

Сотников Илья Александрович

**КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНОЕ ЗНАЧЕНИЕ АКТИВНОЙ ФОРМЫ
ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ С СОМАТИЧЕСКОЙ
ПАТОЛОГИЕЙ**

14.01.09 – Инфекционные болезни

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва - 2017 г.

Работа выполнена на кафедре инфекционных болезней у детей педиатрического факультета ФГБОУ ВО "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:

академик РАН,
доктор медицинских наук, профессор

Учайкин Василий Федорович

Официальные оппоненты:

Чешик Святослав Георгиевич - доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник клинического отдела ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Боковой Александр Григорьевич - доктор медицинских наук, профессор, кафедры клинической подготовки факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова».

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства».

Защита диссертации состоится «__» _____ 2017 г в __ часов на заседании Диссертационного Совета Д 208.114.01 в Федеральном бюджетном учреждении науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора (111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, 3а).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора и на сайте: www.crie.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
член-корреспондент РАН,
доктор медицинских наук,
профессор

Горелов Александр Васильевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В последнее время придается большое значение изучению герпесвирусных инфекций. В детской практике особое место занимает цитомегаловирус (ЦМВ). По данным авторов инфицированность детей ЦМВ повысилась на 30,3%, а среди новорожденных она возросла в 2,1 раза (Каражас Н.В., 2002; Долгих Т.И., 2004). В 5 раз увеличилось число случаев внутриутробного заражения. Среди госпитализированных пациентов с внутриутробным механизмом передачи инфекции, преобладают дети первого года жизни, страдающие ЦМВИ (Орджоникидзе Н.В., 2002; Никонов А.П., 2007). Врожденная цитомегаловирусная инфекция является ведущей причиной нейросенсорной тугоухости, клинически проявляющей себя у 30-65% детей при рождении, а в 7-15% случаев протекающей бессимптомно (Fowler К.В., 2006; Cheeran М.С., 2009). ЦМВ продолжает оставаться основной причиной развития осложнений после трансплантации гемопоэтических клеток (Konoplev S., 2001; Ljungman P., 2008) и частой причиной развития тяжелых пневмоний у ВИЧ инфицированных больных (Toshiki T., Toshio S., 2015).

До настоящего времени остается малоизученной роль цитомегаловируса (ЦМВ) в формировании соматической патологии у детей.

В литературе имеются отдельные работы, посвященные изучению ЦМВИ у детей с атеросклерозом, бронхиальной астмой, хроническим гломерулонефритом, сахарным диабетом (Goedhals D., 2008; Howard J., 2009; Каблукова Н.П., 2010). Однако, в них отражены лишь факты обнаружения вируса, не описаны формы инфекционного процесса и их клинические проявления, а также данные о влиянии ЦМВИ на тяжесть заболевания, нет сведений об особенностях клинической картины соматических заболеваний у детей с маркерами активной репликации вируса.

Исходя из вышеизложенного, на сегодняшний день проблема идентификации ЦМВ, а также его влияния на формирование соматической патологии у детей является одной из актуальных и мало изученных.

Степень разработанности темы исследования

На сегодняшний день ЦМВ – инфекция остается одной из наиболее актуальных герпетических инфекций. Высокая восприимчивость беременных, новорожденных, больных перенесших аллогенные трансплантации, ВИЧ инфицированных и лиц с различными иммунодефицитными состояниями, а также способность ЦМВ в ряде случаев наносить тяжелый, а порой непоправимый вред здоровью ставит перед нами задачу более глубокого изучения данной патологии (Gaytant M.A., 2003; Дементьева Д.М., 2010; Кочкина С.С., 2016).

В условиях иммунодефицитного состояния ЦМВ может поражать практически все клетки и ткани организма (Балмасова И.П, 2016; Simpson J.D., 2016), но при этом не имеет специфических клинических симптомов. Этот факт ставит перед нами задачу по выявлению четких клинических критериев ЦМВИ у детей с соматическими заболеваниями.

Обнаружение ЦМВ в различных биологических средах не всегда говорит о развитии ЦМВ болезни, поскольку вирус может находиться в латентном состоянии. В связи с этим представляется важным доказать не только наличие вируса, но и его активной формы. В литературе имеются работы по применению ЦМВ pp65 антигенемия у детей с ВИЧ инфекцией (Toshio S., 2015) и аллогенными трансплантатами (Ljungman P., 2008). Однако работы по использованию данной методики у детей с соматическими заболеваниями не многочисленны и носят обобщенный характер.

До настоящего времени мало значения предавалось определению ЦМВ у детей с соматической патологией, доказательству его активной репликации, а также оценке его влияния на развитие тяжелой формы заболевания.

В связи с вышеизложенным, проведение исследования, касающегося изучения роли ЦМВ в формировании соматической патологии у детей является весьма актуальным.

Цель исследования

Оценить влияние активной персистенции ЦМВ на характер клинических проявлений и тяжесть состояния у детей с различной соматической патологией.

Задачи исследования

1. Выявить частоту встречаемости активной формы ЦМВИ у детей с соматической патологией.
2. Дать характеристику клинических особенностей течения соматических заболеваний у детей с маркерами активной ЦМВИ.
3. Оценить прогностическую ценность выявления антигена ЦМВ pp65 в лейкоцитах периферической крови у детей с соматической патологией.

Научная новизна

Проведен детальный анализ частоты встречаемости ЦМВИ у детей с заболеваниями респираторного тракта, цитопениями, воспалительными заболеваниями ЦНС и ЛОР органов.

Показаны особенности клинического течения соматических заболеваний у детей на фоне активной ЦМВИ.

Выявлены закономерности между величиной вирусной нагрузки ДНК ЦМВ и характером клинических проявлений у детей с различной соматической патологией.

Доказана связь между наличием структурного белка ЦМВ pp65 в лейкоцитах периферической крови и формированием тяжелых форм и осложненного течения заболевания, а также развитием гнойно-воспалительных осложнений у детей с соматической патологией.

Обоснована необходимость использования комплексного подхода для диагностики ЦМВИ, включающего в себя определение уровня антител к ЦМВ, количественного определения ДНК ЦМВ в слюне, моче, крови, а также выявление структурного белка ЦМВ pp65 в лейкоцитах периферической крови.

Полученные в ходе исследования данные расширяют представления о особенностях течения соматической патологии у детей на фоне активной ЦМВИ.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Выявлены особенности клинического течения заболеваний респираторного тракта, ЦНС и ЛОР органов у детей с активной формой ЦМВИ.

Показано, что активная ЦМВИ у детей способствует развитию тяжелых форм и осложненного течения заболеваний респираторного тракта, ЦНС, ЛОР органов.

У детей с тяжелой формой и осложненным течением различных гнойно-воспалительных заболеваний необходимо проводить обследование с целью выявления структурного белка ЦМВ pp65 в лейкоцитах периферической крови.

Необходимо использовать несколько методов лабораторной диагностики для подтверждения активной формы ЦМВИ, в частности: определение уровня антител класса IgM к ЦМВ, количественного определения ДНК ЦМВ в слюне, моче, крови, а также антигена полной сборки ЦМВ структурного белка pp65 в лейкоцитах периферической крови. С целью выявления не только самого патогена в различных биологических средах, но и определения формы ЦМВИ.

Методология и методы исследования

Методологической основой для диссертационной работы послужили труды отечественных и зарубежных авторов по теме исследования. Дизайн клинического исследования представляет собой сравнительный анализ с использованием клинических, лабораторных и статистических методов исследования. Полученные данные систематизированы, изложены в главах собственных исследований. Сформулированы выводы, практические рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы.

Положения, выносимые на защиту

1. У детей с различной соматической патологией ЦМВИ встречается в 47,6% (71 из 149), на долю активной формы ЦМВИ приходится у 80,3% (57 из 71).
2. Основными особенностями течения соматических заболеваний у детей с маркерами активной ЦМВИ являются: длительный фебрилитет, затяжное течение заболевания, высокий процент осложнений.
3. Основными осложнениями у детей с маркерами активной ЦМВИ являются: при заболеваниях нижних отделов респираторного тракта -

полисегментарная пневмония, при воспалительных заболеваниях ЛОР органов - рецидивирующий средний гнойный отит, при воспалительных заболеваниях ЦНС – судорожный синдром.

4. Большое значение при диагностике активной формы ЦМВИ имеет обнаружение в лейкоцитах периферической крови структурного белка ЦМВ pp65. Его наличие является прогностически неблагоприятным фактором, поскольку чаще встречается при тяжелой форме болезни и осложненном течении заболевания.

Степень достоверности и апробация результатов

Научные положения и практические рекомендации, сформулированные автором в диссертации, основаны на изучении достаточного объема клинического материала. В работе использованы современные методы исследования, полностью соответствующие поставленным задачам. Выводы аргументированы и вытекают из проведенных автором исследований. Результаты диссертации внедрены в практику работы ГБУЗ Морозовская детская городская клиническая больница Департамента здравоохранения города Москвы и ФГБУ «Российская детская клиническая больница» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Основные положения работы используются при проведении занятий и чтении лекций студентам на кафедре детских инфекционных болезней педиатрического факультета ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, а также включены в методические пособия для студентов, интернов, ординаторов и врачей.

Материалы диссертации были доложены: на X Всероссийском Конгрессе детских инфекционистов, 2011 г.; на XI Всероссийском Конгрессе «Педиатрия и инфекция», 2012 г.; на XII Конгрессе «Педиатрия и инфекция», 2013 г.; на XIII Конгрессе детских инфекционистов России, 2014 г.; на совместной научно-практической конференции сотрудников кафедры инфекционных болезней у детей педиатрического факультета ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России и врачей ГБУЗ Морозовская детская городская клиническая больница Департамента здравоохранения города Москвы (Москва, 2014г.); на заседании

инфекционной секции Московского отделения Союза педиатров России, 2015 г; на XIV Конгрессе детских инфекционистов России, 2015 г.; на XV Конгрессе детских инфекционистов России, 2016 г.

По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, из них 4 – в ведущих рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ для освещения основных научных результатов диссертационных исследований.

Личный вклад автора в разработку темы

Участие автора в получении результатов, изложенных в диссертации, осуществлялось на всех этапах работы и включало: сбор, систематизацию и анализ полученного материала, ведение больных, непосредственное проведение большинства диагностических (в том числе исследование образцов крови методом ЦМВ pp65 антигенемии) и клинических исследований, обработку данных с использованием статистических программ.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 4 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, включающего 63 отечественных и 163 зарубежных источников. Диссертация изложена на 137 страницах машинописного текста, содержит 5 выписок из историй болезни, 22 таблицы, 31 рисунок.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Общая характеристика больных и методов исследования

Клинико-лабораторное обследование выполнено у 149 детей в возрасте от 6 мес. до 14 лет, находившихся на обследовании и лечении в боксированных отделениях ГБУЗ «Морозовская детская городская клиническая больница Департамента здравоохранения города Москвы» (главный врач д. м. н., профессор И. Е. Колтунов) в период с 2013 по 2016 год.

Обследованные дети были разделены на 2 группы. Основную группу (группа I) составили дети (n=71) в возрасте от 6 мес. до 14 лет с маркерами ЦМВ. В группу сравнения (группа II) были включены дети (n=78) в возрасте от 6 мес. до 14 лет без маркеров ЦМВ.

Методы исследования.

Обследование детей, носило комплексный характер и включало в себя: клинический осмотр, лабораторные (клинические анализы крови и мочи, биохимические анализы крови), вирусологические, бактериологические, серологические и инструментальные методы исследования (УЗИ органов брюшной полости).

В качестве клинических образцов для идентификации ЦМВ исследовали кровь, мочу и слюну. Цельную кровь центрифугировали в течение 10 мин при 1000 об./мин. Затем стерильно отбирали фракцию лейкоцитов, расположенную над эритроцитами. Фракцию лейкоцитов использовали в дальнейшем для проведения ЦМВ pp65 - антигенемии. Сыворотку крови использовали для определения антител IgM и IgG к ЦМВ методом ИФА. Мочу центрифугировали в тех же условиях. Слюна не подвергалась дополнительной обработке. Кровь, осадок мочи и слюну использовали для выявления ДНК ЦМВ методом Real-time ПЦР.

ЦМВ pp65 - антигенемия

Определение белка тегумента вириона pp65 методом ЦМВ pp65 – антигенемии в лаборатории НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского (зав. профессор Куц А.А.). Идентификация белка pp65 осуществлялась в лейкоцитах периферической крови, полученных путем центрифугирования в течение 10 мин. при 1500 об./мин. С последующим непрямым пероксидазным окрашиванием с использованием моноклональных антител к белку pp65.

Полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР real-time)

ДНК ЦМВ определяли в цельной крови, моче и слюне в лаборатории НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского (зав. профессор Куц А.А.). Выделение и амплификацию ДНК проводили с помощью наборов фирмы «Интерлабсервис», Россия. Для выделения ДНК использовали набор реагентов «ДНК-сорб-В» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). ПЦР с детекцией в режиме реального времени проводили с помощью набора «АмплиСенс® EBV/CMV/HHV6-скрин-FL» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Детекцию продуктов ПЦР - амплификации в

количественном варианте осуществляли при помощи прибора «iQicycler» (Bio-Rad, США), согласно рекомендации производителя тест-систем.

Иммуноферментный анализ (ИФА)

Определение серологических маркеров ЦМВ методом ИФА осуществлялось в лаборатории МДГКБ. АТ к ЦМВ и к ВЭБ классов IgM и IgG, а также АТ класса IgG к ВГЧ-6 определяли методом ИФА в плазме крови с использованием тест-систем «ВектоЦМВ-IgM», «ВектоЦМВ-IgG», «ВектоВЭБ-VCA-IgM», «ВектоВЭБ-NA-IgG» и «ВектоHHV-6-IgG» («Вектор-Бест», Россия).

Статистические методы анализа

Статистическую обработку результатов экспериментов осуществляли на номинальном уровне значимости $\alpha=0,05$ с использованием программ «Statistica» v.13.2 и MS Excel. Для сравнения вирусной нагрузки ДНК ЦМВ в биологических материалах (крови, моче и слюне) применялся непараметрический аналог однофакторного дисперсионного анализа – критерий Краскела – Уоллиса (Холлендер М.,1999), а также двухфакторный дисперсионный анализ с оценкой взаимодействия факторов (GLM – Two-way ANOVA). Однородность дисперсий проверяли тестом Левена (Levene H.,1960). Для описания таблиц использован критерий Хи-квадрат (χ^2) и Z-критерий равенства долей. Гипотезу равномерности заполнения таблицы сопряженности тестировали тестом отношения правдоподобия (Likelihood Ratio chi-square (G-test)). Вероятность групповой ошибки первого рода контролировали процедурой Беньямини – Йекутили (Benjamini Y.,2001).

Результаты собственных исследований и их обсуждение.

Частота встречаемости активной формы ЦМВИ у детей с соматической патологией.

Наши исследования показали широкую распространенность ЦМВИ у детей с соматической патологией - 47,6% случаев (71 из 149). У 27 из 71 (38%) ребенка с маркерами ЦМВИ была выявлена только ДНК ЦМВ, у 29 (40,9%) обнаружены anti-CMV IgM и anti-CMV IgG, у 15 (21,1%) - сочетание anti-CMV IgM, anti-CMV IgG и

ДНК ЦМВ. На основании маркерных профилей у обследованных детей были выделены различные формы ЦМВИ. Данные представлены в таблице 1.

Таблица 1. Формы ЦМВИ у обследованных детей (n=71)

Формы инфекции	Маркеры (АТ и/или ДНК)	ЦМВИ, n=71	
		Абс.	%
Активная	АТ класса IgM+	15	21,1
	ДНК вируса		
	ДНК вируса	27	38
Суммарно		42	59,1
Реактивация	АТ класса IgM+IgG и/или АТ класса IgG+	15	21,1
	ДНК вируса		
Латенция	Только АТ класса IgG	14	19,7

Активная ЦМВИ, подтвержденная обнаружением anti-CMV IgM методом ИФА и/или ДНК ЦМВ, была выявлена в 59,1% (42 из 71) случаев. На реактивацию, подтвержденную обнаружением anti-CMV IgM в сочетании с anti-CMV IgG методом ИФА и/или anti-CMV IgG в комбинации с ДНК ЦМВ, приходилось 21,1% (15 из 71). На долю детей с латентной формой ЦМВИ, подтвержденной обнаружением только anti-CMV IgG методом ИФА приходилось 19,7% (14 из 71). В общей сложности среди инфицированных ЦМВ детей с различными соматическими заболеваниями на долю маркеров активно текущей ЦМВИ пришлось 80,3% случаев (57 из 71). Данное наблюдение позволяет судить об активном участии ЦМВ в формировании патологического процесса у детей с соматической патологией.

Самым частым маркером активной репликации ЦМВ было обнаружение ДНК вируса в крови, моче и слюне методом Real-time ПЦР (59,1%). Вирусная нагрузка и частота выявления ДНК ЦМВ в биологических материалах обследованных детей представлена в таблице 2.

Таблица 2. Вирусная нагрузка и частота выявления ДНК ЦМВ в биологических материалах обследованных детей (n=213)

Клинические образцы	ДНК ЦМВ		
	Абс.	%	log ₁₀ копий/мл
Кровь, n=71	19	26,8	3,1±0,6*
Моча, n=71	25	35,2	3,6±0,9
Слюна, n=71	28	39,4	4±1,3*
Суммарное количество образцов, n=213	72	33,8	3,6±1

**результаты тестирования по Краскелу – Уоллису выявили статистически значимые на 5%-ном уровне различия в дисперсионном комплексе ($\chi^2=6,68$, p -value=0.04). Статистически значимые различия при post hoc тестировании выявлены в вирусной нагрузке кровь vs. слюна (DSCF p -value=0.04)*

ДНК ЦМВ выявлялась значительно чаще в слюне 39,4% (28 из 71) и моче 35,2% (25 из 71) по сравнению с кровью 26,8% (19 из 71). Самая высокая вирусная нагрузка ДНК ЦМВ (4±1,3 log₁₀ копий/мл) также определялась в слюне, по сравнению с мочой и кровью (3,6±0,9 и 3,1±0,6 log₁₀ копий/мл соответственно) ($\chi^2=6,68$, p -value=0.04). Суммарный уровень вирусной нагрузки во всех средах составил 3,6±1 log₁₀ копий/мл, что соответствует 4000-5000 коп/мл.

Нами была проанализирована величина вирусной нагрузки ДНК ЦМВ в крови, слюне и моче у обследованных детей в зависимости от клинического диагноза. Вирусная нагрузка ДНК ЦМВ у детей с различными соматическими заболеваниями представлена в таблице 3.

Таблица 3. Вирусная нагрузка ДНК ЦМВ у детей с различными соматическими заболеваниями (n=42)

Клинический диагноз у детей, n=42	Количество ДНК ЦМВ, log ₁₀ копий/мл			
	Суммарная вирусная нагрузка (для каждой группы)	Кровь	Моча	Слюна
Острый тонзиллит, n=7	3,3±0,34	3,1±0,48	3,2±1,25	3,8±0,46*
Заболевания нижних отделов респираторного тракта, n=14	3,5±0,37*	3,3±0,61	3,3±0,83	4±0,56
Поражение ЦНС, n=6	2,8±0,27	2,6	3,1±0,58	2,7±0,2
Поражение ЛОР органов, n=8	3,6±0,66	3±0,25	3,7±1,4	4,1±0,98*
Заболевания крови, n=7	4,2±0,92*	3,1±0,97	4,6±1,77	5±1,52*
Суммарная вирусная нагрузка, n=42	3,5±0,66	3±0,26	3,9±0,77	3,6±0,61

* - статистически значимые различия выявлены между исследуемыми группами, как по суммарной вирусной нагрузке, так и по отдельным биологическим материалам (кровь, слюна моча), $p < 0,05$.

Как видно из данных таблицы, наиболее высокие значения вирусной нагрузки отмечались у детей с заболеваниями крови - $4,2 \pm 0,92 \log_{10}$ копий/мл, а минимальные у детей с поражением ЦНС - $2,8 \pm 0,27 \log_{10}$ копий/мл. У детей с заболеваниями респираторного тракта она составила $3,5 \pm 0,37 \log_{10}$ копий/мл, поражением ЛОР органов - $3,6 \pm 0,66 \log_{10}$ копий/мл и острым тонзиллитом - $3,3 \pm 0,34 \log_{10}$ копий/мл. Результаты статистического анализа подтверждают статистически значимые различия между исследуемыми группами, как по суммарной вирусной нагрузке ($p=0,0009$), так и по отдельным биологическим материалам (кровь, слюна моча) ($p=0,0005$). Следует отметить, что во всех группах вирусная нагрузка была выше в слюне, особенно в группе детей с заболеваниями крови и патологией ЛОР-органов - $5 \pm 1,52$ и $4,1 \pm 0,98 \log_{10}$ копий/мл соответственно.

Клинические особенности течения соматических заболеваний у детей на фоне активной ЦМВИ.

Для удобства обработки данных, обследованные дети были распределены по группам в зависимости от ведущего клинического синдрома и топики поражения. Данные представлены в таблице 4.

Таблица 4. Распределение детей в зависимости от ведущего клинического синдрома и топики поражения (n=149)

Группа	Количество больных	
	Всего (n=149)	
	Абс.	%
Заболевания нижних отделов респираторного тракта	44	29,6
Острый тонзиллит	44	29,6
Поражение ЦНС	21	14,1
Поражение ЛОР органов	20	13,4
Заболевания крови	20	13,4
Всего	149	100

У 44 (29,6%) – заболевания нижних отделов респираторного тракта; у 44 (29,6%) детей был диагностирован острый тонзиллит; у 21 (14,1%) - поражение ЦНС; у 20 (13,4%) - поражение ЛОР-органов и у 20 (13,4%) – заболевания крови.

Распределение обследованных детей в зависимости от наличия или отсутствия маркеров ЦМВИ представлено на рисунке 1.

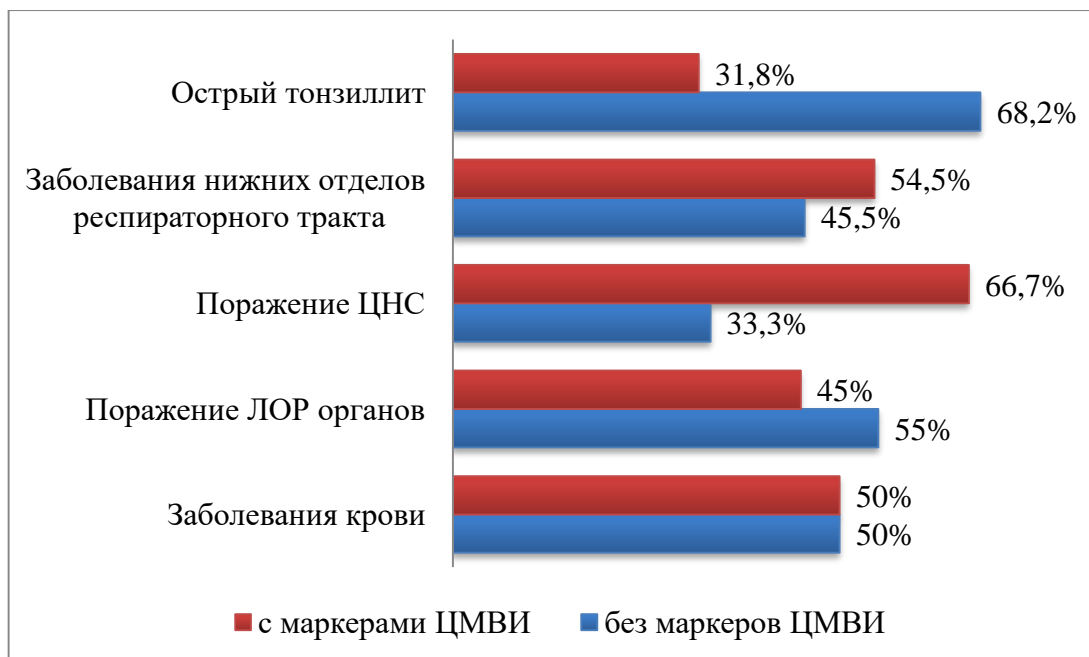


Рисунок 1. Обнаружение маркеров ЦМВИ у обследованных детей (n=149)

Как видно из представленной диаграммы. Наиболее часто маркеры ЦМВИ были обнаружены в группе детей с поражением ЦНС (66,7%) и заболеваниями нижних отделов респираторного тракта (54,5%). У детей с поражением ЛОР органов и заболеваниями крови они встречались в практически равных долях (45% и 50% соответственно). Формы ЦМВИ у обследованных детей представлены на рисунке 2.



Рисунок 2. Формы ЦМВИ у обследованных детей (n=149)

Активная форма ЦМВИ чаще выявлялась у детей с поражением ЛОР органов (77,8%). Определялась практически в равных долях у детей с поражениями ЦНС, заболеваниями крови и заболеваниями нижних отделов респираторного тракта (64,3%, 60% и 58,4% соответственно).

Дети с острым тонзиллитом.

Нами были изучены клинические особенности течения острого тонзиллита у 40 детей, в зависимости от наличия или отсутствия маркеров ЦМВИ. Четверо детей с латентной ЦМВИ были исключены из исследования. У 10 детей с маркерами активной ЦМВИ диагностирован инфекционный мононуклеоз. Установлены следующие клинические особенности течения острого тонзиллита у детей на фоне активно текущей ЦМВИ: в 70% случаев заболевание протекало с высокой лихорадкой до 39,0°C и выше ($p.adjust=0.02$, мощность=0,81); длительность заболевания превышала 7 дней в 80% случаев; у наблюдаемых детей отмечался выраженный лимфопролиферативный синдром, характеризующийся полилимфаденопатией (70%) и гипертрофией небных миндалин (100%), а также затруднением носового дыхания (60%) в следствии увеличения аденоидных вегетаций; в 90% случаев выявлена гепатомегалия ($p=0,01$, мощность=0,67).

Дети с заболеваниями респираторного тракта.

Дети, поступившие в стационар с заболеваниями респираторного тракта, имели отягощённый анамнез. У всех эпизоды ОРЗ повторялись от 8 до 10 раз в год, отмечалось затяжное течение ОРЗ с развитием различных осложнений.

Нами были выделены следующие клинические особенности течения заболеваний нижних отделов респираторного тракта у детей на фоне активно текущей ЦМВИ: длительность заболевания у детей, инфицированных ЦМВИ в 63,2% случаев была более 14 дней ($p.adjust=0.003$, мощность=0,78); заболевание чаще сопровождалось гипертермией от 38,5°C и выше (89,5%), а длительность лихорадки превышала 5 дней (78,9%) ($p.adjust=0.002$, мощность=0,81); частота развития осложнений была в 2 раза выше, чем у детей без маркеров ЦМВИ (47,4%, против 15%, $p.adjust=0.02$).

Дети с клиникой поражения ЦНС.

Нами были выделены следующие клинические особенности течения заболеваний ЦНС у детей на фоне активно текущей ЦМВИ: в 63,6% случаев лихорадка превышала 39,0°C и носила ремиттирующий характер, а ее длительность была более 5 дней (81,8%); длительность заболевания в 90% случаев была более 7 дней; судорожный синдром наблюдался у 72,7% детей, а тяжелое течение вплоть до комы встречалось в 45,4% случаев.

Дети с заболеваниями ЛОР органов.

Дети, поступившие в стационар с заболеваниями ЛОР-органов, имели отягощённый анамнез. Эпизоды отитов у наблюдаемых детей носили рецидивирующий характер (3-4 раза в год).

У детей с воспалительными заболеваниями ЛОР органов с маркерами активной ЦМВИ, по сравнению с детьми без маркеров ЦМВИ чаще регистрировался двусторонний острый средний гнойный отит (5 из 8, против 2 из 11, $p < 0,05$). В 37,5% случаев (3 из 8) у детей с маркерами активной ЦМВИ был выявлен острый гнойный гайморит и мастоидит. У детей без маркеров ЦМВИ, как правило регистрировался двусторонний острый средний катаральный отит (9 из 11). Были установлены следующие клинические особенности течения заболеваний ЛОР органов у детей на фоне активно текущей ЦМВИ. Как и в предыдущих группах обращает на себя внимание преобладание высокой лихорадки до 39,0°C ($p.adjust=0,02$), длительностью более 5 дней ($p.adjust=0,02$); длительность заболевания в 75% случаев была более 7 дней ($p.adjust=0,03$); отмечалась выраженная оталгия (62,5%), а также спонтанное гноетечение из уха (50%).

Дети с заболеваниями крови.

У детей с маркерами активной ЦМВИ в 2 раза чаще встречалась тромбоцитопеническая пурпура (6 из 9), по сравнению с нейтропенией (3 из 9). Нами показано, что у детей с маркерами активной ЦМВИ течение заболевания было тяжелым. Процент детей с длительной лихорадкой (77,8%) и длительным течением заболевания (72,7%) была выше, чем у детей без маркеров ЦМВИ. Так же обращало на себя внимание, что у детей с маркерами ЦМВИ в первые дни болезни

происходило резкое снижение тромбоцитов до единичных. Восстановление их уровня происходило после начала этиотропной терапии.

Клинико-диагностическое значение обнаружения структурного белка ЦМВ pp65 в лейкоцитах периферической крови у детей с соматической патологией.

Структурный белок ЦМВ pp65 относится к сверхранним антигенам, который представлен в вирионе в составе тегумента. Белок pp65 может быть обнаружен в ядре инфицированной клетки уже через час после проникновения вируса (Crough T., 2009). Учитывая, что в вирионе и в инфицированных клетках относительная доля pp65 выше по сравнению с любым другим белком ЦМВ, его используют в качестве выявляемого антигена в таком методе лабораторной диагностики ЦМВ, как ЦМВ pp65 - антигенемия.

Метод ЦМВ pp65 – антигенемии является наиболее популярным, поскольку определение структурного белка pp65 является подтверждением ранней активной ЦМВИ (Irene G., 2000). Суть метода заключается в определении белка ЦМВ pp65 (UL83) непосредственно в лейкоцитах периферической крови человека.

Структурный белок ЦМВ pp65 в лейкоцитах периферической крови обнаружен в 36,6% случаев. Так же было показано, что структурный белок ЦМВ pp65 в 95% случаев обнаружен у обследованных детей наряду с такими маркерами ЦМВИ как ДНК ЦМВ и anti-CMV IgM. Нами проанализирована вирусная нагрузка у больных с маркерами pp 65 и без него. Данные представлены в таблице 5.

Таблица 5. Вирусная нагрузка у обследованных детей с ЦМВИ (n=72)

Клинические образцы	ДНК ЦМВ					
	<3 log ₁₀ копий/мл		3-5 log ₁₀ копий/мл		>5 log ₁₀ копий/мл	
	pp65«+»	pp65«-»	pp65«+»	pp65«-»	pp65«+»	pp65«-»
Кровь, n=19	3	3	12*	1	-	-
Моча, n=25	3	-	9	7	6	-
Слюна, n=28	2	3	9	11	3	-
Суммарное количество образцов, n=72	8	6	30*	19	9	-

**-отличия достоверны по Z-критерию при сравнении частоты встречаемости вирусной нагрузки по группам, $p < 0,05$.*

Как видно из таблицы у детей с выявленным структурным белком ЦМВ pp65 низкое количество копий ДНК вируса ($< 3 \log_{10}$ копий/мл) встречалось только в 8 образцах, в то время как высокая вирусная нагрузка ($3-5 \log_{10}$ копий/мл и $> 5 \log_{10}$ копий/мл) - в 39 образцах. Согласно критерию независимости, хи-квадрат на уровне значимости $p = 0,02$ выявлено наличие взаимосвязи между количеством образцов с высокой вирусной нагрузкой у детей с выявленным структурным белком ЦМВ pp65 (30 из 72) и детьми без структурного антигена (19 из 72). Согласно Z-критерию равенства долей выявлены статистически достоверные различия между группой детей с выявленным структурным белком ЦМВ pp65 и детьми без структурного антигена на уровне значимости, $p < 0,05$. Также следует отметить, что у детей с выявленным белком ЦМВ pp65 ДНК вируса в крови была обнаружена чаще, чем у детей без структурного антигена ($p < 0,05$). Таким образом, обнаружение белка pp65 может рассматриваться не только как ранний маркер цитомегалии, но и свидетельствовать об активной репликации вируса.

Состояние обследованных детей было тяжелым. В 23,1% случаев выявлена деструктивная пневмония, в 19,2% - двусторонний рецидивирующий средний гнойный отит, в 15,4% – тромбоцитопеническая пурпура и менингоэнцефалит, в 7,7% - ЦМВ гепатит, а в 3,8% - острый гайморит/эмоидит. У детей с выявленным структурным антигеном ЦМВ pp65 осложнения встречались чаще, чем у детей без структурного антигена ЦМВ pp65 (73,1% против 26,7%, $p < 0,05$). Тоже можно сказать и о тяжести состояния. Тяжелая форма болезни встречалась чаще у детей с выявленным структурным антигеном ЦМВ pp65, чем у детей без структурного антигена ЦМВ pp65 (76,9% против 42,2%, $p < 0,05$). Данное наблюдение может служить основанием для включения структурного белка ЦМВ pp65 в план обследования детей с тяжелым течением заболеваний органов дыхания, ЦНС, ЛОР-органов, а также при различных гематологических нарушениях. Раннее обнаружение белка ЦМВ pp65 будет способствовать своевременно начатому лечению и позволит улучшить прогноз заболевания.

На сегодняшний день ЦМВ pp65 антигенемия продолжает оставаться золотым стандартом диагностики ЦМВ. Поскольку серологическое обследование является недостаточным, растет необходимость в использовании более точных и чувствительных методов диагностики, таких как количественная ПЦР. Хочется также отметить, что подход к идентификации ЦМВ должен носить комплексный характер, с использованием нескольких методов диагностики. Это позволит повысить информативность исследования, будет способствовать более полному представлению о стадии инфекционного процесса.

Проведенное нами исследование позволило более широко взглянуть на проблему ЦМВИ у детей с соматической патологией, выявило широкую инфицированность ЦМВ, подтвердило предположение о роли вируса в формировании тяжелых форм и осложненного течения соматических заболеваний. Полученные результаты могут быть использованы в практическом здравоохранении, для повышения информативности лабораторной диагностики, будут способствовать раннему распознаванию ЦМВ и своевременному назначению терапии.

ВЫВОДЫ

1. У детей с различной соматической патологией ЦМВИ встречается в 47,6% (71 из 149), на долю активной формы ЦМВИ приходится 80,3% (57 из 71).
2. Основными особенностями течения соматических заболеваний у детей с активной ЦМВИ являются длительный фебрилитет (>5 дней) (53,5%) (p.adjust=0,02), затяжной характер заболевания (>7 дней) (61,9%) (p.adjust=0,03), высокий процент осложнений (42,5%) (p.adjust=0,02).
3. У детей, с активной формой ЦМВИ чаще выявляются следующие осложнения соматических заболеваний: при заболеваниях нижних отделов респираторного тракта - полисегментарная пневмония (47,4% против 15%, p=0,02); при воспалительных заболеваниях ЛОР органов - рецидивирующий средний гнойный отит (50% против 9,1%, p=0,03), с развитием в 40% случаев спонтанной перфорации барабанной перепонки; при заболеваниях ЦНС –

судорожный синдром (72,7% против 42,8%, $p=0,05$) и кома (45,5% против 28,6%, $p=0,05$).

4. Структурный белок ЦМВ pp65 в лейкоцитах периферической крови обнаружен в 36,6% случаев наряду с другими маркерами активной ЦМВИ (ДНК ЦМВ и анти-СМV IgM). Его идентификация имеет клиничко-лабораторное значение у детей с тяжелой формой (76,9%) ($p<0,05$) и осложненным течением (73,1%) ($p<0,05$) различных гнойно-воспалительных заболеваний.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Детям с длительным фебрилитетом (>5 дней), затяжным и осложненным течением заболевания (>7 дней) необходимо проводить обследование на выявление маркеров активной ЦМВИ, таких как: анти-СМV IgM методом ИФА, количественное определение ДНК ЦМВ методом ПЦР в слюне, крови и моче, а также структурного белка ЦМВ pp65 методом ЦМВ pp65 антигенемии.
2. У детей с тяжелой формой и осложненным течением различных гнойно-воспалительных заболеваний необходимо проводить дообследование с целью выявления структурного белка ЦМВ pp65 в лейкоцитах периферической крови. Раннее обнаружение структурного белка ЦМВ pp65 свидетельствует об активной вирусной репликации и требует своевременного назначения противовирусной терапии.
3. Для подтверждения ЦМВИ необходимо использовать комплексный подход, который включает: ИФА с определением анти-СМV IgM и анти-СМV IgG, ПЦР с количественным определением ДНК вируса в крови, моче и слюне, а также ЦМВ pp65 антигенемии с целью выявления структурного белка ЦМВ pp65 в лейкоцитах периферической крови. Это позволяет повысить информативность исследования и способствует более полному представлению о стадии инфекционного процесса.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. Полученные данные помогут в дальнейшем изучении роли ЦМВИ в формировании соматической патологии у детей.

2. Актуальным представляется изучение роли ЦМВ у детей с другими соматическими заболеваниями (ревматоидный артрит, системная красная волчанка, нейросенсорная тугоухость, гепатит и нефрит).
3. Необходимо расширить спектр исследуемых герпес вирусов с целью комплексной оценки их влияния на развитие и течение соматической патологии у детей.
4. Дальнейшая разработка и последующее внедрение новых методов лабораторной диагностики ЦМВИ будут способствовать раннему выявлению вируса и своевременному назначению специфической противовирусной терапии.
5. Целесообразно разработать и изучить эффективность новых подходов к терапии ЦМВ у детей с соматической патологией.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИСЕРТАЦИИ

1. Сотников, И.А. К вопросу о клиническом значении персистенции CMV / И.А. Сотников, Н.Ю. Егорова, Л.Н. Гусева, В.Ф. Учайкин, А.А. Куц // Материалы X Конгресса детских инфекционистов «Актуальные вопросы инфекционной патологии и вакцинопрофилактики». – 2011. - С.103.
2. Сотников, И.А. К вопросу о клиническом значении активной персистенции CMV у часто и длительно болеющих детей / И.А. Сотников, Н.Ю. Егорова, Л.Н. Гусева, В.Ф. Учайкин // Материалы XI Конгресса детских инфекционистов «Актуальные вопросы инфекционной патологии и вакцинопрофилактики». – 2012. - С.58.
3. Титарова, Л.С. Роль герпесвирусных инфекций в развитии рецидивирующих средних отитов у детей / Л.С. Титарова, В.С. Минасян, М.М. Полунин, И.А. Сотников // Материалы XII конгресса детских инфекционистов России «Актуальные вопросы инфекционной патологии и вакцинопрофилактики». - 2013. - С.67.
4. Сотников, И.А. Клинико-лабораторное значение определения структурного антигена CMV pp65 в лейкоцитах периферической крови у часто и длительно болеющих детей / И.А. Сотников, Н.Ю. Егорова, Ю.А. Тюленев, В.Ф. Учайкин

- // Материалы XII Конгресса детских инфекционистов «Актуальные вопросы инфекционной патологии и вакцинопрофилактики». – 2013. - С.64.
5. Климова, Р.Р. Частота встречаемости герпесвирусов человека IV-VI типов у детей с острыми респираторными заболеваниями / Р.Р. Климова, И.А. Сотников, Е.В. Чичев, Н.Ю. Егорова, В.Ф. Учайкин, А.А. Куц // 8-я Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика 2014». – 2014. - С.84.
 - 6. Климова, Р.Р. Сравнительный анализ частоты встречаемости маркеров герпесвирусных инфекций в клинических материалах у детей с различными инфекционными патологиями / Р.Р. Климова, И.А. Сотников, Е.В. Чичев, Н.Ю. Егорова, Н.В. Околышева, Л.Б. Кистенева, В.Ф. Учайкин, А.А. Куц // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2014. - №4. - С.33-38.**
 7. Минасян, В.С. К вопросу о влиянии вирусов Эпштейн-Барра и цитомегаловируса на течение рецидивирующих средних отитов у детей / В.С. Минасян, Л.С. Титарова, И.А. Сотников, Н.В. Злобина // Материалы XII научно-практической конференции «Фармакологические и физические методы лечения в оториноларингологии». - 2014. - С.41-42.
 - 8. Минасян, В.С. Особенности течения рецидивирующих средних гнойных отитов у детей, имеющих маркеры герпетических инфекций / В.С. Минасян, М.М. Полуниин, Л.С. Титарова, И.А. Сотников, Н.Ю. Кан // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. - 2015. - №1. - С.165-166.**
 - 9. Титарова, Л.С. Патогенетическая значимость герпетических инфекций в формировании рецидивирующего среднего гнойного отита у детей / Л.С. Титарова, В.С. Минасян, И.А. Сотников, Н.Ю. Кан // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. - 2015. - № 3. - С.74-78.**
 10. Минасян, В.С. Клинико-патогенетическое значение герпесвирусных инфекций у детей с рецидивирующими средними отитами / В.С. Минасян, Л.С. Титарова, И.А. Сотников // Материалы XIV Российского конгресса оториноларингологов «Наука и практика в оториноларингологии». – 2015. - С.109-110.

11. Сотников, И.А. О роли цитомегаловирусной инфекции в формировании различной патологии у часто и длительно болеющих детей / И.А. Сотников, Н.Ю. Егорова, Л.С. Титарова, В.Ф. Учайкин // Материалы XIV Конгресса детских инфекционистов «Актуальные вопросы инфекционной патологии и вакцинопрофилактики». – 2015. - С.58.
- 12. Сотников, И.А. Значение персистенции цитомегаловирусной инфекции в формировании группы часто болеющих детей / И.А. Сотников, Н.Ю. Егорова, Е.А. Вальц, Е.В. Чичев, А.А. Куц // Детские инфекции. – 2015. - № 4. - С.13-15.**