

## **КЛИНИЧЕСКАЯ ИНТЕРПРИТАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕТОДОВ В ДИАГНОСТИКЕ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ**

**Шахгильдян В.И., Шипулина О.Ю., Сафонова А.П., Долгова Е.А., Шипулин Г.А.**

*ФГУН Центральный НИИ эпидемиологии, Роспотребнадзора, Москва, Россия*

### **Введение**

Цитомегаловирусная инфекция (ЦМВИ) служит причиной тяжелой патологии в самых различных группах больных. Манифестная ЦМВИ занимает одно из первых мест в структуре оппортунистических заболеваний у ВИЧ-инфицированных пациентов. Данная патология имеет место у 20 - 40% больных СПИДом, не получающих антиретровирусную терапию и в 3 - 7% случаев в популяции больных ВИЧ-инфекцией при ее назначении (Bartlett J.G. et al., 2003; Halwachs-Baumann G, 2003). Среди погибших в Москве с 1991 по 2006 гг. 1442 ВИЧ-инфицированных лиц ЦМВ-поражение внутренних органов было доказано в 193 случаях (13,4%) (Тишкевич О.А. и др., 2007). Решение проблемы быстрой этиологической расшифровке тяжелых клинических синдромов у больных ВИЧ-инфекцией является важной практической задачей. Диагноз манифестной ЦМВИ требует обязательного лабораторного подтверждения. В тоже время, отмечается большая противоречивость суждений специалистов-медиков при оценке значения различных лабораторных маркеров ЦМВИ в клинической практике.

### **Цель.**

Цель исследования состояла в установлении значения выявления ДНК цитомегаловируса в биологических материалах у ВИЧ-инфицированных больных для прогноза развития и постановки диагноза манифестной ЦМВИ.

### **Материалы и методы**

В 2002 - 2006 гг. наблюдали 3270 ВИЧ-инфицированных больных, из них у 1381 человек диагностирована стадии ВИЧ-инфекции 4В (СПИД). Больные находились под наблюдением в МГЦ СПИД (руководитель центра Мазус А.И.), стационарное лечение проходили в ИКБ №2 г. Москвы (главный врач Мясников В.А.). Возраст пациентов составил от 18 до 65 лет ( $31,5 \pm 0,7$ ). Мужчин было 82,1%. Манифестная ЦМВИ имела место у 167 пациентов. С диагностической целью проводили бронхоскопию (744 больных), плевральную пункцию (112), эзофагогастроскопию и колоноскопию (102), пункционную биопсию периферических лимфоузлов (155), люмбальную пункцию (454).

Материалом для исследования с использованием молекулярных методов служили лейкоциты периферической крови; цельная кровь, плаз-

ма, моча, мокрота, БАЛЖ, плевральная жидкость, ликвор, биоптаты бронхов, кишечного тракта, лимфоузлов. Из каждого образца проводилось выделение ДНК (набор «ДНК Сорб-Б», ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Полученные после экстракции образцы анализировали на наличие ДНК ЦМВ и генетического материала других возбудителей вторичных заболеваний (*M. tuberculosis*, *C. albicans*, *T. gondii*, *M. species*, *H. Simplex I-II*). Качественное определение ДНК ЦМВ в цельной крови выполняли с помощью ПЦР-тест-системы «АмплиСенс Цитомегаловирус-500/ВКО», ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

Исследования по полуколичественному определению ДНК ЦМВ выполняли по оригинальной методике (Шипулина О.Ю. с соавтор., 1998), согласно которой праймеры выбирали в консервативной зоне 4-го экзона гена М1Е 1, детекцию продуктов ПЦР осуществляли электрофоретическим разделением в агарозном геле. Методика позволяла воспроизводимо идентифицировать 10 вирусных геномов при фоновой нагрузке не менее 1 мкг геномной ДНК человека. Для определения титра ДНК ЦМВ готовили четыре 10-кратных разведения исходного лизата, содержащего ДНК из  $10^6$  лейкоцитов в 100 мкл. Проводили реакцию амплификации с каждым разведением, включая исходный лизат. Наличие ПЦР-сигнала только в исходной пробе соответствовало минимальному титру ДНК ЦМВ (1:1), в исходной пробе и первом разведении – низкому, (1:10), в двух разведениях – среднему (1:100), в трех – высокому (1:1000).

С 2005 г. для количественного выявления в режиме реального времени ДНК ЦМВ в лейкоцитах периферической крови, цельной крови, БАЛЖ, биоптатах бронхов использовали «АмплиСенс® CMV-Скрин-Титр-FRT», ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора. В тест-системе ДНК цитомегаловируса нормализована на количество лейкоцитов. Чувствительность тест-систем составляет 5 копий ДНК ЦМВ/ $10^5$  клеток. Линейный диапазон измерения тест-системы: 10 - 1000 000 копий ДНК ЦМВ/ $10^5$  клеток. Для количественного выявления в режиме реального времени ДНК ЦМВ из плазмы периферической крови и спинномозговой жидкости использовали наборы «АмплиСенс® CMV-Монитор-FRT», ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора. Чувствительность тест-систем составляет 200 копий/мл. Линейный диапазон измерения: 500 -  $10^6$  копий ДНК CMV/мл. Клиническое значение (диагностическая чувствительность и специфичность) лабораторного маркера определяли с использованием таблиц сопряженности (2x2).

### **Результаты и обсуждение**

Среди больных на стадии СПИД, госпитализированных в ИКБ №2 г. Москвы в 2002 г., клинически выраженная ЦМВИ имела место в 23,8% случаев, 2003 - 20,9%, 2004 - 9,1%, 2005 - 13,6%, 2006 - 12,9%. Общая частота манифестной ЦМВИ среди больных на стадии 4В (СПИД) соста-

вила 12,1% (167 случаев). Клинически выраженная ЦМВИ в подавляющем большинстве случаев развивалась у ВИЧ-инфицированных больных, имеющих глубокую иммуносупрессию со снижением количества CD4-лимфоцитов менее 100 кл/мкл. Среди умерших больных ВИЧ-инфекцией цитомегаловирусное поражение внутренних органов было доказано в 6,5% случаев в 2002 г., 14,5% (2003), 10,8% (2004), 4,8% (2005), 11,9% (2006). Общая частота манифестной ЦМВИ составила 110 случаев (9,8%) из 1122 погибших больных ВИЧ-инфекцией.

Согласно нашим предыдущим исследованиям наличие в крови больного высокого титра антител класса IgG к ЦМВ или повышение количества анти-ЦМВ IgG более чем в 4 раза в парных сыворотках, а также определение в крови специфических антител класса IgM или цитомегаловируса в моче имеют низкое диагностическое значение и не являются подтверждением цитомегаловирусной природы имеющейся клинической патологии.

Оценка клинического значения наличия ДНК ЦМВ в клетках крови показала, что качественное определение ДНК вируса в лейкоцитах крови является высокочувствительным, но не достаточно специфическим маркером манифестной ЦМВИ. Чувствительность качественного теста по определению ДНК ЦМВ в лейкоцитах периферической крови составила 100%, специфичность 60,5%. У 58,8% обследованных лиц при отсутствии манифестной ЦМВИ была выявлена ДНК ЦМВ в лейкоцитах периферической крови. Напротив, определение полуколичественного содержания ДНК ЦМВ в клетках крови имело высокое клиническое значение. Было установлено, что 97,1% ВИЧ-инфицированных больных с манифестной ЦМВИ имели высокий титр ДНК ЦМВ, равный 1:1000 и более в  $10^5$  лейкоцитах периферической крови. Случаев клинически выраженной ЦМВИ при титре ДНК ЦМВ в лейкоцитах крови менее 1:100 выявлено не было. Лишь у 2,3% больных при отсутствии цитомегаловирусной органной патологии зафиксирован высокий титр ДНК ЦМВ в крови. Чувствительность высокого титра ДНК ЦМВ в лейкоцитах периферической крови в качестве теста, подтверждающего цитомегаловирусную природу органной патологии у больного ВИЧ-инфекцией, составила 97,1%, специфичность 97,7%.

Согласно результатам сравнительного анализа одновременного определения полуколичественного содержания ДНК ЦМВ в лейкоцитах крови и количества копий ДНК ЦМВ в плазме у 543 пациентов не было отмечено ни одного случая обнаружения ДНК ЦМВ в плазме при отсутствии вируса в клетках крови. По мере увеличения титра ДНК ЦМВ в лейкоцитах крови достоверно возрастали частота обнаружения и концентрация ДНК ЦМВ в плазме. ДНК ЦМВ в плазме присутствовала у всех ВИЧ-инфицированных больных с манифестной ЦМВИ, но количественное содержание ДНК вируса в плазме значительно колебалось и было

равно от 2720 до 1000000 коп/мл, составив, в среднем 198639 коп/мл. При этом концентрация ДНК ЦМВ в плазме была менее 10000 коп/мл у 30,5% больных манифестной ЦМВИ, от 10000 до 49000 коп/мл – 33,5%, 50000 - 99000 коп/мл – 8,3%, 100000 - 1000000 коп/мл – 27,7% больных ЦМВИ.

При проведении с 2005 г. 1698 исследований цельной периферической крови, используя тест-систему по количественному выявлению в режиме реального времени ДНК ЦМВ, вирус был определен в 293 образцах (17,2%). Из них ДНК ЦМВ в количестве менее 1  $\log_{10}$  ДНК ЦМВ в  $10^5$  лейкоцитах обнаружили в 17 случаях (5,8%), от 1.0 до 1.9  $\log_{10}$  ДНК ЦМВ – у 123 больных (42%), 2.0 – 2.9  $\log_{10}$  ДНК ЦМВ - 78 (26,6%), 3.0 – 3.9  $\log_{10}$  ДНК ЦМВ - 50 (17,1%), 4.0 – 4.9  $\log_{10}$  ДНК ЦМВ - 22 (7,5%), 5.0 и более  $\log_{10}$  ДНК ЦМВ – у 3 пациентов (1%). Манифестная ЦМВИ была установлена у больных с наличием ДНК ЦМВ в крови в количестве от 1.0 до 1.9  $\log_{10}$  ДНК ЦМВ – в 2,4% случаев, 2 - 2.9  $\log_{10}$  – 29,5%, 3 – 3.9  $\log_{10}$  – 90%, 4 и более  $\log_{10}$  – в 100% случаев.

Чувствительность качественного теста по определению ДНК ЦМВ в цельной крови составила 100%, специфичность 87,7%. У 67,2% обследованных лиц при отсутствии манифестной ЦМВИ была выявлена ДНК ЦМВ в цельной крови. Чувствительность низкого количества ДНК ЦМВ (1.0 - 1.9  $\log_{10}$ ) в  $10^5$  лейкоцитах периферической крови в качестве теста, подтверждающего цитомегаловирусную природу органной патологии у больного ВИЧ-инфекцией, составила 3%, специфичность 92,5%, среднего количества (2.0 - 2.9  $\log_{10}$  ДНК ЦМВ) – 24% и 96,6%, высокого количества (3.0 - 3.9  $\log_{10}$  ДНК ЦМВ) - 46,9% и 99,7% и очень высокого количества (более 4.0  $\log_{10}$  ДНК ЦМВ) – 26% и 100%, соответственно. Выявление ДНК ЦМВ в крови в количестве более 4.0  $\log_{10}$  в  $10^5$  лейкоцитах всегда свидетельствовало о наличие заболевания ЦМВ этиологии (специфичность 100%). В тоже время чувствительность очень высокого количества ДНК ЦМВ в клетках крови оказалась относительно низкой. По-видимому, целесообразно использовать в качестве лабораторного критерия манифестации ЦМВИ показатель количества ДНК ЦМВ в цельной крови «более 3  $\log_{10}$  копий ЦМВ в  $10^5$  лейкоцитах», чувствительность которого составила 72,9% и специфичность – 99,7%.

Отметим, что снижение концентрации ДНК ЦМВ в цельной крови ниже определяемого уровня является показателем эффективности проводимой этиотропной терапии манифестной ЦМВИ. При лечении ВИЧ-инфицированных больных ЦМВИ ганцикловиром или валганцикловиром элиминацию вируса из крови мы наблюдали в 97% случаев.

Возможность полуколичественного и количественного определения ДНК ЦМВ в лейкоцитах крови или цельной крови имеет и большое прогностическое значение. Появление и постепенное повышение количественного содержания ДНК ЦМВ в крови опережает развитие

клинически выраженного ЦМВ-заболевания. Манифестная ЦМВИ развилась в течение года среди наблюдаемых нами ВИЧ-инфицированных пациентов, изначально не имевших ДНК ЦМВ в клетках крови в 0,8% случаев, у больных с минимальным титром (1:1 в  $10^5$  лейкоцитах крови) - 18,2% случаев, низким - (1:10) - 31,3%, средним (1:100) - 50% случаев. У всех больных появлению клинических симптомов предшествовало увеличение титра до высокого уровня (1:1000). Среди пациентов, имевших первоначально высокий титр ДНК ЦМВ в клетках крови, манифестная ЦМВИ развилась за период наблюдения в 92,9% случаев. Частота развития клинически выраженной ЦМВИ в группе пациентов, у которых ДНК ЦМВ первоначально присутствовала в крови хотя бы в минимальном титре, была достоверно выше по сравнению с больными, не имевших ДНК ЦМВ в крови. Клинически выраженную ЦМВИ достоверно чаще отмечали у ВИЧ-инфицированных лиц с высоким содержанием вируса в крови по сравнению с больными с минимальным, низким или средним титром ДНК ЦМВ в лейкоцитах периферической крови.

В настоящее время с целью профилактики развития заболевания ЦМВ-этиологии у больных ВИЧ-инфекцией с наличием ДНК ЦМВ в цельной крови и низким количеством CD4-лимфоцитов целесообразно проведение упреждающей этиотропной терапии. С целью предупреждения развития манифестной ЦМВИ 120 ВИЧ-инфицированным больным с количеством CD4-лимфоцитов в крови менее 100 кл/мкл и наличием ДНК ЦМВ в цельной крови в концентрации  $2.0 - 2.5 \log_{10}$  копий ЦМВ в  $10^5$  лейкоцитах была проведена превентивная терапия ганцикловиром (3 г/сут per os) или валганцикловиром (900 мг/сут per os). Длительность терапии составляла от 1 до 3 месяцев, контроль наличия ДНК ЦМВ в крови проводили один раз в 4 недели, осмотр офтальмолога - один раз в месяц. За время наблюдения за больными в течение 2.5 лет развитие клинически выраженной ЦМВИ зафиксировано у 9 больных (7.5%). При отсутствии превентивной терапии манифестная ЦМВИ могла развиваться у большинства больных данной группы.

Для выяснения клинического значения обнаружения цитомегаловируса в биопсийном материале бронхов и БАЛЖ были проанализированы результаты исследования БАЛЖ и биоптатов бронхов, полученных при проведении диагностической бронхоскопии у 744 больных. ДНК ЦМВ была выявлена в бронхоальвеолярном лаваже у 294 пациентов (39,5% случаев), в биоптатах бронхов - 112 больных (15,1%). Цитомегаловирусное поражение легких было диагностировано среди больных с наличием ДНК ЦМВ в БАЛЖ в 63 (21,4%) случаях, в биоптатах бронхов - в 55 случаях (49,1%). Больные ЦМВ-пневмонией (70 человек) в 63 (90%) случаях имели ДНК ЦМВ в бронхоальвеолярном лаваже, в 55 (78,6%) - в биоптатах бронхов. Следова-

тельно, диагностическая чувствительность наличия ДНК ЦМВ в БАЛЖ составила 90%, но специфичность – лишь 65,7%. Диагностическая чувствительность наличия ДНК ЦМВ в биоптате бронха оказалась равной 78,6%, специфичность – 91,5%. Полученные результаты свидетельствуют, что вследствие низкой специфичности определение ДНК ЦМВ в лаважной жидкости не является достоверным критерием пневмонии цитомегаловирусной этиологии у больных ВИЧ-инфекцией. По сравнению с присутствием возбудителя в БАЛЖ диагностическая чувствительность наличия ДНК ЦМВ в биоптатах бронхов ниже, но диагностическая специфичность существенно выше, что позволяет говорить о высоком клиническом значении определения ДНК ЦМВ в биопсийном материале. Выявление ДНК ЦМВ в биоптате бронха в сочетании с наличием ДНК ЦМВ в крови в количестве не менее  $2 \log_{10}$  ДНК ЦМВ в  $10^5$  лейкоцитах служит основанием для постановки диагноза ЦМВ-пневмонии у ВИЧ-инфицированного больного.

ДНК ЦМВ в лаважной жидкости у ВИЧ-инфицированных больных с количеством CD4-лимфоцитов более 200 кл/мкл присутствовала в 12% случаев, от 200 до 100 кл/мкл – 13,8% и менее 100 кл/мкл – 58,3% случаев. В биоптатах бронхов ДНК ЦМВ была выявлена в группах больных ВИЧ-инфекцией с различной степенью иммуносупрессии, соответственно, в 2,8%, 3,7% и 28,1% случаев. Частота обнаружения ДНК ЦМВ в БАЛЖ и в биоптатах бронхов в группе пациентов с количеством CD4-лимфоцитов менее 100 кл/мкл была достоверно выше чем у больных двух других групп ( $p < 0,001$ ). Следовательно, глубина иммунодефицита у пациентов с ВИЧ-инфекцией определяет активность репликации цитомегаловируса, соответственно - частоту обнаружения ДНК ЦМВ в биологических материалах и вероятность развития манифестной ЦМВИ.

Исследование образцов мокроты показало наличие ДНК ЦМВ в 16,7% случаев, плевральной жидкости в 2,7%, ликвора 2,6% случаев. В биоптатах лимфоузлов ДНК вируса выявили у 7,7%, в биоптатах пищевода, желудка, толстой кишки – 27,4% больных. Наличие ДНК ЦМВ в мокроте не коррелировало с поражением ЦМВ легких. Манифестная ЦМВИ имела место у всех пациентов с наличием ДНК ЦМВ в плевральной жидкости, ликворе, в биоптатах желудка и толстой кишки, у большинства больных с наличием ДНК ЦМВ в биоптате пищевода.

### **Выводы**

1. Высокое количество ДНК ЦМВ в лейкоцитах периферической крови или в цельной крови (более  $3.0 \log_{10}$  в  $10^5$  лейкоцитах) является основным маркером, подтверждающим цитомегаловирусную природу поражения органов у больных ВИЧ-инфекцией. Определение ДНК ЦМВ в плазме имеет меньшее клиническое значение

вследствие большого колебания концентрации ДНК ЦМВ в плазме у ВИЧ-инфицированных больных с манифестной ЦМВИ.

2. Появление ДНК ЦМВ в лейкоцитах крови и постепенное повышение вирусной нагрузки опережает развитие клинически выраженного ЦМВ-заболевания, следовательно, количественное определение ДНК ЦМВ в цельной крови имеет и большое прогностическое значение. Определение ДНК ЦМВ в цельной крови является оптимальным для оценки необходимости начала упреждающей терапии.

3. Определение в крови ВИЧ-инфицированного больного четырехкратного увеличения титра антител класса IgG к ЦМВ, анти-ЦМВ IgM, а также выявление цитомегаловируса в моче не достаточно ни для установления факта активной репликации ЦМВ, ни для подтверждения диагноза манифестной ЦМВ-инфекции.

4. Обнаружение ДНК ЦМВ в биопсийных материалах, полученных при проведении диагностической бронхоскопии у больных ВИЧ-инфекцией, служит чувствительным и высоко специфическим маркером цитомегаловирусного поражения легких. Напротив, вследствие низкой специфичности определение ДНК ЦМВ в лаважной жидкости не является достоверным критерием пневмонии цитомегаловирусной этиологии у больных ВИЧ-инфекцией. Наличие ДНК ЦМВ в мокроте не коррелирует с поражением ЦМВ легких.

5. Выявление ДНК ЦМВ в плевральной жидкости, ликворе, в биоптатах желудка и толстой кишки в подавляющем большинстве случаев свидетельствует о цитомегаловирусной этиологии поражения легких, ЦНС, пищеварительного тракта у больных ВИЧ-инфекцией.