

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ У ИММУНОКОМПРОМЕТИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ

Е.Ю. Падалко

Госпиталь Университета г. Гента, Гент, Бельгия

Резюме. Высокая восприимчивость к инфекциям иммунокомпрометированных пациентов (в частности реципиентов при пересадке органов), обусловлена уязвимостью иммунной системы таких лиц к факторам внешней и внутренней среды, что требует формирования специальных подходов в лабораторной диагностике, основанной на глубоком и всестороннем понимании специфики вирусных инфекций у такой популяции пациентов. В рамках данной работы рассмотрены современные представления о течении инфекций, и, в частности, инфекции цитомегаловирусной природы у пациентов с пониженным иммунитетом, и даны объективные ориентиры для лабораторной диагностики этой инфекции.

Ключевые слова: иммунокомпрометированные пациенты, вирусные инфекции, цитомегаловирус (CMV), лабораторная диагностика.

Инфекции у лиц с пониженным иммунитетом требуют отдельного рассмотрения в связи с многочисленными факторами. Следует принимать во внимание повышенную восприимчивость данных пациентов к инфекциям и слабую возможность защиты вследствие нарушения клеточного иммунитета, высокую чувствительность к изменениям окружающей среды, что, в свою очередь, связано с необходимостью защиты от микроорганизмов, не являющихся проблемными для иммунокомпетентных лиц. Особое значение имеет учет очевидных географических и сезонных особенностей микроорганизмов. Кроме того, важно считаться с расширенным патогенным спектром, включающим вирусы (*Herpesviridae*), грибки (*Aspergillus*, *Pneumocystis*), внутриклеточные бактерии (*Listeria*, *Mycobacterium*), а также со спецификой, связанной с типом пересаженного органа и характерным временным периодом повышенной вероятности возникновения инфекции, вызванной определенным микро-

организмом [9]. В этом аспекте специального пристального внимания заслуживают вирусные инфекции, и, в частности, инфекции герпесвирусной природы. *Herpesviridae* представляют собой сферические/плеоморфные вирусы с ДНК-геномом. Специфической особенностью всех представителей *Herpesviridae* является способность к устойчивому латентному состоянию с периодами реактивации под действием предрасполагающих факторов, к которым относится иммуносупрессивное состояние, как естественной, так и ятрогенной природы, вызванное в результате внутренней (лихорадка, стресс, менструация) или внешней стимуляции (ультрафиолетовое излучение, травма). На основе типов клеток, содержащих латентный вирус, а также на базе секвенирования вирусного генома *Herpesviridae* разделяются на 3 субсемейства: *Alpha-*, *Beta-* и *Gammaherpesvirinae*. Представитель *Betaherpesvirinae* — цитомегаловирус (*Cytomegalovirus*) — широко распространен в мире, с неравной частотой встречаемо-

Авторы:

Падалко Е.Ю., руководитель лаборатории клинической биологии и руководитель лаборатории клинической вирусологии и молекулярной диагностики, Госпиталь Университета г. Гента, профессор вирусологии факультета медицины и биомедицинской науки, Университет Хасалта, Бельгия.

Адрес для переписки:

Падалко Елизавета Юрьевна
Госпиталь Университета г. Гента, Бельгия.
Тел.: +32 9 332-21-08. Факс: +32 9 332-49-85.
E-mail: okubar@list.ru

поступила в редакцию 21.05.2013
принята к печати 28.05.2013

© Падалко Е.Ю., 2013

сти в разных географических регионах. Кроме географических различий, на повышенную распространенность CMV также оказывают влияние плохие социально-экономические условия проживания людей. Передача инфекции может происходить через любую биологическую жидкость и секреты, наиболее высокая вирусная нагрузка определяется в моче и слюне. Особенностью клинической картины CMV-инфекции у иммунокомпетентных лиц является фактическое отсутствие симптоматики. Клинически CMV-инфекция проявляется у пациентов с ятрогенно обусловленными иммунодефицитами вследствие пересадки органов или у иммунологически незрелого хозяина, к которым относится плод. При этом клинические проявления CMV-инфекции различаются у вышеперечисленных иммунонекомпетентных категорий. У реципиентов с пересадкой паренхиматозных органов наиболее характерны такие клинические проявления инфекции, как лихорадка и гепатит, тогда как у реципиентов гемопоэтических стволовых клеток на первый план в клинической картине выступают желудочно-кишечные симптомы и развитие пневмонии. У больных СПИДом, в качестве клинических признаков CMV-инфекции, как правило, встречается ретинит, а у внутриутробно зараженных новорожденных наиболее часто имеют место энцефалопатия и глухота, особенно как отдаленные проявления болезни.

Уделяя особое внимание реципиентам с пересаженными паренхиматозными органами важно отметить, что CMV-инфекция является в данном случае наиболее серьезным инфекционным осложнением и также служит основной причиной летальности у данной категории пациентов. Такая же ситуация свойственна для реципиентов гемопоэтических стволовых клеток. Установлено, что CMV-инфекция ассоциирована как с острым, так и с отдаленным отторжением пересаженных органов, а также с бактериальными и грибковыми суперинфекциями. Кроме того, на фоне CMV-инфекций, развивающихся после пересадки органов, была зарегистрирована интенсификация развития инфекционного процесса гепатита С и увеличение частоты встречаемости EBV-ассоциированных лимфопролиферативных нарушений [12]. Патогенетически природа CMV-инфекции у реципиентов после пересадки органа может быть результатом проявления как первичной, так и вторичной инфекции. Если аллогraft от CMV-серопозитивного донора будет пересажен CMV-серонегативному реципиенту, то при условии отсутствия медикаментозного сопровождения более чем у 90% подобных реципиентов будет иметь место CMV-заболевание. При реактивации эндогенного латентного цитомегаловируса

вероятность заболевания реципиентов составит около 15%, а при суперинфекции (и донор, и реципиент CMV-серопозитивны, реактивация вируса донора), инфекция наблюдается приблизительно у 25% реципиентов. Наиболее характерным периодом развития инфекции является первое полугодие после трансплантации органа, особенно часто заболевание возникает в период от одного до трех/четырёх месяцев после пересадки [3]. Последние годы CMV-инфекция наблюдается позднее классических первых ста посттрансплантатных дней и сопровождается более атипичной клиникой, что, безусловно, осложняет диагностику заболевания, тем более, что в этот период пациент уже не находится под наблюдением в медицинском центре, где ему была сделана пересадка [8, 11]. Динамический контроль вирусной нагрузки в начале и на пике реактивации CMV показывает корреляцию выраженности последней с клиническими проявлениями CMV-инфекции как у реципиентов плотных органов, так и у реципиентов гемопоэтических стволовых клеток. Риск заболевания CMV-инфекцией резко повышается при вирусной нагрузке в крови $> 5 \log$ копий/мл. Это явление известно как «концепция порога» CMV-инфекции, когда малейшее повышение вирусной нагрузки соответствует быстрому росту вероятности заболевания [5]. Проведение серологического исследования на наличие антител к CMV целесообразно в период, предшествующий трансплантации, как у донора, так и у реципиента. Даже на этом этапе, для которого не характерно резкое снижение иммунитета, следует рекомендовать использование только высокоспецифичных тестов для исследования на CMV IgG- и CMV IgM-антитела. Результаты серологического исследования IgG-антител против CMV могут находиться под влиянием сопутствующей гипогаммаглобулинемии, переливания крови или плазмафереза, так что важно производить забор образцов на серологическое исследование до начала этих медицинских вмешательств. Если серологическое исследование на CMV IgG дает сомнительный результат, то в отношении донора следует этот результат рассматривать как положительный, а в отношении реципиента — как отрицательный. При такой трактовке результатов реципиент будет определен в наивысшую группу риска. Определение CMV IgM, так и CMV IgG не имеет диагностического значения минимум в течение 6 месяцев после проведенной трансплантации, поскольку данный период не является показателем активного процесса заболевания. Позднее, сероконверсия CMV IgG для определенной категории пациентов с риском отдаленной CMV-инфекции может считаться информативной, но только при

условии, что прошло не менее полугода от момента трансплантации [7, 15, 17]. Использование клеточных культур в лабораторной диагностике в целом утрачивает свои позиции. В той же мере это справедливо в отношении диагностики активной CMV у лиц с иммунодефицитом. Цитомегаловирус является вирусом с медленным проявлением цитопатогенного эффекта, что не позволяет исключить отсутствие вируса в течение длительного времени (до 4-х недель). Из разработанных различных методик ускоренного получения результатов вирусных культур, возможно, самой широко используемой является техника «shell-vial», которая позволяет завершить исследование через 72–96 ч [10]. Данная ускоренная методика наиболее эффективна в условиях применения на образцах с потенциально гипервысокой вирусной нагрузкой, таких как моча или слюна, тогда как для мониторинга риска развития CMV заболевания, наиболее информативным образцом является кровь. Поскольку количественный, а не только качественный показатель важен для мониторинга больных с иммунодефицитом, еще в недавнем прошлом широкое применение для выявления антигена имели иммунофлуоресцентные методы определения вирусного антигена pp65 в белых клетках крови. Субъективный характер этого исследования, отсутствие стандартизации, необходимость забора большого объема крови, зависимость качества исследования от выраженной лейкопении, необходимость быстрого проведения тестирования ввиду нестабильности нейтрофилов наряду с большими затратами времени и интенсивной нагрузкой лаборанта, привело в последние десятилетия к изменению подходов лабораторной диагностики в пользу использования количественной полимеразой цепной реакции — ПЦР [1, 4]. ПЦР представляет собой методику с улучшенной чувствительностью без утраты специфичности по сравнению с вышеперечисленными методами, но и введение этой методики не лишено проблем, таких как необходимость закупки дорогостоящего оборудования и подготовка высококвалифицированного персонала. Кроме того, широкое применение «home-brew» дизайна ПЦР-методов, неизбежно приводит к вариабельности используемых протоколов, что, в свою очередь, не дает возможности сравнивать результаты исследований, полученных в различных диагностических центрах [6, 14, 16, 18]. В последнее время, на основе введения и публикации междуна-

родного NSSLs стандарта, был сделан важный научный шаг на пути гармонизации методов, обеспечивающий возможность конвертирования результатов исследования в международные единицы.

Наличие высокой вирусной нагрузки является независимым фактором риска для развития CMV-инфекции [13]. Количественная ПЦР особенно необходима как тест индикатор для одного из новейших подходов к ведению пациентов после пересадки органов, заключающегося в реализации превентивной терапевтической стратегии. Превентивная стратегия, в свою очередь, основана на высококорректной методике, позволяющей выявить пациентов с риском развития CMV-инфекции. Наряду с использованием на этапе ведения больных с целью назначения превентивной терапии, количественная ПЦР может быть применена для быстрой и надежной диагностики уже состоявшейся CMV-инфекции, мониторинга ответа на противовирусную терапию, прогноза вирусологического и клинического рецидива, а также может служить индикатором факта развития резистентности к противовирусным препаратам [12]. Современные рекомендации по проведению количественной ПЦР еженедельно в течение 3 месяцев после трансплантации в качестве теста индикатора для назначения превентивной терапии CMV-инфекции, базируются на использовании крови как идеального образца для тестирования. При этом в группах риска увеличение частоты проведения исследования до двух раз в неделю является оправданным. Важно учитывать вариабельность методики в сфере определения существенных изменений вирусной нагрузки. Так повышение вирусной нагрузки меньше чем на 0,5 log₁₀ в большинстве случаев не является клинически значимой. Точка отсчета для начала превентивного лечения варьирует в зависимости от особенностей контингента пациентов, а также от характера проведенной трансплантации [2, 7]. Стандартизация в определении старта для начала превентивного лечения является одной из основных задач современной трансплантологии.

В заключение следует отметить, что современная лабораторная диагностика CMV-инфекции у иммунокомпрометированных пациентов требует грамотной трактовки результатов тестов, произведенных на дорогостоящем оборудовании, однако основой успешного ведения таких пациентов является постоянный профессиональный контакт между клиницистом и врачом-лаборантом.

Список литературы

См. в References (с. 216). See References at p. 216.

MODERN LABORATORY APPROACHES IN THE DIAGNOSIS OF CMV INFECTION IN IMMUNOCOMPROMISED PATIENTS

Padalko E.Iu.

Ghent University Hospital, Ghent, Belgium

Abstract. High susceptibility of immunocompromised human to infection (especially transplant recipients) is influenced by poor ability to combat it due to impaired cell-mediated immunity plus high vulnerability to perturbations in the environment. Special considerations regarding infection in transplant recipients and particular approaches in laboratory diagnostics are based on profound analysis of the nature of viral infection in this population. In this article the modern knowledge about viral infections and laboratory diagnostic methods, particularly regarding CMV infection, in immunocompromised patients are discussed.

Key words: *immunocompromised patients, viral infection, cytomegalovirus (CMV), laboratory diagnostics.*

Authors:

Padalko E.Yu. ✉, PhD, Chief, Laboratory of Clinical Virology, Ghent University Hospital; Professor of Virology, Hasselt University, Belgium. Belgium, Ghent, Ghent University Hospital.
 Phone: +32 9 332–21-08. Fax: +32 9 332–49-85. E-mail: okubar@list.ru.

References

- Baldanti F., Lilleri D., Gerna G. Human cytomegalovirus load measurement and its applications for pre-emptive therapy in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Hematol. Oncol.*, 2008, vol. 26 (3), pp. 123–130.
- Boeckh M., Ljungman P. How we treat cytomegalovirus in hematopoietic cell transplant recipients. *Blood.*, 2009, vol. 113 (23), pp. 5711–5719.
- Fishman J.A., Rubin R.H. Infection in organ-transplant recipients. *N. Engl. J. Med.*, 1998, vol. 338 (24), pp. 1741–1751.
- Gerna G., Baldanti F., Lilleri D., Parea M., Torsellini M., Castiglioni B., Vitulo P., Pellegrini C., Viganò M., Grossi P., Revello M.G. Human cytomegalovirus pp67 mRNAemia versus pp65 antigenemia for guiding preemptive therapy in heart and lung transplant recipients: a prospective, randomized, controlled, open-label trial. *Transplantation*, 2003, vol. 15;75 (7), pp. 1012–1019.
- Griffiths P., Whitley R., Snyderman D.R., Singh N., Boeckh M.; International Herpes Management Forum. Contemporary management of cytomegalovirus infection in transplant recipients: guidelines from an IHMF workshop, 2007. *Herpes*, 2008, vol. 15 (1), pp. 4–12.
- Koidl C., Bozic M., Marth E., Kessler H.H. Detection of CMV DNA: is EDTA whole blood superior to EDTA plasma? *J. Virol. Methods*, 2008, vol. 154 (1–2), pp. 210–212.
- Kotton C.N., Kumar D., Caliendo A.M., Asberg A., Chou S., Snyderman D.R., Allen U., Humar A.; Transplantation Society International CMV Consensus Group. International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplantation*, 2010, vol. 89 (7), pp. 779–795.
- Limaye A.P., Corey L., Koelle D.M., Davis C.L., Boeckh M. Emergence of ganciclovir-resistant cytomegalovirus disease among recipients of solid-organ transplants. *Lancet*, 2000, vol. 356 (9230), pp. 645–649.
- Linden P.K. Approach to the immunocompromised host with infection in the intensive care unit. *Infect. Dis. Clin. North Am.*, 2009, vol. 23 (3), pp. 535–556.
- Mañez R., St George K., Linden P., Martin M., Kusne S., Grossi P., Ho M., Rinaldo C. Diagnosis of cytomegalovirus infections by shell vial assay and conventional cell culture during antiviral prophylaxis. *J. Clin. Microbiol.*, 1994, vol. 32 (11), pp. 2655–2659.
- Paya C., Humar A., Dominguez E., Washburn K., Blumberg E., Alexander B., Freeman R., Heaton N., Pescovitz M.D.; Valganciclovir Solid Organ Transplant Study Group. Efficacy and safety of valganciclovir vs. oral ganciclovir for prevention of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Am. J. Transplant.*, 2004, vol. 4 (4), pp. 611–620.
- Razonable R.R., Emery V.C.; 11th Annual Meeting of the IHMF [International Herpes Management Forum]. Management of CMV infection and disease in transplant patients. 27–29 February 2004. *Herpes*, 2004, vol. 11 (3), pp. 77–86.
- Razonable R.R. Epidemiology of cytomegalovirus disease in solid organ and hematopoietic stem cell transplant recipients. *Am. J. Health Syst. Pharm.*, 2005, vol. 15;62 (8 suppl. 1), pp. S7–13.
- Riise G.C., Andersson R., Bergström T., Lundmark A., Nilsson F.N., Olofsson S. Quantification of cytomegalovirus DNA in BAL fluid: a longitudinal study in lung transplant recipients. *Chest*, 2000, vol. 118 (6), pp. 1653–1660.
- Seed C.R., Piscitelli L.M., Maine G.T., Lazzarotto T., Doherty K., Stricker R., Stricker R., Iriarte B., Patel C. Validation of an automated immunoglobulin G-only cytomegalovirus (CMV) antibody screening assay and an assessment of the risk of transfusion transmitted CMV from seronegative blood. *Transfusion*, 2009, vol. 49 (1), pp. 134–145.
- Tang W., Elmore S.H., Fan H., Thorne L.B., Gulley M.L. Cytomegalovirus DNA measurement in blood and plasma using Roche LightCycler CMV quantification reagents. *Diagn. Mol. Pathol.*, 2008, vol. 17 (3), pp. 166–173.
- Weber B., Fall E.M., Berger A., Doerr H.W. Screening of blood donors for human cytomegalovirus [HCMV] IgG antibody with an enzyme immunoassay using recombinant antigens. *J. Clin. Virol.*, 1999, vol. 14 (3), pp. 173–181.
- Westall G.P., Michaelides A., Williams T.J., Snell G.I., Kotsimbos T.C. Human cytomegalovirus load in plasma and bronchoalveolar lavage fluid: a longitudinal study of lung transplant recipients. *J. Infect. Dis.*, 2004, vol. 190 (6), pp. 1076–1083.