

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА ПАРВОВИРУСА В19 У БЕРЕМЕННЫХ

*Пикасова О.В. \*, Гнетецкая В.А. \*\*, Домонова Э.А. \*, Сафонова А.П. \*, Шипулина О.Ю. \*, Шипулин Г.А. \**

*\* ФГУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, \*\* Центр планирования семьи и репродукции, Москва, Россия*

### **Введение**

Инфекция парвовируса В19 имеет широкое распространение в мире. Более половины взрослого населения развитых стран серопозитивны по IgG антителам, что свидетельствует о перенесенном ранее заболевании в явной или скрытой форме. Парвовирус В19 является возбудителем инфекционной эритемы (пятой болезни), основным этиологическим фактором апластических кризов, тяжелых гемолитических анемий, а также вызывает артриты и артропатии различной степени тяжести. Инфекционная эритема – частое заболевание детей школьного и дошкольного возраста, в некоторых случаях проявляющаяся на щеках специфическим «синдромом следов от пощечин». Чаще данное заболевание характеризуется неспецифическим набором симптомов: сыпь, лихорадка, лимфоаденопатия, боль в шее и/или суставах, кашель, насморк, диарея, головная боль, конъюнктивит, слабость. У взрослых людей заболевание часто протекает бессимптомно. При первичной инфекции во время беременности парвовирус В19 может передаваться через плаценту плоду. Парвовирусная инфекция матери не приводит к образованию внутриутробных аномалий, однако в случае попадания парвовируса В19 в организм плода частота неблагоприятных исходов беременности составляет 20-30%, и в частности приводит к гибели плода по разным данным в 10-15% случаев. Особую опасность составляет первичное инфицирование беременной женщины, при котором повышается риск передачи вируса плоду. Риск трансплацентарного заражения различен и зависит от срока гестации. Заражение беременных парвовирусом В19 в первую половину беременности может привести к эмбриопатии. Парвовирус В19 проявляет тропность к быстро делящимся нормобластам, вызывая тяжелую гемолитическую анемию плода, и иногда к развитию неиммунной водянки плода. Использование чувствительных и точных методов диагностики и внедрение комплекса противоэпидемических мероприятий позволит снизить вероятность инфицирования.

Присутствие парвовируса В19 может очень длительное время (до года) фиксироваться в крови прямыми и косвенными методами. В острой фазе вирусемия в крови может достигать высоких значений – до  $10^{12}$  ГЭ/мл. Антитела класса IgM к парвовирусу В19 у здоровых людей

могут пропадать сравнительно быстро, но могут обнаруживаться в плазме на низких титрах до полугода (1, 2). Использование серологического анализа во время беременности имеет ряд особенностей. Титр специфических антител класса IgM у крови матери может опускаться до недектируемых значений к моменту появления симптомов у плода, а образование антител класса IgG может при этом запаздывать. У плода и новорожденных, заражение которых произошло в первые 14 недель гестации, что подтверждалось определением ДНК парвовируса В19 методом ПЦР, антитела класса IgM в пуповинной крови обнаруживаются редко (в ~22% случаев). Однако, при инфицировании плода в последнем триместре беременности, IgM антитела детектируются в 100% случаев. Антитела класса IgM появляются в середине беременности, что делает диагностические тесты на определение IgM антител у плода менее чувствительными. При заражении плода до этого момента вероятность выработки специфических IgM антител минимальна, что объясняется неразвитым иммунитетом плода, а также подавлением выработки вирусспецифических IgM антител в связи с циркуляцией пассивно полученных материнских антител. Таким образом, определение вирусной ДНК методом ПЦР в клиническом материале служит наиболее достоверным инструментом диагностики парвовирусной инфекции (3).

### **Цель и задачи**

По причине недостаточного опыта диагностики парвовирусной инфекции в нашей стране большое значение имеет совершенствование алгоритма тестирования беременных женщин в акушерско-гинекологической практике. В задачи представленной работы входило определить частоту встречаемости парвовируса В19 при обследовании беременных с патологиями развития плода, оценить вирусную нагрузку в организме беременной женщины, амниотической жидкости и в пуповинной крови, динамику обнаружения ДНК вируса в материнской крови, обозначить особенности дифференциальной диагностики парвовирусной инфекции в отсутствие специфической симптоматики.

### **Материалы и методы**

Для определения распространенности парвовирусной инфекции среди беременных и выявления парвовируса В19, как этиологического фактора развития неиммунных водянок плода, была протестирована группа беременных женщин с предположительным диагнозом «водянка плода». В контрольную группу входили женщины с нормальным течением беременности. В качестве подтверждающего метода использовался иммунофлуоресцентный анализ определения антител классов IgG и IgM в материнской крови.

Проводился анализ следующего клинического материала: лейкоцитов крови и плазмы крови, мазков из зева и носоглотки, слюны, ам-

ниотической жидкости, ворсин хориона, асцитической (торокальной) жидкости.

Для определения В19 IgG и В19 IgM антител методом иммунофлуоресцентного анализа использовался единый диагностический набор Biotrin Inc., Dublin, Ireland. Для выявления ДНК парвовируса В19 использовался ПЦР набор реагентов «АмплиСенс® вариант FRT Parvovirus В19». Аналитическая чувствительность последней составляет 400 ГЭ/мл. Полимеразная цепная реакция с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» проводилась с использованием прибора «Rotor Gene 3000/6000» (Corbett Research, Австралия).

### **Основные результаты**

Всего за двухлетний период было зафиксировано 22 случая водянок плода, из которых 5 случаев приходилось на первый триместр беременности, 11 – на второй и 6 – на третий триместр. Из них в 4 случаях был поставлен диагноз «парвовирусная инфекция». Все 4 примера парвовирусных водянок плода относились ко второму триместру беременности, а именно: один – 13-18 недели и три остальные – после 20 недели. Соответственно, в первом случае не проводился кордоцентез, а исследовалась только материнская кровь. В трех других случаях количественное сравнение вирусной нагрузки ДНК парвовируса В19 в материнской и пуповинной крови показал, что концентрация ДНК возбудителя в крови плода на 4-5 порядков превышает таковую в материнской. При обнаружении факта развития водянки и трансплацентарного инфицирования плода на 20-23 неделе концентрация ДНК парвовируса в амниотической жидкости составляла порядка  $10^9$  копий на мл образца, в материнской крови –  $10^3$ - $10^4$  копий/мл плазмы или  $10^4$ - $10^6$  копий/ $10^6$  клеток, в пуповинной крови –  $10^8$ - $10^9$  копий/мл плазмы или  $10^6$ - $10^{10}$  копий/ $10^6$  клеток.

В результате исследования была определена встречаемость возбудителя у беременных женщин, его связь с развитием инфекции, а также процент случаев водянок плода, связанных с трансплацентарным инфицированием парвовирусом В19. В процессе дифференциальной диагностики этиологии наблюдаемых отклонений при обнаружении признаков водянки плода была определена роль других инфекционных факторов. В одном случае у плода отмечались водяночные изменения, а при проведении лабораторных анализов из группы тестируемых возбудителей обнаруживалась только ДНК вируса Эпштейн-Барра. Вирусная ДНК содержалась в большом количестве в мазке из зева беременной женщины и в хорионе ( $6 \cdot 10^8$  и  $3 \cdot 10^9$  копий ДНК/мл образца, соответственно), меньшее количество ДНК ( $10^7$  копий ДНК/мл образца) определялась в материнской кро-

ви. Столь высокие нагрузки ДНК служат свидетельством развития вируса в организме хозяина. Однако вероятность того, что вирус Эпштейн-Барра в данном конкретном случае служил этиологическим фактором развития водянки плода сомнительна.

В зависимости от времени, прошедшего с момента инфицирования, стратегия проводимой диагностики может быть различной. В ответ на инфекцию происходит выработка специфических иммуноглобулинов. Антитела класса IgM появляются на 10-12 день после заражения, еще через 1-2 дня определяются максимальные значения титра IgM, после чего концентрация их в плазме снижается. Антитела класса IgM держатся в плазме 3-4 месяца (иногда дольше), после чего пропадают полностью. IgG антитела появляются позже – через 14-18 дней после заражения, после чего наблюдается нарастание титра до максимальных значений, которые отмечаются к 25-30 дню с момента инфицирования. В течение следующего года-полутора определяется высокий уровень IgG антител. IgG сохраняются в плазме пожизненно, защищая от повторного развития инфекции. С самых первых дней с момента инфицирования, в период серологического окна, определение парвовируса В19 в организме человека проводят, определяя ДНК возбудителя методом ПЦР. Концентрация ДНК максимальна на 5-7 день развития инфекции. Как правило, лабораторная диагностика заболевания начинается после обнаружения у пациента клинических проявлений. Клиника парвовирусной инфекции, характеризуется двухфазностью, на первом этапе отмечают лихорадку, озноб, головную боль, миалгию, а на втором – сыпь и артралгию, если симптомы вообще возникают. Так, выявление инфекции в первый период с неспецифическим симптомокомплексом сложно в силу отсутствия показателей к назначению анализа. В наших случаях проводились исследования, начиная с 15-20 дня с момента инфицирования. В этот период были зафиксированы максимальные нагрузки ДНК в крови –  $10^5$  копий ДНК/мл плазмы, или 5 Ig. Через 10 дней этот показатель составил 4,5 Ig и на 60 день – от 4 Ig до 3,6 Ig. В течение следующего года вирусная нагрузка в плазме наблюдаемой пациентки составила 2,5-3 Ig числа копий ДНК/мл плазмы. В клетках крови наблюдалась следующая динамика: на начало исследования – 6 Ig числа копий ДНК/ $10^6$  клеток крови, спустя 10 дней – 6,9 Ig, к 60 дню – 5,6 Ig, к 80 дню – 4,5 Ig, к 150 – 2 Ig. После перенесенного заболевания ДНК парвовируса В19 может выделяться методом ПЦР может выделяться очень длительное время (до года-полутора) в плазме и клетках крови в концентрации  $10^2$  копий/мл плазмы (2 Ig числа копий ДНК/мл) или  $10^2$  копий/ $10^6$  клеток крови (2 Ig числа копий ДНК/ $10^6$  клеток крови), соответственно.

### **Выводы**

При развитии парвовирусной инфекции у плода отмечается чрезвычайно активная вирусемия, определяющая высокую концентрацию ДНК вируса в пуповинной крови и окружающей амниотической жидкости. Таким образом, доказательством внутриутробной передачи парвовируса В19 служит обнаружение ДНК парвовируса в крови и тканях плода, амниотической жидкости и тканях плаценты. Методы количественного определения титра ДНК парвовируса В19 позволяют отслеживать динамику развития инфекционного процесса, что имеет огромное значение для определения тактики ведения беременности. При обнаружении патологий неясной этиологии точные молекулярные методики служат незаменимым инструментом, чтобы отсечь или подтвердить инфекционную природу заболевания.

В результате исследования была определена частота встречаемости парвовируса В19 при обследовании беременных с водяночными патологиями развития плода и составила 4 случая из 21, или 19%.

Определена количественная динамика изменения концентрации ДНК в крови пациента в период после перенесенного заболевания.

Молекулярные методы позволяют в короткие сроки обнаружить ДНК/РНК возбудителя заболевания, в том числе и низкие концентрации, в клиническом материале, провести дифференциальную диагностику, определить моно- или микст-инфекцию, а также оценить количественно концентрацию возбудителя в организме, что позволяет прогнозировать дальнейшее течение беременности, назначать и оценивать эффективность необходимого лечения и профилактических процедур.

### **Список литературы**

1. Heegaard E.D., Brown K.E. Human Parvovirus B19 // *Clinical Microbiology Reviews*, 2002, Vol. 15, No. 3, p. 485–505
2. Neal S. Young, M.D., and Kevin E. Brown, M.D. Parvovirus B19 // *The New England Journal of Medicine*, 2004, No. 350, pp.586-97.
3. Nyman M., Tolfvenstam T., Petersson K., Krassny C., Skjoldebrand-Sparre L., Broliden K. Detection of Human Parvovirus B19 Infection in First-Trimester Fetal Loss // *Obstetrics & Gynecology*, 2002, Vol. 99, No. 5, Part 1, pp. 795-798