 lg значит, что все значения $BH \leq 4,1 \lg$, могут трактоваться, как острая ЦМВИ. Вероятность острой ЦМВИ при значении $BH = 4,1 \lg$ составляет 65,0%. Максимальная специфичность теста (определение подлинно больного пациента) будет соответствовать значениям $BH \geq 5,0 \lg$ и выше.

Эта же методика математического моделирования была применена к результатам определения вирусной нагрузки ДНК ЦМВ в моче больных основной группы и группы сравнения. Учитывались данные значений вирусной нагрузки ДНК ЦМВ в 108 результатах ПЦР-анализа мочи. Получено линейное уравнение регрессии: $y = -0,65 + 0,45x$, где x — значение десятичного логарифма вирусной нагрузки. Далее, вычислили значение вероятности наличия острой ЦМВИ при каждом конкретном значении вирусной нагрузки. Классификационная способность модели определялась по данным обучающей выборки и составила 72,0%. Чувствительность модели оказалась равной 69,0%, а специфичность — 60,0%. Проведена оценка качества созданной модели с помощью построения ROC-кривой. Из анализа графического представления ROC-кривой определили, что в оптимальной точке отсечения показатель чувствительности равен Se = 65,0%, специфичности Sp = 67,0%, данной точке баланса соответствует значение $BH = 3,1 \lg$. Точка отсечения в 3,1 lg значит, что все значения $BH \geq 3,1 \lg$, могут трактоваться, как острая форма ЦМВИ. Вероятность острой ЦМВИ при значении $BH = 3,1 \lg$ составляет 67,0%. Максимальная специфичность теста (определение подлинно больного пациента) соответствует значениям $BH \geq 3,9 \lg$ и выше.

Таким образом, результаты математического моделирования, обосновывают предпочтительный выбор слюны, как объекта исследования: классификационная способность модели для слюны оказалась выше — 95,0% (для мочи — 72,0%), с приемлемыми показателями чувствительности и специфичности (Se = 88,0%, Sp = 87,5%, для мочи Se = 69,0%, Sp = 60,0%); пороговое значение вирусной нагрузки (cut-off) для слюны имеет более высокие значения чувствительности и специфичности (Se = 85,0%, Sp = 83,0%, для мочи Se = 65,0%, Sp = 67,0%); коэффициент R^2 , характеризующий долю вариации результативного признака y , объясняемую регрессией, для слюны гораздо больше и составляет $R^2 = 0,5$, а для мочи $R^2 = 0,12$, что означает, применимость результатов моделирования в каждом втором случае для слюны и лишь в 12% — для мочи; значение χ^2 тестирующее нулевую гипотезу для слюны гораздо выше (69,2 против 15,4, $p = 0,0001$); площадь под ROC-кривой для слюны составила AUC = 0,93, что является максимальным приближением к «идеальному» тесту, для мочи AUC = 0,72.

В клинической практике приоритетное значение имеет определение вирусной нагрузки в крови больного (лейкоциты, плазма). Возможная зависимость между цитомегаловирус-ассоциированным заболеванием и вирусной нагрузкой описана еще в 1975 г. в работах S. Stagno и соавт., использовавших культуру клеток [6]. Эти данные были

впоследствии подтверждены S. Walter и соавт. в 2007 г. с использованием ПЦР высушенных образцов крови [7]. В последующих работах различных авторов было убедительно показано, что клинически выраженная цитомегаловирусная инфекция достоверно чаще развивается у лиц с высокой вирусной нагрузкой, нежели у пациентов со средним, низким или минимальным уровнем ДНК цитомегаловируса в крови.

Помимо крови, цитомегаловирус может быть обнаружен и в других биологических жидкостях организма — слюне, моче, грудном молоке и т.п., что вызывает особый интерес исследователей в последние годы [8, 9]. Обнаружение в образцах слюны и мочи у детей первых дней жизни ДНК цитомегаловируса, даже без учета его количества, может свидетельствовать о цитомегаловирусном заболевании. Однако у детей старше месяца жизни одного качественно обнаружения ДНК вируса в слюне и моче для определения цитомегаловирусного статуса совершенно недостаточно, так как известно, что частота вирусывыделения в слюне и моче у клинически здоровых лиц составляет от 10 до 50% в зависимости от возраста. Поэтому, совершенно необходимым является ранжирование значений вирусной нагрузки ДНК ЦМВ, с последующим сопоставлением с клиническими данными, что и было выполнено в данном исследовании. В литературе имеются подобные описания, так, например, J. Nijman (2012 г.) определил вирусную нагрузку ДНК ЦМВ в моче, соответствующую врожденной цитомегаловирусной инфекции, равную 7,9 lg копий/мл, Р. Р. Климова (2014 г.) определила вирусную нагрузку ДНК в слюне в острый период лихорадочного заболевания, соответствующую 6,3 lg копий/мл, в исследовании Н.В. Околышевой (2017 г.) установлено, что чем выше вирусная нагрузка ЦМВ в слюне, тем тяжелее протекает ОРВИ у детей в возрасте до 6 месяцев [10–12].

При ранжировании значений вирусной нагрузки особый интерес вызывает вычисление отсекающего («cut-off») значения, то есть того значения, после которого вероятность заболевания становится практически значимой (принято считать, более 50,0%). Определение «порогового» значения представляет несомненный практический интерес, так как позволяет получить дополнительный критерий для назначения этиотропной терапии. Именно поэтому «cut-off» при цитомегаловирусной инфекции обсуждается, прежде всего, в трансплантологии. В работе R. Peres (2010 г.) продемонстрирован алгоритм подбора значений «cut-off» вирусной нагрузки в лейкоцитах крови для прогнозирования цитомегаловирусного заболевания. Показано, что с ростом значений вирусной нагрузки происходит повышение специфичности и значительное снижение чувствительности теста [13], в исследовании С. Martin-Gandul (2013 г.) установлено, что «cut-off» ДНК цитомегаловируса в цельной крови для начала превентивной терапии, соответствует 3,4 lg копий/мл [14]. Однако следует заметить, что имеются многочисленные публикации, в которых приводятся и другие значения «cut-off». Очевидно, что «cut-off» значения вирусной нагрузки могут быть разными для различных биологических сред, иметь возрастные особенности, а также зависеть от набора праймеров в конкретной лаборатории.

Выводы

■ При острой цитомегаловирусной инфекции в форме инфекционного мононуклеоза происходит выделение вируса в биологические среды организма, такие как кровь, слюна, моча. При этом максимальное количество вируса определяется в слюне, превышая значения 6 lg копий/мл (медиана — 4,9 lg копий ДНК/мл), в крови и моче количество вируса находится в области низких и средних значений вирусной нагрузки (медианы — 3,4 lg копий ДНК/мл и 3,85 lg копий ДНК/мл соответственно).

■ Латентное течение цитомегаловирусной инфекции сопровождается выделением вируса в биологические среды, такие как слюна и моча у большинства детей: медиана значений вирусной нагрузки составляет для слюны 2,9 lg копий ДНК/мл, для мочи — 2,8 lg копий ДНК/мл.

■ При оценке надежности ЦМВ-тестирования методом ПЦР слюны и мочи, определена достаточно высокая чувствительность (98,0% и 80,0%), и низкая специфичность (36,0% и 46,0%), что не позволяет использовать качественный вариант метода в практике.

■ В качестве дублирующей среды исследования для диагностики острой формы цитомегаловирусной инфекции, можно использовать слюну. Учитывая неинвазивность забора материала, метод предпочтителен для применения у детей на этапе доклинического, скринингового обследования.

■ Математическая модель определяет, что значения вирусной нагрузки ДНК ЦМВ в слюне выше 4,1 lg копий ДНК/мл, с вероятностью более 65,0% соответствуют острым формам ЦМВИ, что дает возможность более точного и своевременного назначения этиотропной терапии.

Литература / References:

1. Долгих Т.И., Долматов В.З., Гашина Е.А. Эпидемиологические аспекты цитомегаловирусной инфекции у детей первого года. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2004; 5: 26—30.
[Dolgikh T.I., Dolmatov V.Z., Gashina E.A. Epidemiological aspects of cytomegalovirus infection in children of the first year. Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunologii. 2004; 5: 26—3. (In Russ.).]
2. Каражас Н.В., Рыбалкина Т.Н., Евсеева Л.Ф. Цитомегаловирусная инфекция у беременных и новорожденных. Актуальные вопросы эпидемиологии, дерматологии, инфекционных болезней: сб. науч. тр. 2002; 188—190.
[Karazhas N.V., Rybalkina T.N., Evseeva L.F. Cytomegalovirus infection in pregnant and newborns. Aktual'nye voprosy ehpidemiologii, dermatologii, infektsionnykh boleznej: collection of scientific papers. 2002; 188—190. (In Russ.).]
3. Rubin R. H. The pathogenesis and clinical management of cytomegalovirus infection in the organ transplant recipient: the end of the «silo hypothesis». Curr. Opin. Infect. Dis., 2007, 20(4): 399—407.
4. Леготина Н.С., Львова И.И., Дерюшева А.В. Способ оценки эффективности терапии хронической цитомегаловирусной инфекции у детей. Российская Федерация, пат. № 2566074. 20.10.2015.
[Legotina N.S., Lvova I.I., Derjushcheva A.V. Method of estimating efficiency of therapy of chronic cytomegaloviral infection in children. Russian Federation, patent № 2566074. 20.10.2015. (In Russ.).]
5. Каражас Н.В., Малышев Н.А., Рыбалкина Т.Н., Калугина М.Ю., Бошняк Р.Е. Кистенева Л.Б., Чешик С.Г., Мазанкова Л.Н. Герпесвирусная инфекция (эпидемиология, клиника, диагностика, профилактика и лечение): Методические рекомендации. М.: Спецкнига. 2007:28.
[Karazhas N.V., Malyshev N.A., Rybalkina T.N., Kalugina M.YU., Bosh'yan R.E. Kisteneva L.B., Cheshik S.G., Mazankova L.N. Herpesvirus infections in children (epidemiology, clinic, diagnosis,

- treatment and prevention): a method. recommendations: M. Speckniga, 2007:28. (In Russ.).]
6. Stagno S., Reynolds D.W., Tsiantos A., Fuccillo D.A., Long W., Alford C.A. Comparative serial virologic and serologic studies of symptomatic and subclinical congenitally and natively acquired cytomegalovirus infections. J Infect Dis. 1975; 132:568—77.
 7. Walter S., Atkinson C., Sharland M., Rice P., Raglan E., Emery V.C. Congenital cytomegalovirus: association between dried blood spot viral load and hearing loss. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 2008; 93:280—5. DOI: 1.1136 / adc.2007.119230.
 8. Manal F., David M., Martha F., Jeffrey M. Severe late-onset multi-system cytomegalovirus infection in a premature neonate previously treated for congenital infection. BMC Pediatrics. 2013; 13: 142.
 9. Waters A., Jennings K., Fitzpatrick E., Coughlan S., Molloy E.J., De Gascun C.F. Incidence of congenital cytomegalovirus infection in Ireland: implications for screening and diagnosis. J Clin Virol. 2014; 59:156—160.
 10. Nijman J., van Loon A.M., de Vries L.S., Koopman-Esseboom C., Groenendaal F., Uiterwaal C.S., Verboon-Macolek M. A. Urine viral load and correlation with disease severity in infants with congenital or postnatal cytomegalovirus infection. J Clin Virol. 2012; 54(2):121—24. DOI:10.1016 / j.jcv.2012.02.017.
 11. Климова Р.Р., Околышева Н.В., Чичев Е.В., Тюленев Ю.А., Кистенева Л.Б., Малиновская В.В., Куц А.А. Частота обнаружения герпесвирусных инфекций у часто болеющих детей с острой респираторной инфекцией и их влияние на тяжесть заболевания. Педиатрия 2014; 93: (1): 44—49.
[Klimova R.R., Okolisheva N.V., Chochev E.V., Tulenev Y.A., Kisteneva L.B., Malinovskaya V.V., Kusch A.A. The frequency of detection of herpesvirus infections in frequently ill children with acute respiratory infections and their influence on disease severity. Pediatriya. 2014; 93: (1): 44—49. (In Russ).]
 12. Околышева Н.В., Кистенева Л.Б., Выжлова Е.Н., Малиновская В.В., Чешик С.Г., Парфенов В.В. и др. Влияние виферонотерапии на вирусологическую и клинко-иммунологическую характеристику детей раннего возраста с острой респираторной вирусной инфекцией. Рос вестн перинатол и педиатр. 2015; 60: (2): 78—86.
[Okolisheva N.V., Kisteneva L.B., Vishlova E.N., Malinovskaya V.V., Cheshik S.G., Parfenov V.V. et al. The influence of viferon therapy on virological and clinico-immunological characteristics in children of early age with acute respiratory viral infection. Ross Vestn Perinatol i Pediatr. 2015; 60: (2): 78—86. (In Russ).]
 13. Peres Renata M.B., Cláudia R.C. Costa, Paula D. Andrade, Sandra H.A. Bonon, Dulcinéia M. Albuquerque, Cristiane de Oliveira, Vigorito C.A., Aranha Francisco J.P., Souza A. de Cármino, Costa C.B. Sandra. Surveillance of active human cytomegalovirus infection in hematopoietic stem cell transplantation (HLA sibling identical donor): search for optimal cutoff value by real-time PCR. BMC infectious diseases. 2010;10: 147.
DOI: 10.1186 / 1471-2334-10-147.
 14. Martin-Gandul C., Perez-Romero P., Sanchez M., Bernal G., Suárez G., Sobrino M., Merino L., Cisneros J.M., Cordero E. Determination, validation and standardization of a CMV DNA cut-off value in plasma for preemptive treatment of CMV infection in solid organ transplant recipients at lower risk for CMV infection. J. Clin. Virol. 2013; 56 (1): 13—18. DOI: 10.1016 / j.jcv.2012.09.017.

Информация о соавторах:

Поспелова Наталья Сергеевна (N. Pospelova), ассистент кафедры детских инфекционных болезней, ПГМА им. ак. Е.А. Вагнера Минздрава РФ, Пермь, kulikalova@mail.ru; orcid.org/0000-0003-0075-0226

Львова Ирина Иосифовна (I. Lvova), д.м.н., профессор, зав. кафедрой детских инфекционных болезней, ПГМА им. ак. Е.А. Вагнера Минздрава РФ, Пермь, iilvova@yandex.ru; orcid.org/0000-0002-0599-7845

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