

На правах рукописи

ПОСПЕЛОВА НАТАЛЬЯ СЕРГЕЕВНА

**ОПТИМИЗАЦИЯ ДИАГНОСТИКИ
ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ РАННЕГО
ВОЗРАСТА В АМБУЛАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ**

14.01.09 – инфекционные болезни

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель

Доктор медицинских наук,
профессор

ЛЬВОВА Ирина Иосифовна

Научный консультант

Кандидат медицинских наук,
доцент

МЕЛЕХИНА Елена Валериевна

Официальные оппоненты:

Хмилевская Светлана Анатольевна – доктор медицинских наук, профессор кафедры педиатрии ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского» Минздрава России

Чешик Святослав Георгиевич – доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории хронических вирусных инфекций отдела вирусных гепатитов и клинической вирусологии подразделения Институт Вирусологии им. Д.И. Иванковского ФГБУ «Научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «___» _____ 2019 г. в _____ на заседании диссертационного совета Д 208.114.01 в Федеральном бюджетном учреждении науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д.3а

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека и на сайте www.crie.ru

Автореферат разослан «___» _____ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат медицинских наук

Николаева Светлана Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Особенностью современной патологии детей раннего возраста является широкая распространённость инфекций герпесвирусной группы. Условно-патогенный бета-герпесвирус 5 типа (цитомегаловирус) – один из значимых патогенов в семействе герпесвирусов – вызывает цитомегаловирусную инфекцию (ЦМВИ), широко распространённую у детей раннего возраста [Симованьян Э.Н., 2011, Бабаченко И.В., 2012, Тимченко В.Н., 2012, Боковой А.Г., 2014]. Показатели инфицированности населения цитомегаловирусом (ЦМВ) в зависимости от возраста, уровня материального благополучия, составляют от 20 до 95% [Симованьян Э.Н., 2011, Сабитов А.У., 2013]. Среди госпитализированных пациентов с внутриутробным механизмом передачи инфекции, преобладают дети первого года жизни, страдающие цитомегаловирусной инфекцией [Орджоникидзе Н.В., 2002, Никонов А.П., 2007].

Клинические проявления ЦМВИ у амбулаторных пациентов, кроме цитомегаловирусного мононуклеоза, неспецифичны и представлены иммунопатологическими синдромами: самым распространённым – инфекционным (или синдромом нарушения противоинфекционной защиты) и лимфопролиферативным и их сочетаниями [Абдуллаев А.К., 2011, Соколова Т.И., 2011, Савенкова М.С., 2016].

В настоящее время в России для лабораторной верификации ЦМВИ используются следующие методы: прямые 1) вирусологический – «золотой» стандарт диагностики, являющийся дорогим и трудоёмким; 2) цитологический, имеющий крайне низкую чувствительность; 3) методика иммуногистохимии и иммуноцитохимии с использованием моноклональных антител, позволяющая определять антиген вируса в тканях и клетках пациента; 4) полимеразная цепная реакция (ПЦР) для амплификации ДНК качественным и количественным способом в реальном времени и косвенные – определение анти-ЦМВ IgM, IgG методом иммуноферментного анализа (ИФА), а также индекса avidности IgG (ИА%) [Краснов В.В., 2012, Исаков В.А., 2013, Каражас Н.В., 2017, Torok E. et al., 2017]. Каждый метод имеет определённое научно-практическое значение. Однако, благодаря высокой специфичности и чувствительности, метод ПЦР даёт возможность осуществлять детекцию ДНК ЦМВ с определением количества вирусных частиц в органах, тканях, биологических жидкостях, таких как кровь, слюна, моча, что позволяет установить этиологический диагноз [Walter S. et al., 2008, Долгих Т.И. и соавт., 2011, Половцева Т.В. и соавт., 2012, Jessica L. et al., 2013]. Для герпесвирусных инфекций недостаточна лишь качественная детекция вируса, необходимо определять *количество* инфекта (вирусную нагрузку), так как именно от него зависит реализация клинической картины заболевания [Pass R., 2007, Arav-Boger R., 2007, Cannon M. J. et al., 2011, Климова Р.Р. и соавт., 2014, Bryan T. Mayer et al., 2016].

У амбулаторных пациентов выраженность клинических проявлений острой первичной и реактивированной ЦМВИ соответствует, в основном, лёгкой и средней степени тяжести заболевания. В соответствии с действующими клиническими рекомендациями по оказанию медицинской помощи детям с подозрением на цитомегаловирусную инфекцию, рекомендовано исследовать венозную кровь с

использованием прямых и косвенных методов диагностики ЦМВИ для определения антител IgM и IgG к ЦМВ, ДНК ЦМВ [Клинические рекомендации (протокол лечения) оказания медицинской помощи детям больным цитомегаловирусной инфекцией. ФГБУ НИИДИ ФМБА России, 2015]. Однако, при лёгком и среднетяжелом течении заболевания у детей инвазивные методы диагностики не поддерживаются родителями. В связи с этим необходим поиск новых неинвазивных скрининговых методик для определения показаний к проведению исследования венозной крови пациента.

Таким образом, оптимизация алгоритма диагностики ЦМВИ у детей раннего возраста в амбулаторных условиях с применением количественной детекции ДНК ЦМВ в крови, слюне и моче (количество копий/мл) методом ПЦР является актуальной проблемой педиатрии и инфектологии. Определение разделяющих (пороговых) значений имеет важное практическое значение, так как позволяет установить стадию инфекционного процесса и определить терапевтическую тактику.

Степень разработанности темы исследования

Основанием для проведения диссертационного исследования послужила актуальность и значимость цитомегаловирусной инфекции в детском возрасте. Клинические проявления врожденной ЦМВИ достаточно подробно описаны многими отечественными и зарубежными авторами [Revello M. G., 2002, Лобзин Ю.В., 2010, Щербак В.А., 2015, Кочкина С.С., 2016]. В последние годы активно изучается роль цитомегаловирусной инфекции в формировании отклонений в соматическом здоровье детей [Рыжова О.Б., 2003, Булгакова В.А., 2007, Козлова С.Н., 2008, Бачурина Н.М., 2012, Джумагазиев А.А., 2014]. Существенный вклад в изучение проблемы внесли отечественные ученые Ю.В. Лобзин, А.Г. Боковой, И.В. Бабаченко, Л.Б. Кистенева, Н.Д. Львов, М.С. Савенкова, Э.Н. Симованьян, Ф.С. Харламова, Т.А. Чеботарева, С.Г. Чешик, В.Ф. Учайкин, О.В. Шамшева, Е.В. Мелехина, А.Д. Музыка, В.В. Краснов, С.А. Хмилевская, Н.Ю. Кан, Н.В. Околышева, И.А. Сотников. В работах отечественных авторов определена основная клиническая форма первичной приобретенной ЦМВ-инфекции, протекающая по типу мононуклеоза и по тяжести состояния требующая госпитализации в инфекционный стационар [Егорова Н.Ю., 2006, Кан Н.Ю., 2011]. Недостаточно изучены особенности клинических проявлений активной ЦМВИ у амбулаторных пациентов раннего возраста в зависимости от формы: острая первичная или реактивация.

Клинические проявления приобретенных форм цитомегаловирусной инфекции у пациентов раннего возраста неспецифичны, что обуславливает важность специфической лабораторной диагностики и ее адекватной клинической интерпретации [Долгих Т.И., 2011, Краснов В. В., 2012]. В настоящее время обсуждаются достоинства и недостатки различных диагностических методик, используемых для определения стадии инфекционного процесса, а также показаний к проведению противовирусной терапии у детей [Харламова Ф.С., 2005, Царегородцев А.Д., 2017]. Особый интерес представляет количественный вариант полимеразной цепной реакции, обладающей высокой чувствительностью и специфичностью [Arav-Boger R., 2007, Cannon M. J., 2011, Климова Р.Р., 2014, Bryan T. Mayer et al., 2016]. Дискутируется вопрос о значении уровня вирусывыделения в различных биологических субстратах и

возможности применения его для верификации активных форм инфекции [Ross S.A., 2011, Jessica L., 2013, Zhidai L., 2014]. Часть авторов подчеркивают важность количественного определения ДНК ЦМВ в слюне у детей раннего возраста [Околышева Н.В., 2017], тогда как «золотым стандартом» верификации активных форм инфекции в зарубежной литературе принято считать определение уровня ДНК вируса в крови [Walter S., et all, 2008]. Пороговые значения уровня вирусной нагрузки в крови описаны лишь у пациентов с ВИЧ-инфекцией [Шахгильдян В.И., 2013], у реципиентов солидных органов [Martin-Gandul C., et all, 2013], костного мозга [Peres Renata M.V., et all, 2010]. Отсутствуют знания о «пороговых значениях» уровня вирусной нагрузки ЦМВ в различных биологических жидкостях у амбулаторных пациентов раннего возраста, позволяющие дифференцировать активную ЦМВИ от латентных форм, сопровождающихся вирусовыделением.

Существуют алгоритмы клинико-лабораторной диагностики герпесвирусных инфекций. Отечественными авторами [Алимбарова Л.М. и соавт, 2017] представлен диагностический алгоритм обследования детей с заболеваниями верхних дыхательных путей, включающий в себя идентификацию вирусов герпетической группы. В работе Бабаченко И.В. представлены результаты клинико-лабораторного обследования детей с ежемесячными инфекциями органов респираторного тракта [Бабаченко И.В., 2010]. Однако, имеющиеся алгоритмы диагностики не включают определение «пороговых значений» уровня вирусной нагрузки в различных биологических жидкостях, наряду с другими клинико-лабораторными признаками активной ЦМВИ.

Таким образом, разработка новых подходов к диагностике цитомегаловирусной инфекции у детей раннего возраста, с целью выработки единого диагностического алгоритма, является актуальной.

Цель исследования

Оптимизация клинико-лабораторной диагностики цитомегаловирусной инфекции у детей в возрасте 1-3 лет в амбулаторной практике, разработка и обоснование применения диагностического алгоритма.

Задачи исследования

1. Установить особенности клинических проявлений острой первичной и реактивированной формы ЦМВИ у детей в возрасте от 1 до 3 лет, наблюдающихся амбулаторно.
2. Сопоставить уровень ДНК ЦМВ в различных биологических жидкостях у детей раннего возраста с клиническими данными, оценить значения и динамику вирусной нагрузки при активной форме ЦМВИ.
3. Построить математическую модель диагностики активной формы цитомегаловирусной инфекции у детей раннего возраста.
4. Разработать алгоритм клинико-лабораторной диагностики цитомегаловирусной инфекции у детей раннего возраста в амбулаторных условиях.

Научная новизна исследования

1. Впервые определены клинические особенности активных форм ЦМВИ у детей раннего возраста, наблюдающихся амбулаторно.
2. Впервые сопоставлена информативность молекулярно-биологического (ПЦР) метода диагностики ЦМВИ у детей раннего возраста при исследовании различных биологических жидкостей; впервые проведено ранжирование уровня вирусной нагрузки по количеству ДНК ЦМВ, определяемой в различных биологических жидкостях методом ПЦР, для установления степени активности ЦМВИ.
3. Впервые построена математическая модель диагностики активной цитомегаловирусной инфекции, определены «пороговые значения» вирусной нагрузки ЦМВ в различных биологических жидкостях для активных форм ЦМВИ.
4. Дано научное обоснование нового диагностического алгоритма активной ЦМВИ у детей раннего возраста, наблюдающихся в амбулаторных условиях.

Теоретическая и практическая значимость исследования

1. Определены клинические особенности активных форм ЦМВИ у детей раннего возраста: при первичном инфицировании острый период заболевания протекает по типу инфекционного мононуклеоза, клиническая картина реактивированной формы неспецифична, сопровождается длительной лихорадкой (65%, 21/33) с лимфаденопатией (82%, 27/33).
2. Установлены анамнестические факторы риска развития, клинические особенности и лабораторные маркеры активной ЦМВИ у детей в возрасте от 1 до 3 лет, наблюдающихся амбулаторно.
3. На основании построенной математической модели диагностики ЦМВИ представлены рекомендации по использованию диагностических тестов, с учетом ранжирования вирусной нагрузки ЦМВ и определения ее «пороговых» значений для определения показаний к проведению исследования венозной крови для подтверждения активной формы ЦМВИ.
4. Разработан алгоритм, позволяющий дифференциально подойти к выбору методов диагностики для подтверждения активных форм ЦМВИ у детей раннего возраста в амбулаторных условиях.

Методология и методы исследования

Диссертационное исследование спланировано согласно поставленной цели исследования и включает последовательное применение методов научного познания с целью решения поставленных задач, с применением современных клинико-лабораторных, инструментальных, аналитических и статистических методов. Полученные данные статистически обработаны и изложены в главах собственных исследований. Сформулированы выводы, практические рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы.

Положения, выносимые на защиту

1. Дети 1-3 лет переносят острую первичную ЦМВИ преимущественно в виде мононуклеоза, клиническая картина реактивированной формы неспецифична,

сопровождается длительной лихорадкой с лимфаденопатией. Косвенными лабораторными маркерами активной ЦМВИ являются: нейтропения (46%, 30/65), гипоиммуноглобулинемия А (49%, 32/65) и G (51%, 33/65).

2. Вирусовыделение в биологических средах при ЦМВИ у детей раннего возраста происходит неодинаково, различаясь продолжительностью вирусовыделения и уровнем вирусной нагрузки, зависящим от формы инфекционного процесса (активный, латентный). Определена высокая чувствительность и специфичность количественного тестирования на ДНК ЦМВ слюны больного, как биологического субстрата для скринингового исследования.

3. Построенная математическая модель ЦМВИ определяет пороговое значение уровня вирусовыделения в слюне, равное 4,1 Ig копий ДНК/мл, с вероятностью 65% соответствующее активной ЦМВИ, что является показанием для углубленного обследования.

4. Детям, в возрасте от 1 до 3 лет в случае острого заболевания с выраженным лимфопролиферативным синдромом, наличием нейтропении и гипоиммуноглобулинемии (IgA, IgG), рецидивирующими воспалительными заболеваниями ЛОР-органов в анамнезе, в качестве скрининг-теста на активную ЦМВИ в амбулаторных условиях, рекомендовано исследование слюны методом количественной ПЦР, с последующим проведением уточняющих тестов при превышении «порогового» значения-4,1 Ig копий ДНК/мл.

Личное участие автора в получении результатов

Автором самостоятельно проводилось: планирование и организация исследования; анализ первичной медицинской документации; клинико-лабораторное обследование в динамике; беседы с родителями; математическое моделирование и анализ полученных данных; статистическая обработка материалов исследования; внедрение результатов исследования в работу детской поликлиники.

Внедрение результатов работы в практику

Разработанный алгоритм диагностики ЦМВИ у детей раннего возраста используется в ГБУЗ ПК «Городская детская клиническая поликлиника № 1» (главный врач – Сенюшкин Андрей Николаевич), детском отделении ГБУЗ ПК Пермская краевая клиническая инфекционная больница (главный врач – Чарушина Ирина Петровна). Результаты исследований используются во время подготовки ординаторов и аспирантов кафедр педиатрического факультета ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера.

Получены 2 патента на изобретение:

1. Способ оценки эффективности терапии хронической цитомегаловирусной инфекции у детей: Пат. 2566074 Рос. Федерация: МКП⁸G 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.

2. Способ оценки активности инфекции, вызванной вирусами 4,5, и 6 типа у детей: Патент на изобретение № RU 2639593, 2017 г./ 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.

Степень достоверности и апробация результатов работы

Группы пациентов, представленные в диссертации репрезентативны, объемы выборок достаточны. В исследовании использованы комплексные методы диагностики, статистическая обработка данных производилась с применением компьютерного обеспечения и актуальных статистических методов. Таким образом, полученные данные, сделанные выводы и рекомендации достоверны.

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на конференциях:

1. 87-я итоговая научная конференция ПГМА (Пермь, 2013г.) на английском языке;
2. Всесоюзная конференция по проблемам пульмонологии у детей (Пермь, 2013г.);
3. Конференции инфекционистов Пермского края по проблемам герпесвирусных инфекций у детей и особенностям их профилактики (Пермь, 2013г., 2014г.);
4. Конференция по проблемам лабораторной оценки эффективности терапии оппортунистических инфекций у детей (Пермь, 2014г.);
5. XIII Конгресс детских инфекционистов России «Актуальные вопросы инфекционной патологии и вакцинопрофилактики у детей» (Москва, 2014г.);
6. Краевая конференция инфекционистов «Актуальные вопросы инфекционной патологии» (Пермь, 2015г.);
7. Национальная школа инфекционных болезней (Пермь, 2018г.);
8. Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых с международным участием «Математика и междисциплинарные исследования» в рамках Пермского естественнонаучного форума в секции «Здоровье» (Пермь, 13-23 мая 2019).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствует паспорту научной специальности 14.01.09 – инфекционные болезни. Результаты проведенного исследования соответствуют областям исследований: пунктам 1, 2, 3 паспорта специальности «инфекционные болезни».

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 11 научных работ, в том числе 6 – в журналах, рекомендованных ВАК РФ, 2 – в журналах, входящих в базу Scopus.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 164 страницах печатного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 3 глав собственных исследований, заключения, выводов, списка литературы, состоящего из 155 источников литературы, в том числе 97 отечественных и 58 зарубежных. Диссертация иллюстрирована 11 рисунками, 31 таблицей, включает 6 клинических примеров.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Работа выполнена в Пермском государственном медицинском университете им. академика Е.А. Вагнера. Клиническое наблюдение за детьми всех групп, включенных в исследование, осуществлялось амбулаторно, в условиях кафедры детских инфекционных болезней ПГМУ по направлению пациентов из поликлиники №5 детской клинической больницы имени П. И. Пичугина Свердловского района г. Перми с 2013 по 2018 годы. В основную группу и группу сравнения включались пациенты, обратившиеся на прием врача-педиатра с симптомами острой респираторной инфекции. В группу условно здоровых были включены пациенты, посетившие врача-педиатра для осмотра перед плановой вакцинацией. Обследование детей проводилось после подписания добровольного информированного согласия родителями (или иными законными представителями). В процессе реализации поставленной цели и задач были проведены следующие исследования (таблица 1):

Таблица 1 - Описание дизайна исследования, групп пациентов в соответствии с поставленными задачами

Амбулаторные пациенты в возрасте от 1 до 3 лет с симптомами ОРИ	Условно здоровые	Направление исследования
Диагностика активных форм ЦМВИ (n=520)		
455 пациентов обследованы на герпесвирусные инфекции	65 пациентов обследованы на герпесвирусные инфекции	Наблюдательное исследование
Анализ клинико-лабораторных особенностей активных форм ЦМВИ (n=108)		
Основная группа – ОГ 65 амбулаторных пациентов от 1 до 3 лет с активной ЦМВИ (32 – острая первичная ЦМВИ, 33 – реактивированная ЦМВИ)	Группа сравнения – ГС 43 амбулаторных пациента без активных форм ЦМВИ	Наблюдательное сравнительное исследование
Оценка вирусывыделения ЦМВ в динамике (через 6 месяцев) (n=32)		
Группа катамнеза 32 пациента ОГ, перенесшие острую первичную форму ЦМВИ		Проспективное исследование
Сравнительный анализ методов лабораторной диагностики ЦМВИ (n=156)		
Основная группа – ОГ 65 амбулаторных пациентов от 1 до 3 лет с активной ЦМВИ (32 – острая первичная ЦМВИ, 33 – реактивированная ЦМВИ)	Группа сравнения – ГС 43 амбулаторных пациента без активных форм ЦМВИ Группа условно здоровых 46 амбулаторных пациентов, у которых были выявлены маркеры ЦМВИ	Наблюдательное сравнительное исследование
Построение алгоритма клинико-лабораторной диагностики активных форм ЦМВИ (n=156)		
Основная группа – ОГ 65 амбулаторных пациентов от 1 до 3 лет с активной ЦМВИ (32 – острая первичная ЦМВИ, 33 – реактивированная ЦМВИ)	Группа сравнения – ГС 43 амбулаторных пациента без активных форм ЦМВИ Группа условно здоровых 46 амбулаторных пациентов, у которых были выявлены маркеры ЦМВИ	Математическое моделирование

Для выделения группы пациентов с активной первичной и реактивированной ЦМВ-инфекцией было обследовано 455 детей, направленных на прием педиатра-инфекциониста с явлениями острой респираторной инфекции, обследованных на маркеры герпесвирусных инфекций (ЦМВИ, ВГЧ-6, ВЭБ). Критерии включения в исследование: возраст от 1 до 3 лет, установленный диагноз острой респираторной инфекции, получение информированного согласия родителя (иного законного представителя) на участие в исследовании. Критерии невключения: возраст менее 1 и более 3 лет, наличие тяжелой соматической патологии неинфекционного генеза, тяжелой генетической патологии, ВИЧ-инфекция, отсутствие информированного согласия на участие в исследовании. Из 455 детей с симптомами острой респираторной инфекции 351 имели маркеры ЦМВ-инфекции, в том числе 65 детей – активные формы инфекции, которые составили основную группу.

Для выявления различных маркеров ЦМВ-инфекции обследовали 65 условно здоровых детей. Критерии включения в исследование условно здоровых: возраст от 1 года до 3 лет; отсутствие признаков острой респираторной инфекции на момент осмотра; отсутствие хронической соматической патологии; отсутствие эпизодов ОРИ за 3 месяца до осмотра; информированное согласие родителей (законных представителей) на участие в исследовании. Критерии невключения условно здоровых в исследование: возраст младше 1 года и старше 3 лет; отсутствие информированного согласия родителей (законных представителей) на участие в исследовании.

Для сравнительной оценки структуры лабораторных маркеров у детей с клиническими проявлениями ЦМВИ и условно здоровых 19 детей были исключены ввиду отсутствия серологических и ПЦР-маркеров ЦМВИ. Таким образом, для решения второй, третьей и четвертой задач была сформирована группа условно здоровых (n=46), согласно следующим критериям включения: наличие лабораторных маркеров неактивной ЦМВИ (IgG или ПЦР+ слюна/моча). Критерии невключения: наличие активных форм герпесвирусных инфекций (ВЭБИ, ЦМВИ, ВГЧ-6).

Для решения первой задачи проводилось клинико-лабораторное обследование детей основной группы (n=65), имеющих активные формы ЦМВИ. Критерии включения в основную группу: наличие лабораторно подтвержденной активной ЦМВ-инфекции (первичная, реактивированная) на основании выделения ДНК ЦМВ в крови по данным ПЦР-исследования. Критерии невключения в основную группу: врожденная ЦМВИ, острые формы инфекции, вызванной вирусом Эпштейна-Барр, ВГЧ-6, другие острые инфекционные заболевания (коклюш и пр.).

Группу *сравнения* составили 43 ребенка из первоначально сформированной группы исследования (455 пациентов с симптомами ОРИ). Критерии включения в группу сравнения: отсутствие лабораторных маркеров острых ГВИ (ЦМВИ, ВЭБИ, ВГЧ-6). Критерии невключения: наличие активных форм герпесвирусных инфекций (ВЭБИ, ЦМВИ, ВГЧ-6), другие острые инфекционные заболевания (коклюш и пр.).

Для решения третьей задачи была сформирована группа катамнеза из детей основной группы через 6 месяцев от первичного обследования - 32 ребенка, перенесших острую первичную ЦМВИ.

Все пациенты основной группы и группы сравнения наблюдались амбулаторно. На момент первичного осмотра продолжительность заболевания составила от 3 до 7 суток. Достоверных отличий по полу и возрасту в сформированных группах не было.

Проспективное сравнительное исследование заключалось в анализе клинических и лабораторных данных пациентов. Клинический метод заключался в обследовании детей в динамике по общепринятым методикам: сбор жалоб, изучение анамнеза жизни и заболевания и объективное обследование.

Ретроспективно оценивали данные анамнеза и индекс инфекционной резистентности оценивался за предшествующие 6 месяцев по данным обращаемости; потребности в госпитализации (суммарное число дней госпитализации за 6 предыдущих месяцев амбулаторного наблюдения) и в антибактериальной терапии (число курсов антибактериальной терапии за 6 предыдущих месяцев). Диагноз острой респираторной инфекции выставлялся по комплексу клинических и лабораторных данных в соответствии со стандартами, принятыми в Российской Федерации [Баранов А.А., 2015]. Лабораторное обследование включало проведение общеклинических анализов и специфических исследований (таблица 2).

Таблица 2 - Методы и объем проведенных исследований

Метод исследования	Материал	Количество больных	Количество исследований	
Клинический анализ крови	Кровь	520	553	
Клинический анализ мочи	Моча	520	553	
Биохимический анализ крови (АСТ, АЛТ, общий белок, общий билирубин, СРБ)	Кровь	520	553	
ДНК ЦМВ методом количественной ПЦР в режиме реального времени	Кровь	520	553	
	мазок из ротоглотки	520	553	
	Моча	520	553	
ДНК ВЭБ, ВГЧ-6 методом количественной ПЦР в режиме реального времени	Кровь	520	553	
Специфические анти-ГВИ (ЦМВ, ВЭБ)	IgM	Кровь	520	553
	IgG	Кровь	520	553
Иммунологический статус	IgA общий	Кровь	520	553
	IgM общий	Кровь	520	553
	IgG общий	Кровь	520	553
Инструментальные методы диагностики				
Рентгенограмма органов грудной клетки		28	28	
УЗИ органов брюшной полости		47	62	
Работа с медицинской документацией				
Анализ амбулаторных медицинских карт			520	

Инфицирование цитомегаловирусом определяли по обнаружению следующих маркеров: прямых -ДНК вируса в крови, слюне и моче, косвенных- анти-IgM, -IgG антител. **Маркерами активной формы ЦМВИ** [Каражас, 2017], считали обнаружение ДНК ЦМВ в крови, причем при отсутствии анти-ЦМВ IgG, определяли *первичную инфекцию*, при наличии анти-ЦМВ IgG – *реактивацию*.

Выделение ДНК ЦМВ и определение его количественного содержания проводили методом ПЦР в режиме реального времени с использованием тест-систем «АмплиСенс®СМV-скрин/монитор-FL» (Россия) в слюне, моче и крови. Наличие ДНК ЦМВ в слюне/моче, без ДНК-емии, расценивалось как проявление латентной формы инфекции. Количественные показатели вирусной нагрузки, полученные в результате ПЦР-анализа в исследуемых средах, для дальнейшей статистической обработки были ранжированы следующим образом (согласно авторскому патенту):

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

Определение серологических маркеров ЦМВИ методом ИФА осуществлялось в независимой лаборатории ООО «МедЛабЭкспресс». Антитела к ЦМВ и к ВЭБ классов IgM и IgG, определяли методом ИФА в плазме крови с использованием тест-систем ЗАО «Вектор Бест» (Новосибирск).

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 «MicrosoftExcel 2010». Для математического моделирования использовали программу DeductorStudio, входящую в аналитическую платформу DeductorLite, разработанную в фирме BaseGroupLabs.

Результаты исследования

Клинико-лабораторные варианты активной цитомегаловирусной инфекции у детей раннего возраста

Среди детей с ОРИ (n=455), различные маркеры ЦМВ были обнаружены у 77% (351/455), причем, активная ЦМВ-инфекция определена у 14% (65/455). Среди клинически здоровых маркеры ЦМВИ определены у 71% (46/65) детей, без признаков активации. При серологическом обследовании анти-ЦМВ IgG в основной группе определялись в 51% (33/65) случаев, в группе сравнения в 81% (35/43) случаев, среди здоровых детей - в 83% (38/46) случаев при среднеарифметических значениях уровня анти-IgG без достоверных различий. Анти-ЦМВ IgM определялись у 55% (36/65) детей только в основной группе.

Лабораторно, *первичную ЦМВИ* (ПЦР+ кровь, IgM±, IgG-) переносили 49% (32/65) детей основной группы, у 51% (33/65) пациентов была диагностирована реактивация. Первичная ЦМВИ сопровождалась классическим комплексом симптомов мононуклеоза - лихорадкой более 7 дней и интоксикацией у всех пациентов, выраженной лимфаденопатией, тонзиллофарингитом, умеренным увеличением печени. Острое лихорадочное заболевание с лимфаденопатией отмечено у 51% (33/65) детей основной группы, у которых была определена *стадия реактивации ЦМВИ* (ПЦР+кровь, IgM±, IgG+). Клиническая картина была неспецифична, локализованная лимфаденопатия отмечена у 75% (25/33) детей, лихорадка более 5 дней у 65,0% (21/33), тонзиллофарингит в 30% случаев, гепатомегалии отмечено не было.

При изучении анамнестических данных между детьми основной группы и группы сравнения различия касались только структуры острой заболеваемости, а именно рецидивирующий отит, имел место у 23% (15/65) детей основной группы и 5% (2/43) группы сравнения, $p=0,001$.

Достоверные отличия по клиническим проявлениям в сравниваемых группах были установлены в отношении лимфаденопатии (91% против 16%), ринореи (23% против 74%), катарального фарингита (91% против 72%), гипертрофии небных миндалин 2-3 степени (66% против 35%), налетов на миндалинах (23% против 0%) и гепатомегалии (14% против 0%).

Установлены статистически значимые различия по отклонениям лабораторных показателей: в основной группе достоверно чаще в 1,8 раза встречалась нейтропения - 46% (30/65) против 16% (7/43) в группе сравнения ($p=0,002$). Статистически достоверные различия получены и по изолированному снижению общего IgA в крови в основной группе: 49% (32/65) против 28% (12/43) в группе сравнения ($p=0,028$) и по снижению общего IgG в крови: 51% (33/65) против 18,6% (8/43) ($p=0,001$). Повышение АЛТ было зарегистрировано только при острой ЦМВИ в виде инфекционного мононуклеоза (в ОГ): 44% (14/65) ($p=0,001$), всегда в сочетании с АСТ, а в группе сравнения повышения АЛТ и АСТ не зарегистрировано ни в одном случае (таблица 3).

Таблица 3 - Клинические симптомы и лабораторные отклонения в основной группе и группе сравнения

Признаки	Основная группа (n= 65)		Группа сравнения (n= 43)		p ¹
	Абс.	%	Абс.	%	
Клинические признаки					
Лихорадка	65	100	43	100	1
Лимфаденопатия	59	91	7	16	0,001
Сиалоаденит	4	6	0	0	0,106
Заложенность носа	51	78	36	84	0,500
Ринорея	15	23	32	74	0,001
Кашель	24	37	23	53	0,090
Катаральный фарингит	59	91	31	72	0,011
ГНМ 2-3 ст	43	66	15	35	0,002
Налёты на миндалинах	15	23	0	0	0,001
Гепатомегалия	9	14	0	0	0,002
Лабораторные признаки					
Лейкопения	19	29	6	14,0	0,066
Лейкоцитоз	23	35	8	18,6	0,06
Нейтропения	30	46,1	7	16,2	0,002
Нейтрофилёз	13	20	6	14,0	0,42
Лимфоцитоз	47	72,3	10	23,3	0,001
Моноцитоз	41	63	16	37,2	0,009
Атипичные мононуклеары	18	28	0	0	0,001
Снижение иммуноглобулина А	32	49,2	12	28	0,028
Снижение иммуноглобулина G	33	51,0	8	18,6	0,001
Повышение АЛТ и АСТ	14	21,5	0	0	0,002

p¹- уровень значимости критерия Хи-квадрат

Верификация ЦМВИ молекулярно-биологическим методом

В *крови* всех пациентов **основной группы** определялась ДНК цитомегаловируса: значения ВН распределились неравномерно в диапазоне от 2,6 до 4,8 lg копий ДНК/мл, медиана ВН в крови составила 3,4 (IQR 3,2-3,8) lg копий ДНК/мл, доля низких значений - 83,0% (54/65), доля средних—17,0% (11/65), высоких значений не было.

В *слюне* детей основной группы ДНК ЦМВ была обнаружена у 99,0% (64/65): значения ВН распределились неравномерно в диапазоне от 3,9 до 7,3lg копий ДНК/мл, медиана ВН в слюне составила 4,9 (IQR 4,7-5,6) lg копий ДНК/мл, доля низких значений - 6% (4/65), доля средних— 72% (47/65), высоких – 20% (13/65), в одном случае отрицательный результат – 1,5% (1/65).

В *моче* детей основной группы ДНК ЦМВ была обнаружена у 80,0% (52/65): значения ВН распределились неравномерно в диапазоне от 2,6 до 7,1 lg копий ДНК/мл, медиана ВН в моче составила 3,85 (IQR 3,1- 4,5) lg копий ДНК/мл. При сравнительном анализе значений медиан установлены их достоверные отличия: кровь – 3,4 (IQR 3,2-3,8) lg копий ДНК/мл, слюна - 4,9 (IQR 4,7-5,6) lg копий/мл, моча - 3,85 (IQR 3,1- 4,5) lg копий ДНК/мл (критерий Крускала-Уоллиса N=7, df=2, p=0,000). В крови все значения ВН находились в диапазоне низких и средних значений. В слюне доля низкой ВН составила только 6,0%, что достоверно меньше, чем в моче и крови (p=0,0001); высокая степень вирусной нагрузки составила 20,0%. В моче низкая и средняя степень ВН распределена равномерно: 41,0% и 34,0%, соответственно, на долю высокой ВН пришлось только 5,0%.

Таким образом, при активной ЦМВИ 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 ДНК/мл, в крови и моче количество вируса находится в области низких и средних значений ВН.

В *слюне* детей группы сравнения ДНК ЦМВ была обнаружена у 69,7% (30/43): значения ВН распределились неравномерно в диапазоне от 2,6 lg копий ДНК/мл до 5,0 lg копий ДНК/мл, медиана ВН в слюне составила 2,9 (IQR 0- 3,5) lg копий ДНК/мл, доля низких значений составила 49% (21/43), средних— 21% (9/43), высоких значений не было. В *моче* детей группы сравнения ДНК ЦМВ была обнаружена у 53,5% (23/43) детей: значения ВН распределились неравномерно в диапазоне от 2,6 lg копий ДНК/мл до 3,9 lg копий/мл, медиана ВН в моче составила 2,8 (IQR 0- 3,2) lg копий ДНК/мл, все значения ВН находились в диапазоне менее 4 lg копий ДНК/мл (низкая степень ВН). У 30% детей группы сравнения (13/43) ДНК ЦМВ не определялась ни в одной среде, 62% (8/13) из них были ЦМВ-серонегативны (таблица 4).

Таблица 4 - Ранжирование вирусной нагрузки ЦМВ в моче и слюне (основная группа и группа сравнения)

Степень ВН	Среда – слюна				P	Среда – моча				P
	Основная группа (n=65)		Группа сравнения (n=43)			Основная группа (n=65)		Группа сравнения (n=43)		
	N	Доля (%)	N	Доля (%)		N	Доля (%)	N	Доля (%)	
0	1	1,50	13	30	0,000	13	20,00	20	46,5	0,007
Низкая	4	6,00	21	49,0	0,000	27	41,00	23	53,5	0,307
Средняя	47	72,0	9	21,0	0,000	22	34,00	0	0	0,000
Высокая	13	20,05	0	0	0,002	3	5,00	0	0	0,154

p^1 - уровень значимости критерия Хи-квадрат

При сравнении значений ВН в исследуемых группах (ОГ и ГС) установлены достоверные отличия, так, ПЦР-негативных результатов в группе сравнения было больше как для слюны (30,0% против 1,5%, $p=0,000$), так и для мочи (46,5% против 20,0%, $p=0,007$). Что касается распределения значений ВН по степеням, то достоверные отличия определены только для слюны: в основной группе преобладали средние и высокие значения ВН, составив 92,0% (против 21,0% в группе сравнения, $p=0,000$). Только в слюне детей с острыми формами ЦМВИ (ОГ) определялась высокая степень ВН (20,0% случаев).

Распределение значений ВН в слюне *здоровых детей* было похожем 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 ВН отсутствовали, на долю низких и средних пришлось 26,0% (таблица 5).

Таблица 5 - Ранжирование вирусной нагрузки ЦМВ в моче и слюне (здоровые и группа сравнения)

Степень ВН	Среда – слюна				P	Среда – моча				P
	Группа сравнения (n=43)		Группа здоровых (n=46)			Группа сравнения (n=43)		Группа здоровых (n=46)		
	N	Доля (%)	N	Доля (%)		N	Доля (%)	N	Доля (%)	
0	13	30	18	39,2	0,31	20	46,5	34	74,0	0,020
Низкая	21	49,0	23	50,0	0,82	23	53,5	8	17,4	0,002
Средняя	9	21,0	5	10,8	0,32	0	0	4	8,6	0,048
Высокая	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

p^1 - уровень значимости критерия Хи-квадрат

Таким образом, по наличию ЦМВ-маркеров можно считать *группу сравнения сопоставимой с группой условно здоровых детей*: серопозитивность к ЦМВ (IgG) составила 81,0% и 82,6% соответственно; вирусовыделение в слюне 69,0% и 60,0% соответственно; вирусовыделение в моче 53,0% и 26,0%. Медианы значений вирусной нагрузки также сопоставимы: для слюны 2,9 lg копий ДНК/мл в обеих группах.

Очевидно, что в отсутствие ДНК-емии и анти-ЦМВ IgM, вышеперечисленные маркеры свидетельствуют об инфицировании и латентном течении инфекционного процесса.

Сравнительная оценка диагностической точности методов

На следующем этапе исследования оценивали надежность метода ПЦР для верификации ЦМВ в слюне и моче, с помощью расчета чувствительности и специфичности измерений, произведенных в основной группе и в группе сравнения. Чувствительность (Se), выражающая долю пациентов с ЦМВИ, точно идентифицированных тестом по среде - слюна, равна $Se = 64/65 = 0,98$ (98,0%), ДИ (0,92;0,98), по среде моча, равна $Se = 52/65 = 0,80$ (80,0%), ДИ (0,73;0,89). Специфичность (Sp), выражающая долю пациентов без ЦМВИ, которые точно идентифицированы тестом по среде - слюна, равна: $Sp = 13/43 = 0,36$ (36,0%), ДИ(0,31;0,39), по среде моча, равна $Sp = 20/43 = 0,46$ (46,0%), ДИ (0,41;0,51). В группе здоровых оценивали специфичность, то есть возможность теста определять здоровых (не инфицированных ЦМВ): для слюны $Sp = 15/43 = 0,34$ (34,0%), ДИ (0,31;0,39), для мочи $Sp = 31/43 = 0,72$ (72,0%), ДИ (0,61;0,73).

Таким образом, для обеих сред определена достаточно высокая чувствительность (98,0% и 80,0%) и низкая специфичность (36,0% и 46,0%), которая не дает возможности отделить здоровых от больных, поэтому только качественного обнаружения присутствия ДНК ЦМВ в слюне и моче недостаточно для практического применения.

Для повышения точности идентификации больных активной ЦМВИ методом ПЦР, необходимо применить количественную методику, а именно рассчитать количество вируса (вирусную нагрузку) соответствующее активной стадии инфекции. Очевидно, что именно численное значение количества ДНК ЦМВ, при условии высокой чувствительности и специфичности может быть использовано в качестве диагностического инструмента. Осуществить подобный расчет возможно при помощи математического моделирования.

Построение математической модели активной ЦМВИ

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 активной формы ЦМВИ у пациента (да/нет, 1/0).

В математической модели для среды слюна учитывались данные значений вирусной нагрузки ДНК ЦМВ в 108 результатах ПЦР-анализа *слюны* (основная группа и группа сравнения). Получено линейное уравнение регрессии: $y = -6,68 + 1,75x$, где x – значение десятичного логарифма вирусной нагрузки. Подставляя любое значение ВН, в уравнение регрессии $p = 1/1 + e^{-(6,68 + 1,75x)}$, получаем значение вероятности наличия активной ЦМВИ при данной ВН. При значении больше 0,5, делают вывод высокой вероятности активной ЦМВИ.

Классификационная способность модели определена по данным обучающей выборки и составила 95%. Чувствительность модели оказалась равной 88,0%, а специфичность – 87,5%. Критерием выбора порогового значения (cut off value) был определен баланс между чувствительностью и специфичностью, т.е. когда $Se \approx Sp$: $Cut\ off = \min |Se - Sp|$. Построена ROC-кривая. Оптимальный порог отсечения определен графически, это то значение ВН, при котором чувствительность приблизительно равна специфичности, и которое показывает, после какого значения вероятности один класс сменяется другим, в нашем случае оптимальный порог $cut\ off = 4,1\ lg$ ($Se = 0,85, Sp = 0,83$), значение вероятности в пороговой точке 65,0%. Качество математического моделирования оценено при помощи значения AUC (площадь под ROC-кривой) = 0,93, соответствующее очень хорошему качеству модели (рисунок 1).

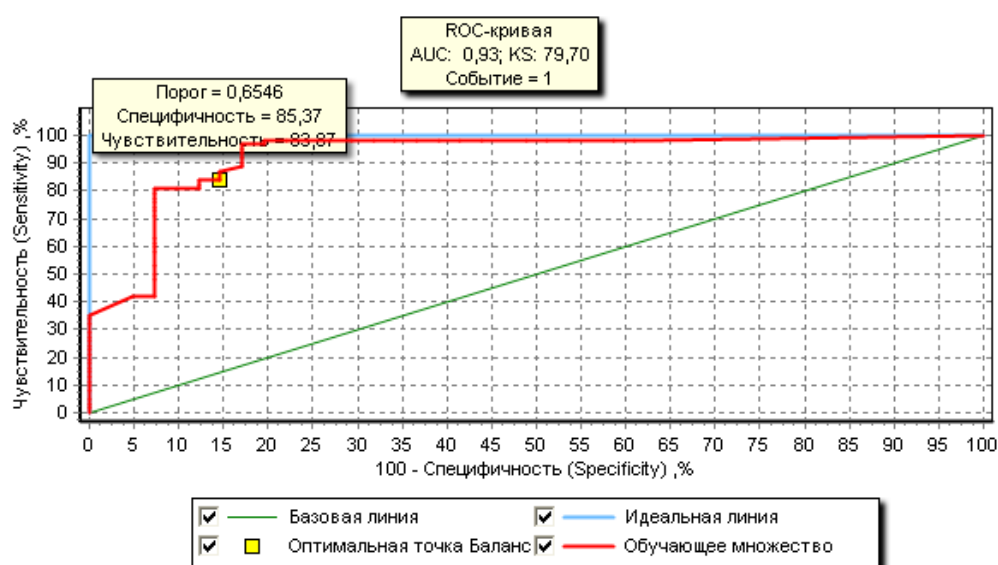


Рисунок 1 - ROC-кривая диагностической способности логистической регрессионной модели прогноза активной ЦМВИ (слюна)

При проведении математического моделирования по среде моча 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. Классификационная способность модели определялась по данным обучающей выборки и составила 72%. Чувствительность модели оказалась равной 69,0%, а специфичность – 60,0%. Построена ROC-кривая. Порогу отсечения в точке баланса ($Se = 0,65, Sp = 0,673$) соответствует значение $VH = 3,11g$. Вероятность активной ЦМВИ при значении $VH = 3,11g$ составляет 67%. Качество математического моделирования оценено при помощи значения AUC (площадь под ROC-кривой) = 0,72, соответствующее хорошему качеству модели (рисунок 2).

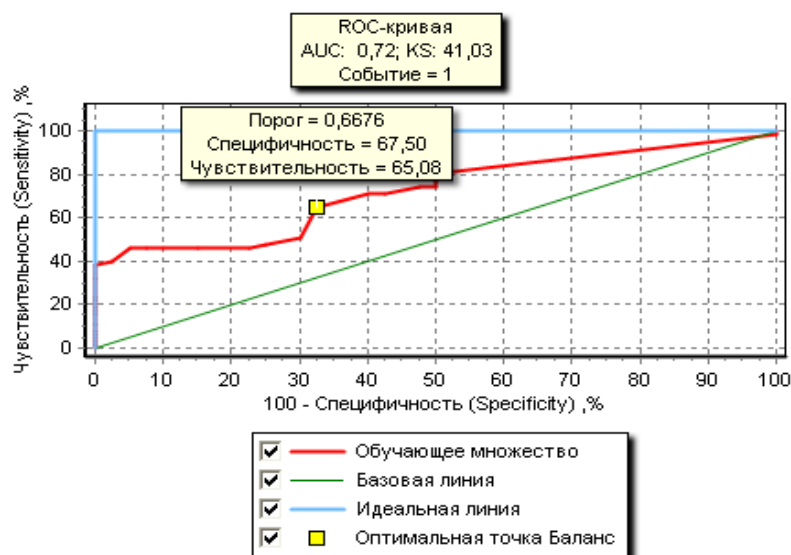


Рисунок 2 - ROC-кривая диагностической способности логистической регрессионной модели прогноза активной ЦМВИ (моча)

Проанализировав полученные математические модели, сделан вывод о том, что для практического применения следует выбирать *слюну*, как субстрат для детекции ЦМВ с наиболее достоверными результатами. Основанием для этого вывода послужили следующие результаты моделирования: классификационная способность модели для слюны оказалась выше -95% (для мочи – 72%), с приемлемыми показателями чувствительности (88,0%) и специфичности (87,5%); пороговое значение ВН (cutmoff) для слюны имеет более высокие значения чувствительности 85,0% и специфичности 83,0% (для мочи 65,0% и 67,0% соответственно); коэффициент R^2 , характеризующий долю вариации результативного признака у, 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, $p=0,000$); оценка относительного риска (отношение шансов- OR) имеет более высокие значения для слюны $OR=5,7$, для мочи $OR=1,5$; площадь под ROC- кривой для слюны $AUC=0,93$, что является максимальным приближением к «идеальному» тесту, для мочи $AUC=0,72$.

Результаты катamnестического наблюдения за пациентами, перенесшими острую первичную цитомегаловирусную инфекцию

С целью оценки динамики вирусовыделения из крови, слюны и мочи, через 6 месяцев после первого этапа наблюдения из основной группы была сформирована группа катamnеза из 32 пациентов, перенесших острую первичную форму ЦМВИ. Проводился осмотр ребенка, сбор анамнеза и жалоб. Определялось наличие анти-ЦМВ IgM и IgG. Методом ПЦР определялось количество ДНК ЦМВ в трех биологических жидкостях: крови, моче и слюне.

По окончании катamnестического наблюдения лимфаденопатия была купирована у 50% пациентов, гепатомегалия не выявлялась ни у одного, субфебрилитет купирован

почти у всех детей. Статистически достоверные отличия касались уровня общих иммуноглобулинов А и G в крови – в большинстве случаев их уровень нормализовался. Нейтропения купирована у всех пациентов, за исключением одного. При серологическом исследовании установлено, что маркеры активной ЦМВИ (анти-ЦМВ IgM, ДНК ЦМВ в крови) через 6 месяцев наблюдения не определялись. В целом анти-ЦМВ IgG выявлены у 78% детей (25/32).

Сравнительный анализ показал, что через 6 месяцев наблюдения произошли достоверные изменения вирусовыделения. Так, в крови ДНК ЦМВ не определялась ни у одного ребенка, достоверно увеличилась доля детей с отрицательным значением ПЦР в моче (78,0 против 24,2%, $p=0,001$). Наиболее ярко динамика вирусывыделения проявилась в слюне - почти в 10 раз увеличилась доля детей с низкой вирусной нагрузкой (3,0 против 48,5%, $p=0,001$), и также достоверно уменьшились доли детей со средней и высокой ВН. Медиана значений ВН в моче изменилась с 3,4 lg копий ДНК/мл (ДИ 3,1;7,9) до 3,0 lg копий ДНК/мл (ДИ 3,6;7,5), в слюне с 5,3 lg копий ДНК/мл (ДИ 2,8;6,3) до 2,8 lg копий ДНК/мл. Сравнительное ранжирование вирусной нагрузки ДНК ЦМВ в моче и слюне в первом и втором наблюдении представлено в таблице 6.

Таблица 6 - Ранжирование вирусной нагрузки ДНК ЦМВ в средах исследования (группа катамнеза)

Степень ВН	В среде – кровь (n=32), доля (%), (N)		P	В среде - моча (n=32), доля (%), (N)		P	В среде - слюна (n=32), доля (%), (N)		P
	I наблюдение	II наблюдение		I наблюдение	II наблюдение		I наблюдение	II наблюдение	
ВН=0	0	0	1,00	24,2(8/32)	79(25/32)	0,02	0	52(17/32)	0,00
ВН низкая	67(22/32)	0	0,00	39,4(13/32)	21(7/32)	0,127	3 (1/32)	48(15/32)	0,00
ВН средняя	33(10/32)	0	0,00	36,4(11/32)	0	0,001	43(13/32)	0	0,00
ВН высокая	0	0	1,00	0	0	1,00	54(18/32)	0	0,00

p^1 - уровень значимости критерия Хи-квадрат

Результаты наблюдения группы катамнеза дают представление о выделении цитомегаловируса в различных биологических жидкостях у детей раннего возраста. Через 6 месяцев после острой первичной ЦМВИ во всех случаях отсутствовала репликация ЦМВ в крови, а вирусывыделение в слюне и моче сохранялось у 48% и 21% пациентов, соответственно, при достоверном уменьшении значений медиан вирусной нагрузки в динамике. Дальнейшее изучение особенностей вирусывыделения у пациентов с ЦМВИ может помочь пониманию патогенеза инфекционного процесса, а также необходимости количественного определения ДНК вируса в различных биологических жидкостях для диагностики активных форм.

Построение клинико-лабораторного алгоритма диагностики активной цитомегаловирусной инфекции

Далее решали задачу вероятностного прогнозирования активной цитомегаловирусной инфекции у детей. В качестве предикторов математической модели использовали клинико-лабораторные данные полученные в исследовании. Отбор для окончательной модели производился из 11 предикторов на основании значимости предиктора ($p \leq 0,05$) и величины OR (отношение шансов), при значении которой больше единицы, делали вывод, что предиктор способствует увеличению шансов наличия активной ЦМВИ. В окончательной модели 4 предиктора имели достоверную значимость: лимфаденопатия, нейтропения, рецидивирующие заболевания ЛОР-органов в анамнезе, и сочетанная гипоиммуноглобулинемия А, G (таблица 7).

Таблица 7 - Сводные данные по регрессионной модели активной ЦМВИ в группах исследования

Предикторы математической модели	(OR= e^b) Отношение шансов	95% ДИОР	Значимость	Коэффициент Вальда	Коэффициент логистической регрессии (b)
Лимфаденопатия (x_1)	11,4	2,9;44	0,0005	12,2	2,4 (b_1)
Нейтропения (x_2)	8,2	2,6;25,3	0,0003	13,2	2,1 (b_2)
Рецидивирующие заболевания ЛОР-органов в анамнезе (x_3)	7,5	2,6;21,2	0,0002	14,3	2,0 (b_3)
Гипоиммуноглобулинемия сочетанная (x_4)	7,5	1,8;32,2	0,006	7,5	2,0 (b_4)
Константа	-2,1				

Для каждого из полученных 4 предикторов ($x_{1,2,3,4}$) составили уравнение регрессии, и вычислили вероятность (p) зависимой переменной – активной ЦМВИ. Так, например, для x_1 (лимфаденопатия): $p = e^{-2,1+2,4} / 1 + e^{-2,1+2,4} = 2,5/3,5 = 0,7$, ($p=71,0\%$); для x_2 (нейтропения) $p = e^{-2,1+2,1} / 1 + e^{-2,1+2,1} = 2,2/3,2 = 0,68$, ($p=68,0\%$); для x_3 (рецидивирующие заболевания ЛОР-органов в анамнезе) $p = e^{-2,1+2,0} / 1 + e^{-2,1+2,0} = 2,1/3,1 = 0,67$, ($p=67,0\%$); для x_4 (гипоиммуноглобулинемия А, G) $p = e^{-2,1+2,0} / 1 + e^{-2,1+2,0} = 2,1/3,1 = 0,67$ ($p=67,0\%$), где p - теоретическая вероятность активной ЦМВИ. Адекватность модели оценена при помощи следующих коэффициентов: $\chi^2=71,2$, $R^2=0,41$. Модель статистически значима ($p=0,000$).

Оценены параметры модели: чувствительность (Se), выражающая долю пациентов с активной ЦМВИ, точно идентифицированных в процессе моделирования, которая равна: $Se = 77,0\%$, специфичность (Sp), выражающая долю пациентов с неактивной ЦМВИ которые точно идентифицированы моделью, равна: $Sp=85,0\%$. Чувствительность и специфичность предикторов оценена при помощи ROC-анализа, по результатам построения ROC-кривой показатель $AUC=0,9$, что соответствует высокому качеству модели.

Диагностический алгоритм для верификации активной ЦМВИ в амбулаторных условиях представлен на рисунке 3.

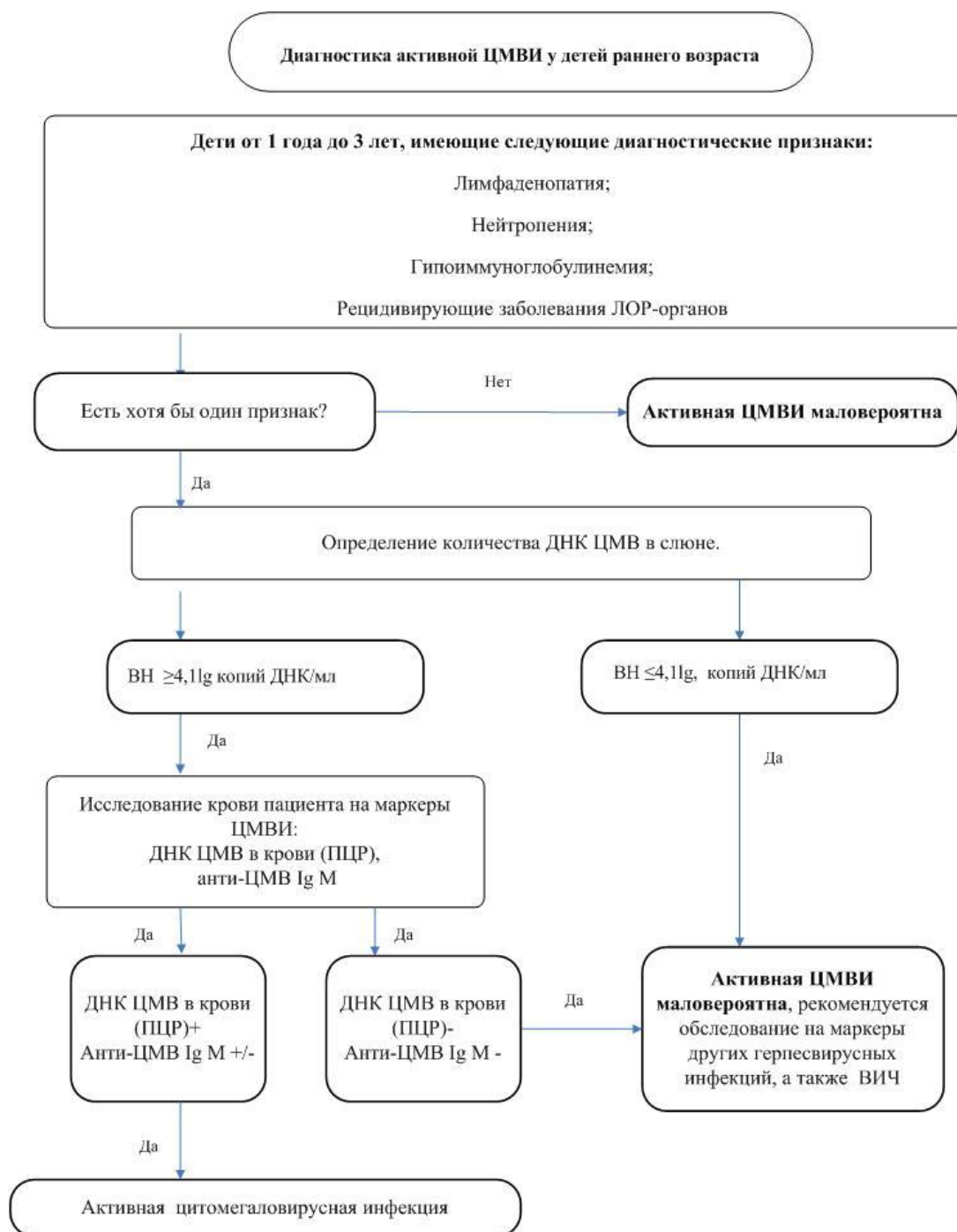


Рисунок 3 - Алгоритм клинико-лабораторной диагностики активной ЦМВИ

При наличии одного из следующих диагностических признаков: рецидивирующие заболевания ЛОР – органов в анамнезе (острый отит, аденоидит, синусит, при частоте их развития более 3х раз за последний год); нейтропения (число нейтрофилов менее 1500 кл/мл); лимфаденопатия; гипоиммуноглобулинемия А и G рекомендовано провести определение ДНК ЦМВ в слюне методом ПЦР, и при определении вирусной нагрузки выше «порогового» значения (ВН $\geq 4,11g$ копий ДНК/мл) провести исследование крови пациента на маркеры ЦМВИ: ДНК ЦМВ в крови методом ПЦР, анти-ЦМВ IgG, анти-ЦМВ IgM.

При определении вирусной нагрузки в слюне выше «порогового» значения, но *при отсутствии ДНК ЦМВ в крови*, рекомендовано произвести дальнейший диагностический поиск в отношении других герпес-вирусных инфекций (ВЭБ, ВГЧ-6), а также ВИЧ. В случае, если при определении вирусной нагрузки получены значения ниже «порогового» (ВН в слюне $\leq 4,1$ lg копий ДНК/мл), активная ЦМВИ считается маловероятной, рекомендовано провести обследование на маркеры других герпесвирусных инфекций, а также ВИЧ.

Проведенный сравнительный анализ методов диагностики показал значимость количественного ПЦР-исследования слюны для установления степени активности цитомегаловирусной инфекции. Полученные в ходе исследования данные позволяют рекомендовать определение вирусной нагрузки в слюне пациентов, как дополнительный критерий выявления активных форм цитомегаловирусной инфекции.

Выводы

1. При первичном инфицировании ЦМВ острый период заболевания у детей раннего возраста протекает по типу мононуклеоза, клиническая картина реактивированной формы неспецифична, сопровождается длительной лихорадкой с лимфаденопатией. Косвенными лабораторными маркерами активной ЦМВИ являются: нейтропения (46,1%), гипои иммуноглобулинемия А (49,0%) и G (51,0%).
2. Вирусовыделение в биологические среды при активной ЦМВИ имеет достоверные отличия: только в слюне больных детей определена высокая степень вирусной нагрузки (более 6 lg копий ДНК/мл). Через 6 месяцев после острой формы ЦМВИ, ДНК ЦМВ в крови не определяется, в слюне и моче – в 50% и 20%, соответственно, при значениях вирусной нагрузки ниже средних, что свидетельствует о персистирующей форме.
3. Математическая модель ЦМВИ определяет «пороговые» значения вирусной нагрузки в слюне и моче пациентов, позволяющие прогнозировать активную форму заболевания с высокой степенью вероятности.
4. Обоснован алгоритм диагностики активной цитомегаловирусной инфекции у детей раннего возраста включающий в себя следующие клиничко-лабораторные предикторы: лимфаденопатия, нейтропения, гипои иммуноглобулинемия А и G, рецидивирующие ЛОР-заболевания в анамнезе. Значения вирусной нагрузки ДНК ЦМВ в слюне выше 4,1 lg копий ДНК/мл, с вероятностью более 65,0% соответствуют активным формам ЦМВИ.

Практические рекомендации

1. При наличии у детей в возрасте от 1 до 3 лет острого лихорадочного заболевания с лимфаденопатией, нейтропенией и гипогаммаглобулинемией А и G следует проводить дополнительное обследование в отношении активной формы цитомегаловирусной инфекции.
2. У амбулаторных пациентов с симптомами острого лихорадочного заболевания с лимфаденопатией, нейтропенией и гипогаммаглобулинемией А и G в качестве скринингового теста на активную ЦМВИ следует использовать количественную ПЦР

слюны с учетом «порогового» значения уровня вирусной нагрузки – 4,1 Ig копий ДНК/мл.

3. Определение уровня вирусной нагрузки в слюне и моче выше пороговых значений, равных 4,1 Ig и 3,85 Ig копий ДНК/мл соответственно, служит показанием для инвазивного исследования венозной крови пациента на наличие IgM, IgG к ЦМВ и количественной ПЦР крови на ДНК ЦМВ.

4. Для применения в амбулаторной практике рекомендовано использование разработанного и апробированного алгоритма клинико-лабораторной диагностики активной ЦМВИ с учётом «пороговых» значений уровня вирусной нагрузки ЦМВ.

Перспективы дальнейшей разработки темы

1. Дальнейшее изучение роли ЦМВИ в формировании инфекционной и неинфекционной патологии у детей различных возрастных групп.

2. Изучение кинетики вирусовыделения у детей с различными формами ЦМВИ в зависимости от возраста и проводимой терапии.

3. Расширение исследования спектра герпесвирусных инфекций и их ассоциаций с целью комплексной оценки влияния на течение патологических процессов у детей различных возрастных групп.

4. Изучение клинического значения новых методов лабораторной диагностики ЦМВИ с целью ранней диагностики и лечения.

5. Создание алгоритма контроля эффективности комплексной специфической противовирусной и иммуномодулирующей терапии.

Список публикаций

1. Леготина Н.С. (Поспелова Н.С.) 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. 35-39.*

2. Леготина Н.С. (Поспелова Н.С.) Значение цитомегаловирусной инфекции в генезе внезапной смерти детей раннего возраста / И.И. Львова, Г.Г. Фрейндр, А.В. Дерюшева, Н.С. Леготина, Е.В. Сидор // Здоровье семьи - 21 век. - 2013. - № 1. - С. 110-122. *

3. Леготина Н.С. (Поспелова 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. 32. - № 3. - С. 63-69. *

4. Legotina N.S. (Pospelova N.S.) 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. - Т. 25. - № 7. - С. 1023-1026.

5. Legotina N.S. (Pospelova N.S.) Quantitative PCR in estimation of chronic cytomegalovirus infection therapy. / N.S. Legotina, 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.

6. Legotina N.S. (Pospelova 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.

7. Леготина Н.С. (Поспелова Н.С.) Клинико-лабораторные маркеры внутриутробного инфицирования при хронической цитомегаловирусной инфекции у иммунокомпрометированных амбулаторных пациентов / Н.С. Леготина, И.И. Львова, А.В. Дерюшева // В сборнике: Актуальные вопросы педиатрии. Материалы межрегиональной научно-практической конференции с международным участием. - 2015. - С. 72-76.

8. Леготина Н.С. (Поспелова Н.С.) Обоснование программы лечебно-профилактических мероприятий у часто болеющих детей раннего возраста / А.В. Дерюшева, И.И. Львова, Н.С. Леготина // Детские инфекции. - 2017. - Т. 16. - № 1.- С. 15-20.*

9. Поспелова Н.С. О возможностях лабораторной верификации цитомегаловирусной инфекции у детей. / А.В. Пермякова, И.И. Львова, Н.С. Поспелова //Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2017;62(6):45-50.*

10. Поспелова Н.С. Об этиологической роли цитомегаловирусной инфекции в патогенезе хронического воспалительного процесса лор-органов у детей/ А.В. Пермякова, И.И. Львова, Н.С. Поспелова// В сборнике: Актуальные вопросы педиатрии. Материалы межрегиональной научно-практической конференции с международным участием. - 2017. - С. 162-166.

11. Поспелова Н.С. Оптимизация диагностики цитомегаловирусной инфекции у детей младшего возраста/ А. В. Пермякова, Н. С. Поспелова, И. И. Львова// Детские инфекции. – 2018. – Т. 17. - №3 . - С. 51-57.*

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- IgA - иммуноглобулин А
- IgG - иммуноглобулин G
- IgM - иммуноглобулин М
- ROC AUC – площадь под РОК-кривой
- Se - чувствительность
- Sp - специфичность
- АЛТ - аланинаминотрансфераза
- АСТ - аспаргинаминотрансфераза
- ВГЧ-6 - вирус герпеса человека 6 типа
- ВН - вирусная нагрузка
- ВЭБ - вирус Эпштейна-Барр
- ДИ - доверительный интервал
- ИА - индекс авидности
- ИФА - иммуноферментный анализ
- ОАК - общий анализ крови
- ОГ - основная группа
- ОРИ - острая респираторная инфекция
- ПЦР - полимеразно-цепная реакция
- УЗИ - ультразвуковое исследование
- ЦМВ - цитомегаловирус
- ЦМВИ - цитомегаловирусная инфекция