

В. И. Шахгльдян, О. Ю. Шипулина, Н. В. Каражас, В. М. Стаханова, Л. Ф. Евсева, О. А. Тишкевич

## ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ

Федеральный научно-методический центр Минздрава РФ по профилактике и борьбе со СПИДом, НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи РАМН, НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского РАМН, клиническая инфекционная больница № 2, Москва

*В настоящее время манифестная цитомегаловирусная инфекция (ЦМВИ) занимает одно из первых мест в структуре вторичных заболеваний у больных В И Ч-инфекцией, нередко являясь непосредственной причиной их гибели.*

*С целью выявления наиболее чувствительных и специфических лабораторных маркеров манифестной ЦМВИ у ВИЧ-инфицированных больных авторами были проанализированы результаты комплексного обследования 250 пациентов на наличие специфических антител IgM и 4-кратного повышения антител IgG в сыворотке крови, ЦМВ в моче, различных титров ДНК ЦМВ в лейкоцитах периферической крови. 35 человек из данной группы имели манифестную ЦМВИ. ЦМВ-этиология поражения органов была подтверждена гистологическими исследованиями.*

*Специфичность и чувствительность высокого титра ДНК ЦМВ в лейкоцитах периферической крови как маркеров клинически выраженной ЦМВИ явились наиболее высокими, равными соответственно 97,1 и 97,7%. Проведенное исследование показало, что высокий титр ДНК ЦМВ, равный 1:1000 и более в  $10^5$  лейкоцитах периферической крови, является наиболее достоверным критерием активной репликации ЦМВ и его обнаружение доказывает наличие у больного манифестной ЦМВИ. Появление ДНК ЦМВ в крови ВИЧ-инфицированного пациента служило неблагоприятным прогностическим признаком развития манифестной ЦМВИ.*

*Ключевые слова: ЦМВИ, ВИЧ-инфекция, ПЦР-диагностика.*

*Today cytomegalovirus (CMV) infection ranks among the first in the structure of second diseases in patients with HIV infection, often being the direct cause of their death. In order to define the most sensitive and specific laboratory markers of manifest CMV infection in HIV infected patients, the authors analysed the results of screening of 250 patients for specific IgM antibodies and 4-fold rise of serum IgG level, CMV in the urine, and titers of CMV DNA in peripheral blood leukocytes. Thirty-five of these patients had manifest CMV infection. CMV etiology of organ involvement was confirmed by histological findings. The specificity and sensitivity of high titer of CMV DNA in peripheral blood leukocytes as a marker of clinically manifest CMV infection were the highest (97.1 and 97.7%, respectively). High titer of CMV DNA (1:1000 and higher per  $10^5$  peripheral blood leukocytes) is the most reliable criterion of active CMV replication, and its detection indicates a manifest CMV infection. Appearance of CMV DNA in the blood of a HIV infected patient was an unfavorable prognostic sign predicting manifest CMV infection.*

*Key words: CMV infection, HIV infection, diagnosis by polymerase chain reaction*

В современной клинической медицине проблема цитомегаловирусной инфекции (ЦМВИ) приобретает все большую актуальность в связи с широким распространением ВИЧ-инфекции. Манифестная ЦМВИ — одно из наиболее частых и тяжелых вторичных заболеваний у больных СПИДом, которое нередко является непосредственной причиной их гибели. Клиническая картина ЦМВИ не имеет своих однозначных очертаний и диагноз данного заболевания требует обязательного лабораторного подтверждения. На сегодняшний день мнения специалистов о диагностической ценности различных лабораторных методов противоречивы. Мало изучено значение специфических лабораторных маркеров для прогноза развития манифестной ЦМВИ у ВИЧ-инфицированных лиц.

### Материалы и методы

В течение 5 лет под нашим наблюдением находились 300 взрослых больных ВИЧ-инфекцией, проходивших лечение в КИБ № 2 Москвы и в поликлиническом отделении МГЦ СПИД.

Выявление в сыворотке крови антител к ЦМВ класса IgM (качественный анализ) и класса IgG (количественный анализ) осуществляли методом ИФА с использованием коммерческих диагностических наборов (ЗАО "ДИА-Плюс", Рош—Москва). Исследования проводились с интервалом 2—4 нед.

Обнаружение ЦМВ в моче пациентов проводили

путем изоляции ЦМВ на зараженной чувствительной клеточной культуре. Идентификация вируса была основана на характерном цитопатическом эффекте и на определении ЦМВ-антигенов методом иммунофлюоресценции с использованием специфических поликлональных антител.

Качественное и количественное определение ДНК ЦМВ в крови, ликворе, тканях пораженных органов осуществляли с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР). Исследования по определению ДНК ЦМВ были выполнены по оригинальной методике [5], которая позволила воспроизводимо идентифицировать 10 вирусных геномов при фоновой нагрузке не менее 1 мкг геномной ДНК человека. Для определения титра ДНК ЦМВ готовили 4 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 2 разведениях — среднему (1:100), в 3 — высокому (1:1000).

Подтверждением ЦМВ-поражения органов считали обнаружение в измененных тканях цитомегалоклеток (ЦМК) и ДНК ЦМВ.

### Результаты и обсуждение

Манифестную ЦМВИ наблюдали у 47 (39,2%) из

120 больных ВИЧ-инфекцией на стадии вторичных проявлений ИВ (СПИД). Чаще всего имели место некротический ретинит, эрозивно-язвенный колит или энтероколит, эрозивно-язвенный эзофагит, пневмония, некротический энцефаловентрикулит, полирадикулопатия, тяжелое поражение надпочечников. ЦМВ-поражение внутренних органов явилось непосредственной причиной смерти у 17,5% больных СПИДом.

С целью выявления наиболее чувствительных и специфических лабораторных маркеров манифестной ЦМВИ было проведено комплексное обследование 250 пациентов на наличие специфических антител IgM и 4-кратного повышения антител IgG в сыворотке крови, ЦМВ в моче, различных титров ДНК ЦМВ в лейкоцитах периферической крови. 35 человек из данной группы страдали манифестной ЦМВИ.

Согласно полученным данным больные были распределены по 4 группам в зависимости от отрицательного или положительного значения лабораторного признака, а также наличия или отсутствия клинически выраженной ЦМВИ. Соответственно по каждому лабораторному параметру было получено определенное число больных:

— с истинно-положительным (ИП) в отношении диагноза ЦМВИ значением маркера, когда присутствует и лабораторный маркер, и клинически выраженная ЦМВИ;

— с ложноположительным (ЛП) значением, когда имеется лабораторный маркер, но отсутствует манифестная ЦМВИ;

— с истинно-отрицательным (ИО) значением, когда отсутствуют и лабораторный маркер и клинически выраженная ЦМВИ;

— с ложноотрицательным (ЛО) значением, когда нет в наличии лабораторного маркера, но имеется манифестная ЦМВИ.

Таблица 1

**Специфичность и чувствительность маркеров активности ЦМВ при развитии манифестной ЦМВИ у больных СПИДом**

Маркеры активности ЦМВ	Количество больных с результатами				Специфичность, %	Чувствительность, %
	ИП	ЛО	ЛП	ИО		
4-кратное увеличение анти-ЦМВ IgG	12	23	47	168	34,3	78,1
Анти-ЦМВ IgM	23	12	35	180	65,7	83,7
Наличие ЦМВ в моче	25	10	46	169	71,4	78,6
ДНК ЦМВ в лейкоцитах крови (качественный анализ)	35	0	85	130	100	60,5
ДНК ЦМВ в лейкоцитах крови в титре 1:1000	34	1	5	210	97,1	97,7

Специфичность диагностического признака определяли согласно формуле:  $100\% \cdot \text{ИП} / (\text{ИП} + \text{ЛО})$ ; чувствительность —  $100\% \cdot \text{ИО} / (\text{ИО} + \text{ЛП})$ .

Как видно из табл. 1, специфичность и/или чувствительность 4-кратного увеличения анти-ЦМВ IgG, наличия специфических антител IgM в сыворотке крови, ЦМВ в моче, ДНК ЦМВ в лейкоцитах (без учета ее количества) — в качестве подтверждающих лабораторных признаков манифестной ЦМВИ

оказались низкими. Напротив, специфичность и чувствительность высокого титра ДНК ЦМВ в лейкоцитах периферической крови как маркера клинически выраженной ЦМВИ явились наиболее высокими и равными соответственно 97,1 и 97,7%.

Демонстрацией вышесказанного служат следующие данные. 4-кратное повышение титров антител IgG и обнаружение антител IgM в сыворотке крови имели место у больных с манифестной ЦМВИ лишь в 34,3 и 65,7% случаев соответственно (табл. 2). У 1/3 больных, несмотря на продолжающееся развитие заболевания, анти-ЦМВ IgM перестали определяться. С другой стороны, в группе ВИЧ-инфицированных лиц, не имевших какой-либо клинической симптоматики, связанной с действием ЦМВ, повышение титров специфических анти-IgG и IgM антитела выявляли в крови соответственно в 21,9 и 16,3% случаев. Помимо этого, среди пациентов, у которых не было выявлено не только заболевания ЦМВ-этиологии, но и активной ЦМВИ (в их крови ДНК ЦМВ отсутствовала даже в минимальном титре), высокие титры антител IgG и IgM обнаруживали соответственно у 16,1 и 13,2%. Данный факт вполне объясним, так как из литературы известно, что тест на наличие анти-ЦМВ IgM может быть положительным, в частности, из-за присутствия в сыворотке крови больного ревматоидного фактора, при активной репликации других герпес-вирусов, у лиц, страдающих коллагенозами [8]. Низкие титры антител IgG к ЦМВ и отсутствие специфических антител IgM при наличии в крови ДНК ЦМВ в высокой концентрации можно объяснить (помимо существующих ограничений в чувствительности и специфичности используемых методов) характером иммунного ответа при длительно персистирующих в организме человека вирусных инфекциях и имеющимся нарушением продукции антител у больных на поздних стадиях ВИЧ-инфекции вследствие существенного подавления у них не только Т-, но и В-клеточного звена иммунитета [3]. Проведенный анализ всех ложноположительных и ложноотрицательных результатов обнаружения специфических антител IgM в сыворотке крови пациентов по отношению к определению у них в крови ДНК ЦМВ (наиболее достоверному маркеру активной репликации ЦМВ) показал отсутствие строгой корреляции между выявлением анти-ЦМВ IgM и обнаружением ДНК вируса. Согласно полученным результатам, использование только серологических методов для выявления активной ЦМВИ у ВИЧ-инфицированных пациентов может привести к ошибочной постановке диагноза почти в 40% случаев.

В то же время нами отмечены эпизоды длительной (более 3 мес) персистенции в крови пациентов антител IgM к ЦМВ в сочетании с низкими титрами IgG-антител и низкой концентрацией ДНК ЦМВ в лейкоцитах крови. У ряда лиц срок обнаружения анти-IgM достигал 9 мес. Причины столь длительного определения специфических антител IgM и отсутствие значительного повышения титров IgG после реинфекции или реактивации ЦМВ не вполне ясны. Повидимому, это связано с определенным дефектом в механизме переключения выработки В-клетками анти-IgM на продукцию ими антител IgG.

Возможно, играли роль постоянная антигенная стимуляция В-клеток и дефицит Т-хелперов, значение которых в качестве стимулятора синтеза отличных от IgM-антител установлено [3]. Интересен следующий факт: в группе ВИЧ-инфицированных пациентов, в крови которых IgM к ЦМВ определяли длительное время (более 3 мес с начала обследования), манифестная ЦМВИ развивалась в течение 12 мес значительно чаще (в 52,3% случаев), чем у лиц, имевших специфические антитела данного класса кратковременно (35,0%) или не имевших их вообще (10,0%).

Таблица 2  
Частота обнаружения специфических маркеров у больных манифестной ЦМВИ в группе пациентов, не имеющих клинических проявлений заболевания

Маркеры активной ЦМВИ	Частота обнаружения маркера у больных манифестной ЦМВИ, %	Частота обнаружения маркера у больных без манифестной ЦМВИ, %
4-кратное повышение анти-ЦМВ IgG в крови	34,3	21,9
Анти-ЦМВ IgM в крови	65,7	16,3
Наличие ЦМВ в моче	71,4	21,4
Наличие ДНК ЦМВ в лейкоцитах крови (качественный анализ)	100	39,5
Наличие высокого титра ДНК ЦМВ в лейкоцитах крови	97,1	2,3

При проведении вирусологических исследований у 71,4% больных манифестной ЦМВИ вирус был выделен из мочи. В то же время в группе лиц, не имевших клинические проявления заболевания, ЦМВ в моче был обнаружен в 21,4% случаев (см. табл. 2). При одновременных исследованиях на наличие ДНК ЦМВ в лейкоцитах крови и ЦМВ в моче выявлено совпадение результатов лишь в 65,8% случаев. У 21,6% пациентов ЦМВ был выделен из мочи при отсутствии ДНК ЦМВ в крови даже в минимальном титре, т. е. при отсутствии существенной активности ЦМВ. По данным ряда исследований, у человека, перенесшего острую ЦМВИ или ее реактивацию, вирус может выделяться с мочой в течение 3—5 лет [4]. Таким образом, изоляция ЦМВ из мочи ВИЧ-инфицированных лиц не может быть единственным лабораторным критерием как при решении вопроса о наличии у них активной ЦМВИ, так и при постановке диагноза, связанного с ЦМВ-заболевания.

В практике лабораторной диагностики активной ЦМВИ все большее значение приобретает метод, основанный на ПЦР [1, 2, 7]. Опыт нашей работы показал, что положительный результат при качественном варианте ПЦР (определение ДНК ЦМВ в лейкоцитах периферической крови без учета ее титра) свидетельствует об активности инфекционного процесса, но не позволяет судить о его степени, что необходимо для подтверждения манифестной ЦМВИ. Все ВИЧ-инфицированные пациенты с клинически выраженной ЦМВ-патологией имели ДНК ЦМВ в крови. При этом у 39,5% обследованных лиц, не имеющих заболевания ЦМВ-этиологии, также обнаружена ДНК ЦМВ (см. табл. 2). Ряд авторов обращают внимание на то, что при диагностике инфекций, вызываемых вирусами, длительно

персистирующими в организме человека, диагностическая и прогностическая ценность положительных результатов ПЦР при выявлении вирусного генома в крови без учета его концентрации довольно низкая [7, 11]. Этот недостаток качественного варианта ПЦР исходит из ее очень высокой чувствительности и состоит в способности выявлять возбудитель, находящийся в крайне незначительном количестве в биологических жидкостях.

Иное, высокое клиническое значение имеют данные, полученные при использовании количественного варианта ПЦР. В нашем исследовании 97,1% ВИЧ-инфицированных больных с манифестной ЦМВИ имели высокий титр ДНК ЦМВ, равный 1:1000 и более в  $10^5$  лейкоцитах периферической крови (см. табл. 2). Лишь у одного пациента титр ДНК ЦМВ был равен 1:100. Случаев клинически выраженной ЦМВИ при титре ДНК ЦМВ в лейкоцитах крови менее 1:100 выявлено не было. Лишь у 2,3% больных при отсутствии органной ЦМВ-патологии зафиксирован высокий титр ДНК ЦМВ в крови. Полученные данные убедительно свидетельствуют, что выявление ДНК ЦМВ в титре 1:1000 и более в лейкоцитах крови больного, имеющего те или иные клинические симптомы, доказывает наличие у него манифестной ЦМВИ. Проведенные исследования в медицинских центрах США также демонстрируют возможность выделения определенного уровня ЦМВ-нагрузки в клетках крови или плазме, указывающего на имеющее место заболевание ЦМВ-этиологии [7, 10, 11]. Диагностическое значение имеет факт обнаружения ДНК ЦМВ в спинномозговой жидкости при поражении ЦМВ центральной нервной системы (ЦНС). Так, 80,8% ВИЧ-инфицированных больных с ЦМВ-энцефалитом имели ДНК ЦМВ в ликворе в отличие от 3,8% пациентов с поражением ЦНС иной этиологии. Большую диагностическую ценность имеет наличие ДНК ЦМВ в биопсийных и аутопсийных материалах из пораженных органов. Мы считаем, и это находит подтверждение в ряде зарубежных работ [6, 9], что присутствие ДНК ЦМВ в патологически измененной ткани имеет такую же высокую диагностическую значимость, как и обнаружение в ней ЦМК.

Помимо вышеизложенного, факт обнаружения ДНК ЦМВ в крови ВИЧ-инфицированных больных является и неблагоприятным прогностическим признаком, свидетельствующим о вероятном развитии у них уже в течение последующего года манифестной ЦМВИ. В течение 12 мес наблюдения среди пациентов, изначально не имевших ДНК ЦМВ в крови, клинически выраженная ЦМВИ развилась лишь в 0,8% случаев, у больных с первоначально минимальным титром ДНК ЦМВ — в 18,2%, низким — в 31,3%, средним — в 50,0% случаев. Во всех случаях появлению клинических симптомов предшествовало увеличение титра ДНК ЦМВ до высокого уровня. Среди пациентов, у которых первоначально ДНК ЦМВ была в высоком титре, заболевание, связанное с ЦМВ, диагностировано в 92,9%. Клинически выраженная ЦМВИ достоверно чаще развивалась у лиц с высокой

вирусной нагрузкой, нежели у пациентов со средним, низким или минимальным титром ДНК ЦМВ. Срок развития заболевания от момента выявления высокого титра ДНК ЦМВ не превышал 90 дней ( $53,0 \pm 3,8$  дня). Сходные результаты были получены и S. Spector [11], который показал, что наличие у больного ВИЧ-инфекцией ДНК ЦМВ в плазме повышает риск развития манифестной ЦМВИ в 3,5 раза.

Безусловным достоинством использования количественного варианта ПЦР при выявлении ДНК ЦМВ является возможность оценки эффективности проводимого лечения. Этиотропное лечение препаратом "Цимевен" (ганцикловир) было проведено нами у 29 пациентов с манифестной ЦМВИ. При завершении лечебного курса (5 мг/кг 2 раза в сутки внутривенно в течение 21 дня) параллельно с купированием клинических проявлений у 93,1% больных имело место снижение концентрации ДНК ЦМВ в крови в 1000 раз и более, в половине случаев — до неопределяемого уровня.

Таким образом, ЦМВ в организме человека может находиться в латентном состоянии, в стадии активной репликации без развития органных поражений или быть причиной тяжелой клинически выраженной патологии. В связи с этим проблема лабораторного подтверждения манифестной ЦМВИ заключается не в установлении самого факта присутствия ЦМВ в организме человека и даже не в выявлении косвенных признаков его активности, а в определении той высокой степени вирусной активности, которая обуславливает патологические изменения в органах и соответственно подтверждает ЦМВ-природу имеющихся у больного клинических проявлений.

Наличие в крови ВИЧ-инфицированного больного анти-IgM к ЦМВ и/или существенное увеличение титров специфических антител IgG недостаточно ни для установления факта активной репликации ЦМВ, ни для подтверждения диагноза манифестной ЦМВИ. Изоляция ЦМВ из мочи обладает большей

специфичностью и чувствительностью по сравнению с серологическими маркерами, однако также приносит малую диагностическую пользу. Положительный результат при определении ДНК ЦМВ в клетках крови без учета концентрации вируса свидетельствует об активной репликации ЦМВ, но не позволяет судить о ее степени, что необходимо для подтверждения диагноза ЦМВИ. Достоверным критерием высокой активности ЦМВ, доказывающим его этиологическую роль в развитии тех или иных клинических синдромов, служит высокий титр ДНК ЦМВ в лейкоцитах периферической крови, обнаруживаемый почти у 100% лиц с клинически выраженной ЦМВИ и отсутствующий у больных, имеющих другие оппортунистические заболевания. Наличие высокого титра ДНК ЦМВ в лейкоцитах крови является неблагоприятным прогностическим признаком развития манифестной ЦМВИ, и его выявление требует безотлагательного начала этиотропной терапии.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ведяков А. М., Долгих М. С. // Тер. арх. — 1998. - Т. 70, № 4. — С. 45—48.
2. Долгих М. С. // Трансплантол. и искусств. органы. — 1995. — № 3-4. - С. 89-93.
3. Иммунология инфекционного процесса / Под ред. В. И. Покровского и др. — М., 1993.
4. Каражас Н. В. // Рос. мед. вестн. - 1997. - Т. 2, № 2. - С. 34-38.
5. Шипулина О. Ю., Шахгильдян В. И., Шипулин Г. А. и др. // Вопр. вирусол. - 1998. - № 2. - С. 91-95.
6. Cardenaso L., Vallejo P. // Clin. Microb. Infect. — 1997. - Vol. 3. - P. 249.
7. Gerna G., Balanfi F., Zeila D. et al. // Scand. J. Infect. Dis. — 1995. - Suppl. 99. - P. 11-15.
8. Landini M. P., Afarh M. // Ibid. — P. 18—24.
9. Rodriguez-Barradas M. C., Stool K, Musher D. M. et al. // Clin. Infect. Dis. — 1996. - Vol. 23. — P. 76—81.
10. Shimkai M., Bozzette S. A., Powderly W. et al. // J. Infect. Dis. — 1997. - Vol. 175. - P. 32-38.
11. Spector S. A. // Antiviral Ther. - 1997. - Vol. 2. - P. 200-205.