



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ” – ВАРНА
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНА
КАТЕДРА МИКРОБИОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ

Д-Р ЖИВКА СТОЙКОВА ДЕМИРЕВА-КАЛЧЕВА

**СЕРОЕПИДЕМИОЛОГИЧНИ И МОЛЕКУЛЯРНО-
ГЕНЕТИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ
НА ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНАТА ИНФЕКЦИЯ
ПРИ РИСКОВИ ГРУПИ**

АВТОРЕФЕРАТ

НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИСЪЖДАНЕ
НА ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН „ДОКТОР“

По професионално направление: 7.1. Медицина
Научна специалност: Вирусология, шифър 01.06.13

Научен ръководител: доц. д-р Лилия Иванова, дм

Официални рецензенти:

проф. д-р Радка Аргирова, дмн
доц. д-р Любомира Николаева-Гломб, дм

ВАРНА, 2018

Дисертационният труд съдържа 190 страници и е онагледен с 44 таблици, 12 графики и 3 фигури. Библиографията включва 352 литературни източника, от които 7 на кирилица и 345 на латиница. Изследванията са извършени в Лаборатория Вирусология на УМБАЛ „Св. Марина”- Варна.

Дисертационният труд е обсъден и предложен за защита на Катедрен съвет на Катедра “Микробиология и вирусология” при Медицински Университет „Проф. д-р П. Стоянов” – Варна на 02.05.2018 г. и е насочен за публична защита пред Научно жури в състав:

1. Проф. д-р Радка Младенова Аргирова, дмн
2. Доц. д-р Любомира Крумова Николаева-Гломб, дм
3. Доц. Петя Динкова Генова-Калу, дб
4. Доц. д-р Лилия Иванова, дм
5. Доц. д-р Теменуга Стоева, дм

Дисертантът работи като асистент в Катедра „Микробиология и вирусология“, МУ-Варна, Факултет Медицина и като лекар асистент в Лаборатория Вирусология на УМБАЛ „Света Марина“ гр. Варна.

Експерименталната работа е извършена в УМБАЛ „Света Марина“ гр. Варна.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на2018 г. от часа в зала на УМБАЛ „Света Марина” гр. Варна на открито заседание на Научното жури. Материалите по защитата са на разположение в библиотеката и на сайта на Медицински Университет – Варна <http://www.mu-varna.bg>.

СЪДЪРЖАНИЕ:

1.	Увод	5
2.	Цел и задачи на проучването	7
3.	Материали и методи	9
4.	Резултати и обсъждане	13
4.1.	Ретроспективни проучвания (2003-2015)	13
4.2.	Проспективни проучвания (2016-2018)	35
4.2.1.	Проспективно серологично проучване на инфектираността и давността на CMV инфекцията при бременни жени	35
4.2.2.	Проспективно проучване на CMV инфекция при суспектни деца до 3 месечна възраст	47
4.2.3.	Проспективно проучване на безсимптомна CMV инфекция при клинично здрави новородени	53
4.2.4.	Проспективно проучване на CMV инфекция/реактивация при пациенти с различни видове лимфоми	58
4.2.5.	Проспективно проучване на CMV инфекция/реактивация при трансплантирани реципиенти	68
5.	Изводи	87
6.	Справка за приносите на дисертацията	90
7.	Списък на научните публикации, свързани с дисертацията	91
8.	Списък на доклади и постери от проведени научни форуми, свързани с дисертацията	91
9.	Участия в научни проекти, свързани с дисертацията	92

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

На кирилица:

АЛАТ – аланинаминотрансфераза

АСАТ - аспартатаминотрансфераза

БТ – бъбречна трансплантация

БХ – болест на Ходжкин

г.с. – гестационна седмица

ДНК - дезоксирибонуклеинова киселина

иРНК - информационна рибонуклеинова киселина

МДС – миелодиспластичен синдром

НХЛ – неходжкинов лимфом

РНК - рибонуклеинова киселина

СЗО - Световна здравна организация

ТХСК - трансплантация на хемопоетични стволови клетки

ЦНС - централна нервна система

На латиница:

CMV - цитомегаловирус

DNA – дезоксирибонуклеинова киселина

EBV – Епщайн-Бар вирус

ELISA - имуноензимна реакция

GCSF – гранулоцитен колонийстимулиращ фактор

HLA – човешки левкоцитен антиген

HSV1 – херпес симплекс вирус 1

HSV2 – херпес симплекс вирус 2

ORFs – Отворени рамки за четене

PCR - полимеразоверижна реакция

QRT-PCR – количествена полимеразоверижна реакция в реално време

RNA - рибонуклеинова киселина

RT-PCR - полимеразоверижна реакция в реално време

TNF – тумор некротичен фактор

VZV – варицела зостер вирус

WHO – Световна здравна организация

1. УВОД

От известните досега повече от 200 херпесни вируса, осем предизвикват заболявания при хората (HSV1, HSV2, VZV, CMV, EBV, HHV6, HHV7, HHV8). Инфекциите с тях се характеризират с някои общи отличителни черти: 1) Масовост и най-често субклинично протичане, когато засягат детската възраст; 2) Остават като пожизнена инфекция, като отделните херпесни вируси се различават в начина и мястото на установяване на латенция; 3) Показват постоянна тенденция за увеличаване честотата и тежестта на клиничната манифестация; 4) Реактивират се при имуносупресивни състояния и се превръщат в сериозен клиничен проблем. CMV инфекцията е една от най-разпространените инфекции с различна честота в различните региони на света и в тясна зависимост от социално-икономическия статус на населението.

Мониторирането на разпространението е важно, поради очакваното влияние на инфекцията върху рисковите групи пациенти под имуносупресия, имунокомпроментирани, бременните жени и новородените деца. Важно е да се определи давността на инфекцията при бременните жени, тъй като първична и реактивираната CMV инфекция са свързани с различни рискове за трансмисия на вируса към плода. CMV инфекцията е най-честата конгенитална инфекция и по литературни данни засяга около 1% (0.2 –2.5%) от всички живородени деца с продължителни последици в развитието. Новородените деца от майки с първична или реактивирана латентна CMV инфекция със или без клинична симптоматика при раждането много често имат ментални и физически проблеми в по-късна възраст.

Самостоятелно прилагана ELISA техниката не дава възможност за пълна и прецизна диагностика на конгенитална CMV инфекция, тъй като крие риск от фалшиво негативни и фалшиво позитивни резултати. Допълването на резултатите с доказване на CMV-DNA след прилагане на RT PCR в различни телесни течности (плазма, ликвор, урина, слюнка) в първите 21 дни след раждането на детето се счита за доказателствено за конгенитална инфекция.

Пациентите под имуносупресия по повод или в резултат на друго заболяване са в риск от реактивация на латентната CMV инфекция в някои случаи с фатални последици. Инфекцията с CMV при пациентите след

трансплантация на солидни органи и хемопоеични стволови клетки предизвиква директни (CMV синдром, тъканно инвазивно заболяване) и индиректни ефекти, включващи отхвърляне на трансплантата, намаляване преживяемостта на присадката и на пациента и предразполага към развитие на опортюнистични инфекции и малигнизации.

В диагностицирането и мониторирането на CMV инфекцията, в допълнение към широко използваната до сега ELISA техника, в света се прилага техника за определяне на вирусен товар с помощта на полимеразна верижна реакция (PCR). В ELISA успешно се доказва инфектираността на реципиента и донора, и се дефинират пациентите във „висок риск“ от първична инфекция, реактивация на латентна инфекция и/или суперинфекция от донорния орган. Определянето на вирусен товар с помощта на PCR дава възможност да се дефинират тези пациенти, които очаквано ще развият или са развили CMV заболяване. Благодарение на съвременната лабораторна PCR диагностика се осигурява възможност за адекватна и навременна етиологична терапия или противовирусна профилактика. Мониторирането на вирусния товар при пациентите във „висок риск“ дава възможност за адекватна профилактика и инициативна терапия и определя продължителността на специфичното лечение.

Значението на CMV за съвременната патология понастоящем не подлежи на съмнение. Вирусът е особено проблемен за рисковите групи пациенти – имуносупресирани, имунокомпроментирани пациенти, бременни жени и новородени. Този факт поставя вируса във фокуса на внимание на широк кръг от медицински специалисти – клиницисти, вирусолози, имунолози, епидемиолози, акушер-гинеколози, неонатолози и трансплантолози. В годините след откриването на вируса с помощта на хистологични методи, се усъвършенства вирусологичната и серологичната диагностика. През последните тридесет години, с развитието и въвеждането в клиничната практиката на молекулярно - генетичните методи за изследване е отбелязан съществен напредък по отношение на диагностиката и превенцията на CMV асоциираните заболявания.

В България са извършвани сероепидемиологични и лабораторно-диагностични проучвания на CMV инфекцията в общата популация и при деца в неонаталната възраст, но липсват данни за евентуална динамика в серопревалентността и няма провеждани мащабни проучвания на инфекцията в рисковите групи пациенти с помощта на съвременни

лабораторни методи. Проблемът става все по-актуален с развитието на трансплантологията и увеличаване на дела на имunosупресираните пациенти в клиничната практика. Натрупването на информация по тези важни въпроси ще има теоретическо и практическо значение при решаването на проблеми, свързани с диагностиката, превенцията и лечението на CMV инфекциите в рисковите пациенти.

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Цели на изследването:

1. Да се дефинира разпространението на CMV инфекцията сред населението в Североизточна България в зависимост от възрастта, пола и по рискови групи в ретроспективно проучване за периода 2003 - 2015 г.
2. В проспективно проучване (2016 - 2018 г.) да се установи относителния дял и клиничната значимост на инфекцията при рискови групи пациенти – бременни жени, новородени деца и имунонекомпетентни пациенти с приложение на серологични и молекулярно-генетични методи.

Тъй като регионалните и националните тенденции в разпространението на CMV според серопревалентността не са изследвани в последните години в настоящия труд ние си поставихме следните задачи в:

Ретроспективен анализ

Задачи на изследването:

- 2.1. Да се дефинира сероепидемиологичния CMV статус на населението в Североизточна България в общата популация и да се регистрират настъпили промени в сероепидемиологичната обстановка.
- 2.2. Да се определи относителния дял на заразеност при жените в детеродна възраст.
- 2.3. Да се определи относителния дял на заразеност на новородени деца.
- 2.4. Да се определи относителния дял на заразеност при имunosупресирани и имунокомпрометирани пациенти, включително живеещи с HIV инфекция.

Проспективнен анализ

Задачи на изследването:

2.5. Да се дефинира инфектираността на бременни жени, чрез конвенционален серологичен скрининг и да се уточни давността на инфекцията в тест за авидност на anti CMV IgG антителата в ELISA.

2.6. Да се дефинира относителният дял на рисковите бременни жени за трансмисия на вируса към плода. Да се дефинират критерии за мониториране с цел превенция на фетална, интранатална и ранна постнатална CMV инфекция.

2.7. Да се определи сравнително ролята на CMV в конгениталната и ранната кърмаческа патология с прилагане на серологични и молекулярно-биологични методи.

2.8. Да се установи честотата на конгениталната CMV инфекция при клинично здрави новородени с помощта на молекулярно-биологични методи в клиничен материал слюнка.

2.9. Да се определи ролята на CMV инфекцията и нейната реактивация при имунонекомпетентни пациенти с различни видове лимфоми с прилагане на серологични и молекулярно-биологични методи. Резултатите да се сравнят с тези от ретроспективното серологично проучване в същата целева група.

2.10. Да се определи ролята на CMV инфекцията и нейната реактивация при пациенти след бъбречна трансплантация и трансплантация на хемопоетични стволови клетки с прилагане на серологични и молекулярно-биологични методи. Да се анализира сравнително значението и ролята на всеки метод в диагностиката на CMV инфекцията и при мониториране на пациентите след трансплантация, с цел прецизиране на необходимостта от профилактика и терапия.

Хипотеза: Предвид високата заразеност в региона допускаме и висока честота на реактивация/реинфекция с вируса при всички пациенти под имуносупресия, имунокомпроментирани пациенти, бременни жени, както и значителна роля на CMV във феталната, неонаталната и ранната кърмаческа патология.

Антитеза: Поради подобряване на социалноикономическите фактори е възможно намаление на разпространението на CMV инфекцията/реактивацията и свързаните с нея усложнения, сравнено с предходни проучвания.

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

3.1. Материали.

3.1.1. Материал за ретроспективен серологичен анализ (2003 - 2015 г.).

За периода 2003 - 2015 г. са изследвани единични серумни проби от 7879 пациенти в Лабораторията по Клинична вирусология към МБАЛ „Св. Марина“, гр. Варна. Лицата са изследвани в диагностичен аспект и/или профилактично, което дава по-реална информация за заразеността, клиничната значимост и началото на първичната инфекция в региона. Възрастовият диапазон на изследваните е от 1 ден до 89 годишна възраст, средна възраст 28.72 г. (SD±23.36). От тях 6683 (84.8%) са хоспитализирани пациенти в клиниките на МБАЛ „Св.Марина“ и 1196 (15.2%) са амбулаторно преминали пациенти. Демографската характеристика на изследваните лица показва 4220 (53.56%) мъже със средна възраст 27.44 г. (SD±22.15) и 3659 (46.43%) жени със средна възраст 30.18 г. (SD±22.07). От изследваните индивиди 919 са деца до 1 година.

3.1.2. Материал за проспективно проучване (2016 - 2018 г.).

В проспективно проучване за уточняване заразеността на бременни жени и давността на CMV инфекцията при тях, бяха изследвани 121 бременни жени, в различен срок на бременността. Пациентките бяха насочвани към Лабораториите по Клинична вирусология и Медицинска генетика на МБАЛ „Св. Марина“ гр. Варна. Бременните жени бяха във възрастов диапазон 14 г. - 41 г., средна възраст 28.66 г. (SD±5,88). В първи триместър на бременността бяха 75 жени (62%), във втори триместър - 17 (14.1%) и в трети триместър – 29 (23.9%).

В проспективно проучване на конгениталната и ранната постнатална CMV инфекция при суспектни деца бяха изследвани 50 симптоматични новородени до 3 месечна възраст от Отделение по неонатология на СБАГАЛ „Проф. д-р Димитър Стаматов“ гр. Варна и Детските клиники на МБАЛ “Св. Марина“ гр. Варна.

В проспективно проучване на безсимптомна конгениталната CMV инфекция в материал слюнка бяха изследвани 63 клинично здрави новородени на възраст до 16 дни от Отделение по неонатология на СБАГАЛ „Проф. д-р Димитър Стаматов“ гр. Варна, Родилно отделение на МБАЛ

„Майчин дом“ – гр. Варна и Родилно отделение на МБАЛ „Света Анна“ гр. Варна.

За проспективно проучване на CMV инфекция/реактивация при имунонекомпетентни пациенти с различни видове лимфоми (НХЛ и БХ) бяха изследвани 50 пациенти от 23 до 78 г., средна възраст 52.56 г. (SD±13.92) от Клиника по Хематология на МБАЛ “Св. Марина“ гр. Варна.

В проспективно проучване ролята и клиничната значимост на CMV инфекцията и възможностите за реактивация при пациенти след трансплантация бе осъществен дългосрочен мониторинг на общо 42 трансплантирани пациенти, от които 30 бъбречно трансплантирани реципиенти, 7 пациента след алогенна и 5 пациента след автоложна трансплантация на хемопоеични стволови клетки, съответно от Клиниките по Нефрология и Хематология на МБАЛ “Св. Марина“ гр. Варна.

3.2. Методи:

За изпълнение на поставените задачи, в настоящия дисертационен труд бяха използвани методи разпределени в три основни групи: серологични, молекулярно-биологични и статистически.

3.2.1. Серологични имуноензимни методи (ELISA):

3.2.1.1. Индиректен ELISA тест за доказване на специфични Anti CMV IgM антитела- търговски тестове, базирани на антиген-рекомбинантна техника (Anti CMV ELISA IgM, EUROIMMUN Germany). Тестът се изпълнява съгласно указанията на фирмата производител и се отчита при екстинкция 450 nm и на 650 nm като референтна дължина на вълната.

Материалът за изследване в този тест е серум, взет със затворена система за отделяне на серум с гел Vacutainer SST II Advance на фирмата Becton Dickenson. След венепункцията кръвта е оставена за 30 минути на стайна температура, за да се осъществи кръвосъсирването и след това серумът е отделен чрез центрофугиране за 5 минути на 3000 g и е съхраняван на -20°C до осъществяването на анализа.

3.2.1.2. Индиректен ELISA тест за доказване на специфични Anti CMV IgG антитела - търговски тестове, базирани на антиген-рекомбинантна техника (Anti CMV ELISA IgG, EUROIMMUN Germany). Тестът се изпълнява

съгласно указанията на фирмата производител и се отчита при екстинкция 450 nm и на 650 nm като референтна дължина на вълната.

Материалът за изследване в този тест е серум, взет със затворена система за отделяне на серум с гел Vacutainer SST II Advance на фирмата Becton Dickenson. След венепункцията кръвта е оставена за 30 минути на стайна температура, за да се осъществи кръвосъсирването и след това серумът е отделен чрез центрофугиране за 5 минути на 3000 g и е съхраняван на -20°C до осъществяването на анализа.

3.2.1.3. Тест за авидност на Anti CMV IgG антитела, определящ давност на специфичните IgG антитела - търговски кит, базиран на антиген-рекомбинантна техника - Anti CMV ELISA IgG avidity determination, EUROIMMUN Germany.

Материалът за изследване в този тест е серум, взет в затворена система за отделяне на серум с гел Vacutainer SST II Advance на фирмата Becton Dickenson. След венепункцията кръвта е оставена за 30 минути на стайна температура, за да се осъществи кръвосъсирването и след това серумът е отделен чрез центрофугиране за 5 минути на 3000 g и е съхраняван на -20°C до осъществяването на анализа.

3.2.2. Молекулярно-биологични методи за доказване и количествено определяне на CMV-DNA. Екстракция и амплификация на CMV-DNA в QRT-PCR.

3.2.2.1. Колоно-базиран метод за екстракцията на нуклеинови киселини с търговски тест DNA/RNA Prep, nucleic acid extraction kit for the extraction and purification of total RNA/DNA, Sacace, Italy, Biotechnologies от 150µl клиничен материал в краен обем на елуата 50µl.

Материалът за изследване е плазма, взет със затворена система за отделяне на плазма с антикоагулант EDTA Vacutainer на фирмата Becton Dickenson. След венепункцията плазмата е отделена чрез центрофугиране за 20 минути на 3500 g и е съхранявана в стерилни микроцентрофужни епруветки 1,5 мл. на -20°C до осъществяването на екстракцията. Екстракцията беше осъществена според протокола на производителя.

Изолираната 50µl нуклеинова киселина в микроцентрофужните епруветки 1.5 мл се съхранява на -70°C до следващите стъпки на анализа.

3.2.2.2. *Пелетно-базиран метод* за екстракция от клиничен материал слюнка.

Пробите слюнка бяха събрани със стерилен памучен тампон до обилното му накисване, след което ротирахме тампона в продължение на 30 секунди в 300 μ l стерилна вода за инжекции и внимателно го отцеждахме. Пробите се транспортираха незабавно до лабораторията и се замразяваха на -20° C до деня на изолацията и анализа. Екстракцията беше извършена по протокол на производителя DNA-Sorb-A, Sacace, Italy, Biotechnologies. Изолираната нуклеинова киселина, готова за амплификация и се съхранява на -70° C до следващите стъпки на анализа.

3.2.2.3. *Амплификация на изолираната ДНК.*

Полимеразната верижна реакция (PCR) беше проведена с използването на търговски кит, основан на Taq-man принципа: Real time Quantitative PCR for CMV-DNA detection/ Sacace, Italy, Biotechnologies. Линеиният диапазон на CMV Real-TM Quant PCR теста е 500 – 10 000 000 copies/ml, а обявената чувствителност е 400 copies/ml. Всички реакции бяха извършени в присъствие на Internal control (IC) за да идентифицира възможна инхибиция на реакцията и ендогенен IC glob (b-globine gen) за да оцени адекватността на материала и съхранението му, според протокола на производителя.

Резултата е конвертиран в IU/ml с помощта на използването на 1st WHO Standart (5 000 000 IU/ml) за калибриране на теста.

Амплификацията е извършена с PCR инструмент Quant Studio Dx в краен обем 25 μ l реакции.

3.2.3. **Статистически методи:**

Делът на CMV серопозитивните индивиди и кореспондиращите им доверителни интервали, χ^2 разпределение и p-стойности бяха изчислени с McCallum Layton calculators (www.mccallum-layton.co.uk) и Social Science Statistics (www.socscistatistics.com). $P < 0.05$ беше считано за статистически значимо за всички статистически анализи.

4. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

4.1. РЕТРОСПЕКТИВНИ СЕРОЛОГИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ РАЗПРОСТРАНЕНИЕТО НА CMV ИНФЕКЦИЯТА В ОБЩАТА ПОПУЛАЦИЯ И ПРИ РИСКОВИ ГРУПИ (2003 - 2015).

4.1.1. Сероепидемиологично проучване върху разпространението на CMV инфекцията сред населението в Североизточна България.

Описание на извадката:

Настоящото проучване обхваща лица и пациенти, изследвани в периода 2003 - 2015 г. Проучването обхваща 7879 лица, както хоспитализирани ($n=6683$, 84.8%, 95% CI: 84.01% - 85.59%), така и амбулаторни пациенти ($n=1196$, 15.2%, 95% CI: 14.41% - 15.99%), във възрастовия диапазон 1 ден - 89 години. През наблюдавания период се установи като тенденция плавно увеличаване броят на анализирани проби във всяка следваща година, вероятно продиктувано от нарастващия клиничен интерес към CMV с годините.

Средната възраст на изследваните 7879 лица е 28.72 г. ($SD\pm 23.36$). При направената справка в Национален статистически институт (www.nsi.bg), средната възраст на населението в Република България към 31.12.2015 г. е 43.3 години. Следователно необходимост от изследването имат предимно по-млади хора - деца и лица в детеродна възраст. От участниците в проучването по-голям дял имат мъжете - 53.56% (95% CI: 52.46 - 54.66, $n=4220$) със средна възраст 27.44 г. ($SD\pm 22.15$). Жените съставляват 46.43% (95% CI: 45.33 - 47.53, $n=3659$) със средна възраст 30.18 г. ($SD\pm 22.07$).

Изследваните лица бяха разположени в широк възрастов диапазон (от 1 ден до 89 години) и бяха разделени в 12 възрастови групи. Децата до 1 г. ($n=919$) бяха разделени на 2 възрастови групи: от 0 до 6 месеца и от 7 месеца до 1 година. Останалите пациенти ($n=6960$) бяха разделени в 10 възрастови групи – през равен 5 годишен интервал до 30 годишна възраст и през равен 10 годишен интервал до 60 годишна възраст. Последната възрастова група е нефиксирана и обхваща всички изследвани лица над 61 г., поради по-малкия брой на участниците в нея.

Резултати и обсъждане:

Таблица 1. Разпределение на изследваните лица в зависимост от възрастта, пола и наличието на anti CMV IgG.

	Брой изсл.	CMV IgG +	%	Брой мъже	CMV IgG +	%	Брой жени	CMV IgG +	%
0-6 м.	614	509	82,9	369	308	83,5	245	201	82
7м.-1 г.	305	164	53,7	187	101	54	118	63	53,4
2-5 г.	959	505	52,6	579	307	53	380	198	52,1
6-10 г.	587	369	62,8	344	205	59,6	243	164	67,5
11-15 г.	500	347	69,4	257	176	68,5	243	171	70,4
16-20 г.	504	357	70,8	263	184	69,9	241	173	71,8
21-25 г.	466	366	78,5	220	162	73,6	246	204	82,9
26-30 г.	507	425	83,8	227	183	80,6	280	242	86,4
31-40 г.	961	821	85,4	494	417	84,4	467	404	86,5
41-50 г.	730	673	92,2	374	339	90,6	356	334	93,8
51-60 г.	751	695	92,5	387	356	91,9	364	339	93,1
61 г. +	995	945	94,9	519	486	93,6	476	459	96,4
Общо	7879	6176	78,4	4220	3224	76,4	3659	2952	80,7

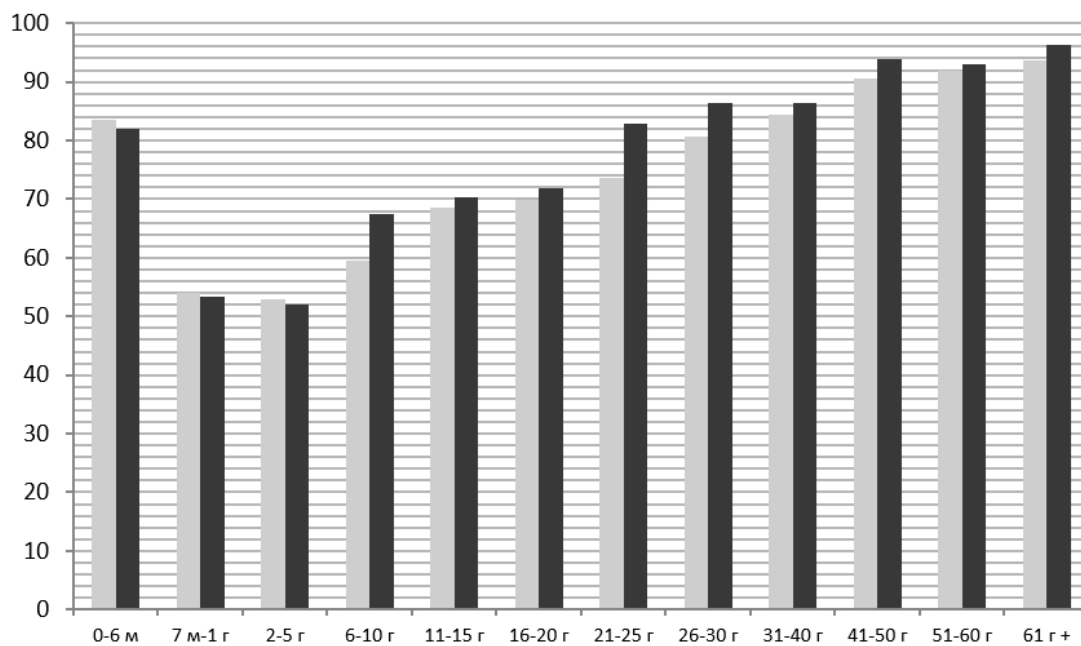
Резултатите от нашето проучване показват обща инфектираност на населението от региона **78.4%** (95% CI: 77.5 - 79.3) (табл. 1) и са близки до данни, докладвани в други страни по света. Проучване сред 2400 здрави кръводарители в Япония показва серопозитивност в 76.6% (Furui Y 2013). По-висока серопревалентност е установена в Индия (95%) при изследване на 200 здрави кръводарители (Kothari A 2002). По-ниска средна серопревалентност е установена в САЩ (58.9%) (Staras SAS 2006). В друга обзорна статия се разглежда детайлно въпроса за вариабилността в CMV серопревалентността по света. Установено е, че тя варира между 36% и 77% в страни като САЩ, Австралия и Северна Европа и контрастира с тази в някои развиващи се страни, като достига близо 100% в Турция, Бразилия и Суб-Сахарна Африка.

При предходно проучване в България, сред случайно подбрани 1846 лица, установената средна серопозитивност в ELISA е 69.87%. При сравняване с резултатите получени в комплементфиксиращ тест (CFT - 64.40%), авторите не установяват статистически значими различия, което според тях прави и двата теста подходящи за сероепидемиологични проучвания. В ELISA вероятно по-достоверно се доказва ранното постнатално инфектиране (Ivanova L 2007). В друго проучване проведено в България сред 166 лица, средната серопозитивност в ELISA е 59%.

Лимитиращ фактор в това проучване е малкият брой изследвани лица до 19 годишна възраст (n=36), но независимо от това, според автора са очертава тенденцията за ранно инфектиране с вируса (Теохаров П 2013). По-високият относителен дял серопозитивни лица в нашето проучване (78.4%), вероятно се дължи на по-големия брой изследвани лица, по-задълбочено терсене на етиологична връзка с вируса и по-чувствителните съвременни търговски ELISA тестове.

Възрастова характеристика на разпространението на anti CMV IgG серопозитивността

Графика 1. Разпределение на anti CMV IgG позитивните индивиди (n=6176) в зависимост от възрастта и пола (първа колона - мъже; втора колона - жени).



При разпределението на anti CMV IgG позитивните индивиди в зависимост от възрастта (табл. 1) установихме серопозитивност в 82.9% (95% CI: 79.9 - 85.9) от децата във възрастова група 0 - 6 месеца. Процентът на серопозитивните лица в следващите възрастови групи намалява и е близък в групите 7 м. - 1 г. и 2 г. - 5 г. - 53.7% (95% CI: 48.1 - 59.3) и 52.6% (95% CI: 49.4 - 55.8) съответно. Делът на серопозитивните индивиди

прогресивно се увеличава в следващите възрастови групи. Относителният дял на мъжете и на жените, положителни в anti CMV IgG във всяка възрастова група след 5 г. възраст (графика 2) показва по-висок относителен дял на позитивните жени в сравнение с мъжете, но статистически значима разлика ($p < 0.05$) има само във възрастовите диапазони 21 г. - 25 г. и 26 г. - 30 г.

Данните от разпределението на пациентите по възраст дава основание да заключим, че серопревалентността е право пропорционално свързана с възрастта и нараства постепенно с нейното повишаване. Отклонение от това наблюдаваме в най-малките възрастови групи. От децата във възрастова група 0 - 6 месеца, 82.9% (95% CI: 79.9 - 85.9) показват положителен резултат в теста за доказване на anti CMV IgG антитела (табл.1, графика 1). В следващата възрастова група - 7 м. – 1 г., дялът на децата със специфични IgG антитела рязко намалява до 53.7%, вероятно свързано с изчерпване на пасивните майчини антитела след раждането и е най-нисък във възрастова група 2 г. – 5 г. (52.6%). В следващите възрастови групи относителният дял на лицата със специфични anti CMV IgG антитела расте пропорционално като достига 94.9% в най-високата възрастова група (≥ 61 г.).

Полово-свързана характеристика на anti CMV IgG серопозитивността

Табл.2. Разпределение на общата CMV серопревалентност в зависимост от пола.

	Брой изследвани (n)	Брой anti CMV IgG позитивни	anti CMV IgG позитивни (%)	95% доверителен интервал (CI)
Мъже	4220	3224	76.4 %	75.1 - 77.7
Жени	3659 (1612*)	2952 (1362*)	80.7 % (84.5 %*)	79.4 - 82.0 (82.7 - 86.3*)
Общо	7879	6176	78.4 %	77.5 - 79.3

*Жени в детеродна възраст 15-49 години (дефинирана според WHO)

Разпределението на положителните лица в зависимост от пола в проучването показва, че лицата от женски пол са по-засегнати от CMV инфекцията в сравнение с лицата от мъжки пол (табл 2). Разликата в

пропорциите на серопозитивните жени и мъже е статистически значима (χ^2 от 21.2 и $p < 0.001$) (McCallum Layton calculators). Изчисленото рисково съотношение (risk ratio) показва че жените са изложени на по-голям риск от CMV серопозитивност с 6% (RR=1.06, 95% CI: 1.03- 1.08) за разлика от мъжете. Статистически значимата разлика в серопозитивността е възможно да се дължи на по-високата средна възраст на жените в проучването. Друго възможно обяснение на този факт, е че жените по-често се заразяват по сексуален път в допълнение към контактно-битовия път на заразяване в обществото, както и при близък контакт с вирус-съдържащи секрети (урина, слюнка) на инфектирани деца. Този хоризонтален път на разпространение представлява значителен риск за младите майки, бременните жени и тези с професии на учители, възпитатели и аниматори (Staras SAS 2008).

Възрастовото начало на първичната CMV инфекция

От всички участници в проучването (n=7879), anti CMV IgM позитивен резултат показаха 22.8% (95%CI: 20.86 - 24.74, n=1802) от изследваните (таблица 3).

Таблица 3. Разпределение на изследваните лица в anti CMV IgM теста в зависимост от възрастта и пола.

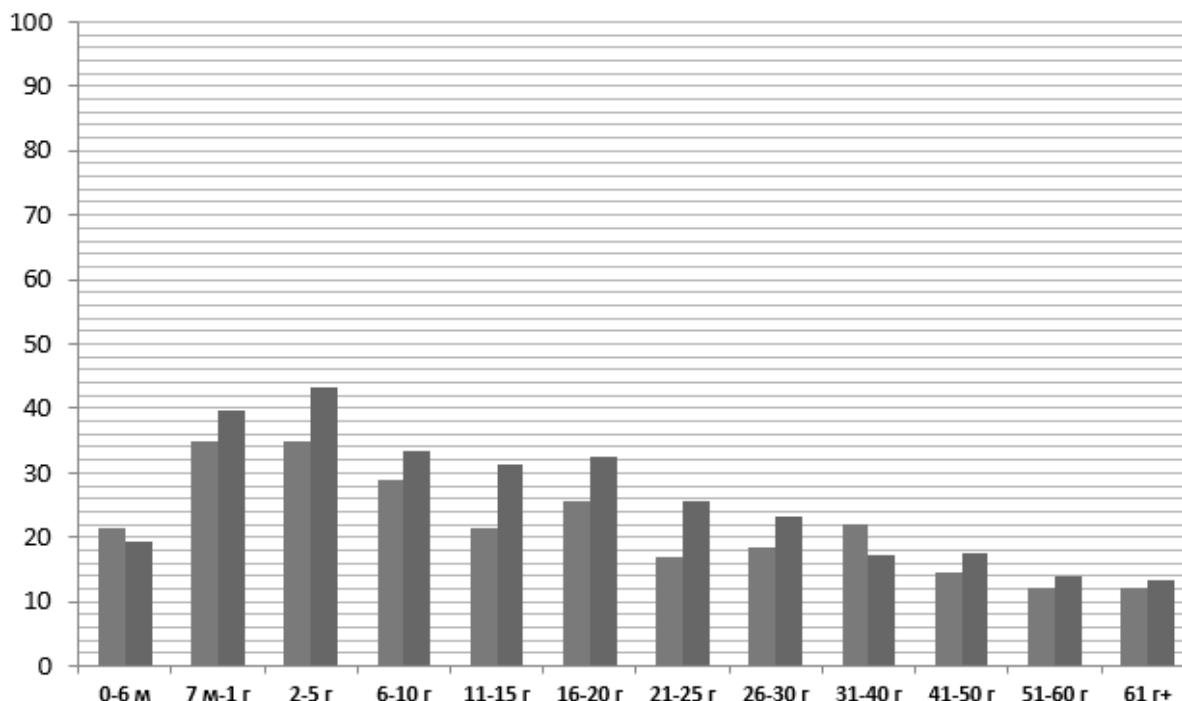
	Брой изсл.	CMV IgM +	%	Брой мъже	CMV IgM +	%	Брой жени	CMV IgM +	%
0-6 м.	614	126	20,5	369	79	21,4	245	47	19,2
7м.-1 г.	305	112	36,7	187	65	34,8	118	47	39,8
2-5 г.	959	368	38,4	579	203	35	380	165	43,4
6-10 г.	587	181	30,8	344	100	29	243	81	33,3
11-15 г.	500	131	26,2	257	55	21,4	243	76	31,3
16-20 г.	504	145	28,7	263	67	25,5	241	78	32,4
21-25 г.	466	100	21,5	220	37	16,8	246	63	25,6
26-30 г.	507	107	21,1	227	42	18,5	280	65	23,2
31-40 г.	961	189	19,6	494	109	22	467	80	17,1
41-50 г.	730	117	16	374	55	14,7	356	62	17,4
51-60 г.	751	98	13	387	47	12,1	364	51	14
61 г. +	995	128	12,8	519	64	12,3	476	64	13,4
Общо	7879	1802	22,8	4220	923	21,8	3659	879	24

При разпределението на anti CMV IgM позитивните индивиди според възрастта установихме серологични данни, свидетелстващи за остра инфекция в 20.5% (95% CI: 17.3- 23.7) от децата във възрастова група 0 – 6 м. Процентът на anti CMV IgM позитивните индивиди нараства на 36.7% (95% CI: 31.3- 42.1) във възрастовата група 7м. - 1г., и достига 38.4% (95% CI: 35.3- 41.5) във възрастова група 2 г. - 5 г. След тази възрастова група относителният дял на лицата със серологични данни за остра активна инфекция постепенно намалява, достигайки 30.8% (95% CI: 27.1- 34.5) във възрастова група 6 г. – 10 г., 26.2% (95% CI: 22.4- 30.1) - във възрастова група 11 г. – 15 г., 28.7% (95% CI: 24.8- 32.7) – във възрастова група 16 г. – 20 г., 21.5% (95% CI: 17.8- 25.2) – във възрастова група 21 г. – 25 г., 21.1% (95% CI: 17.6- 24.7) – във възрастова група 26 г. – 30 г., 19.6% (95% CI: 17.1- 22.1) – във възрастова група 31 г. – 40 г., 16% (95% CI: 13.3- 18.7) – във възрастова група 41 г. – 50 г., 13% (95% CI: 10.6- 15.4) – във възрастова група 51 г. – 60 г. и 12.8% (95% CI: 10.7- 14.9) – във възрастова група ≥ 61 г.

Полово-свързана характеристика на острите CMV инфекции

При разпределение на пациентите по пол установихме серологични данни за остра активна инфекция (anti CMV IgM позитивност) в **21.8%** (95% CI: 19.14 - 24.46, n=923) от изследваните мъже и в **24%** (95% CI: 21.18 - 26.82, n=879) от изследваните жени (таблица 3). Въпреки по-малкият брой жени участнички в проучването, относителният дял на острите инфекции е по-висок от този на мъжете. Прави впечатление, че във всички възрастови групи дялът на жените с данни за остра инфекция е по-висок от този на мъжете, с изключение на възрастова група 0 – 6 месеца (графика 2).

Графика 2. Разпределение на anti CMV IgM позитивните индивиди в зависимост от пола и възрастта (първа колона - мъже; втора колона - жени).



Като обща тенденция според нашите данни, серопревалентността в изследваната популация се увеличава с нарастване на възрастта и едновременно с това намалява дялът на острите активни CMV инфекции. Значителен дял – 25.9% (95% CI: 23.1- 28.7) от децата в нашето проучване се заразяват първично с вируса в първата година след раждането, като манифестират присъствие на anti CMV IgM антитела. Въпреки данните за сравнително висока серопревалентност във възрастова група до 6 месечна възраст, серологични данни за остра инфекция установихме в 20.5% от децата. Данните надхвърлят 100% поради присъствието и на двата типа антитела при част от децата. Дялът на децата с лабораторни данни за остра първична инфекция продължава да расте в следващите възрастови групи (7м. - 1г. - 36.7% и 2 г. - 5 г. - 38.4%). Нашите данни показват, че първичното заразяване с CMV се осъществява основно до 5 годишна възраст при около 1/3 от децата (32.26%).

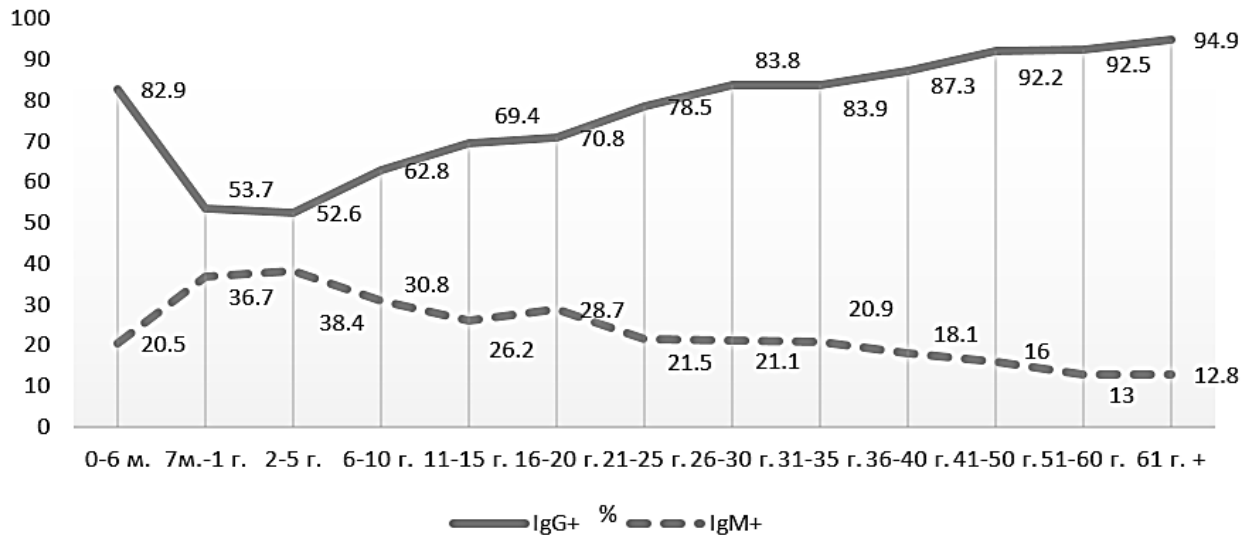
Дялът на децата, които се инфектират с CMV през първата година от живота е директно свързан със серопревалентността на жените в детеродна

възраст и с дела на майките, които кърмят. В страните, където кърменето е широко разпространено и мнозинството от майките са серопозитивни, като южна Европа, региони от Азия, Африка и Латинска Америка, повече от 50% от новородените се заразяват с CMV в първата година от живота (Stagno S 1982 NEJM). Според нашите резултати относителният дял на децата със серологични данни за остра инфекция сравнително рязко се увеличава във възрастова група 7 м. – 1 г., като достига 36.7% (95% CI: 31.3- 42.1), вероятно след изчерпване на пасивните майчини антитела и вследствие на постнатално реинфектране. Свързваме този факт с ниската информираност на родителите за начините на предаване на вируса и широко разпространените практики за целуване на бебетата по устата, както и храненето с общи прибори. Това позволява трансмисия на вируса с орофарингеалните секрети и налага необходимост от повишаване на здравната култура на младите родители и лицата, заети с отглеждането на бебетата. Спазването на строги хигиенни правила е от изключителна важност за превенция на ранното заразяване.

Данни за най-висок относителен дял на първично заразяване с CMV има във възрастова група 2 г. - 5 г. (38.4%, 95% CI: 35.3- 41.5) (табл. 3, графика 2). Според нас, в Североизточна България, най-масовото първично заразяване с вируса се осъществява в тази възрастова група. Това е периода, когато децата постъпват в детски колективи и на тази възраст нямат утвърдени хигиенни навици. Нашите данни съответстват на тези, получени от други автори (De Mello AL 1996) и потвърждаващи решаващата роля на високата здравна култура на родителите и възпитателите в детските заведения за формиране на хигиенни навици на малките деца.

Сравнителен анализ на резултатите от приложението на anti CMV IgG и anti CMV IgM.

Графика 3. Относителен дял на anti CMV IgG и anti CMV IgM позитивността в зависимост от възрастта.



При сравнителен анализ на данните от приложението на двата специфични серологични маркера установихме най-голям относителен дял - 38.4% (95% CI: 35.3- 41.5) на остри първични инфекции във възрастова група 2 г. -5 г., като в същото време в тази възрастова група установихме най-нисък дял - 52.6% (95% CI: 49.4- 55.7) на anti CMV IgG позитивни лица. Данните са илюстрирани на графика 3 с отличителен „X“ образен модел в тенденциите. Можем да кажем, че зависимостта между дела на anti CMV IgG и IgM позитивните индивиди във всяка възрастова група е обратно пропорционална. Колкото е по-висок дялът на anti CMV IgG позитивните индивиди, толкова е по-нисък дела на anti CMV IgM позитивните индивиди в съответната възрастова група. Двете графики се доближават най-много във възрастовата група 2 г. - 5 г. и показват, че децата се заразяват с вируса основно по хоризонтален път в ранна детска възраст. При преглед на разпространението на лицата с данни за остра инфекция в следващите възрастови групи установихме незначително повишаване относителния дял на позитивните лица във възрастова група 16 г. – 20 г., сравнено с тази на лицата във възрастова група 11 г. – 15 г. Вероятно тук се включва и механизма на предаване на инфекцията с интимен контакт – целувка и полов контакт.

Въпреки това, нашите данни показват, че първичното заразяване с CMV се осъществява предимно в ранна детска възраст и не бележи съществен втори пик в юношеството. Относителният дял на лицата със серологични данни за остра инфекция в следващите възрастови групи намалява, но средно около 14% от лицата над 40 годишна възраст имат серологични данни за активна инфекция. Можем да предпологаме, че това се дължи на реактивация на вирусната инфекция и/или реинфекция.

4.1.2. Сравнителен анализ на CMV серопревалентността при жени в детеродна възраст и деца до 6 месечна възраст.

За по-пълнен анализ на установеното от нас заразяване в неонаталния и ранен постнатален период и конкретизиране ролята на CMV, анализирахме данните за децата до 6 месечна възраст в сравнителен аспект с тези на жените в детеродна възраст.

Описание на извадката:

В ретроспективното проучване са включени 1612 жени в детеродна възраст, дефинирана според СЗО в диапазон 15 г. - 49 г. Средната възраст на жените включени в това проучване е 30.55 г. (SD \pm 9.75).

Проучени са 614 предимно хоспитализирани деца, с различна клинична симптоматика, на възраст от 1 ден до 6 месеца, средна възраст 2 месеца. Децата са насочени за изследване в Лаборатория по Вирусология на МБАЛ “Света Марина“ гр. Варна от лекуващите ги неонатолози и педиатри. CMV инфекцията не може да се изключи от съображение поради широката гама съпътстващи симптоми и тяхната неспецифичност. Делът на момчетата е преобладаващ в проучването - 369 (60.1%, 95% CI: 56.23 - 63.97) са момчета и 245 (39.9%, 95% CI: 36.03 - 43.77) са момичета. Най-висок относителен дял имат децата в неонатална възраст (до 28-ми ден след раждането).

Разпределението на децата по възраст е както следва:

187 деца в неонатална възраст (30.45%, 95% CI: 26.81 - 34.09),
162 деца на 1 месец (26.38%, 95% CI: 22.89 - 29.87),
95 деца на 2 месеца (15.47%, 95% CI: 12.61 - 18.33),
73 деца на 3 месеца (11.89%, 95% CI: 9.33% - 14.45),
28 деца на 4 месеца (4.56%, 95% CI: 2.91 - 6.21),
36 деца на 5 месеца (5.86%, 95% CI: 4 - 7.72) и
33 деца на 6 месеца (5.37%, 95% CI: 3.59 - 7.15)

Резултати и обсъждане:

От изследваните 1612 жени в детеродна възраст, 1362 (84.5%) са anti CMV IgG позитивни, като средната им възраст е 31.29 г. (SD±10). Останалите 250 жени (15.5%) в детеродна възраст са неинфектирани, като тяхната средна възраст е 26.48 г. (SD±9.16), което е с почти 5 години по-малка възраст от тази на инфектираните.

Установената от нас обща серопозитивност при бебетата до 6 месечна възраст (82.9%, 95% CI: 79.9 - 85.9) кореспондира с получените данни за инфектираност (84.5%, 95% CI: 82.7 - 86.3) на жените в детеродна възраст между 15 и 49 години (табл. 4). При използването на T-test за сравнение между двете независими групи получихме $p=0.81614$, което не показва статистически значима разлика.

Таблица 4. Сравнителен анализ на резултатите от изследване серопревалентността при жените в детеродна възраст и децата до 6 месечна възраст.

	Общ брой изследвани (n)	Брой anti CMV IgG +	%	Доверителен интервал 95%
Жени 15г.-49 г.	1612	1362	84.5	82.7 - 86.3
Бебета 0-6 м.	614	509	82.9	79.9 - 85.9

Тъй като не открихме предходни проучвания, дефиниращи заразеност само сред жени в детеродна възраст в България, не можем да сравним точно нашите данни. При изследване на лица (общо мъже и жени) в репродуктивна възраст, средната серопозитивност в реакция свързване на комплекта (РСК) е била 72.15%, а в ELISA - 85.83% (Иванова Л 2000). По-ниския установен процент при това изследване в РСК, вероятно се дължи на факта, че проучването обхваща и мъжете, които като цяло имат по-ниски нива на заразеност или на по-слабата чувствителност на теста. В ELISA получените резултати не показват статистически значима разлика в двете проучвания. Все пак данните не могат да се сравняват директно, тъй като са използвани различни целеви групи – жени и лица в репродуктивна възраст. От проведения от нас ретроспективен анализ стана ясно, че има разлики в серопревалентността на половете, особено голяма и статистически значима

в сексуално активните възрастови групи 21г.- 30г. ($p < 0.05$).

В нашата страна не е прието бременни жени и такива, възнамеряващи да забременеят да бъдат тествани рутинно за инфектираност с CMV. Значителната серопревалентност, която установяваме в тази важна група изследвани, може да има дълбоки ефекти върху майчино-феталните инфекции, вследствие реактивация на инфекцията по време на бременността, или реинфекция с нов вирусен щам.

Също важен проблем се оказва не малкият дял неинфектирани жени в детеродна възраст, който установяваме, а именно 15.5%. Това поставя въпроса за възможността от първична майчина инфекция по време на бременността, която според литературата е с по-голям потенциал за трансмисия и развитие на тежки фетални увреждания. В подкрепа на споменатото по-горе, нашето проучване показва, че 32.4% от жените между 16 г. и 20 г., и 25.6% от жените между 21 г. и 25 г. имат серологични данни за активна инфекция (таблица 3). Това изисква внимателно отношение към бременните жени особено в по-млада възраст и включва скрининг за определяне серологичния статус на бременните жени във всички случаи, а не само при доказани или предшестващи проблемни бременности. Полагането на повече усилия в посока профилактика е особено важно за превенция на усложненията за плода в резултат на първична майчино-фетална инфекция.

Отражението на предхождаща латентна и остра първична CMV инфекция върху развитието на плода и новороденото дете според различните изследователски екипи е различно и понякога противоречиво. Според италиански и бразилски автори, поради високата CMV серопревалентност на жените в детеродна възраст, трансмисия на вируса към плода се случва реално по-често при имунни жени, претърпели реактивация на собствения щам или реинфекция с нов щам, довеждащо до конгенитална инфекция (Varbi M 2006, De Vries JJ 2013) Според нашите данни за CMV серопревалентността на жените в детеродна възраст, общия риск за конгенитална инфекция е теоретично значително по-висок при случаите на първична майчина инфекция. В нашата проучвана популация, 15.5% от жените в детеродна възраст са неинфектирани и чувствителни на първична инфекция, което комбинирано с факта, че в този случай риска за трансмисия към новороденото е около 40% (Stagno S 2006), дава общ популационен риск от 6.2%. Оценявайки риска от конгенитална инфекция след реактивация на вируса през бременността на около 1% (Stagno S 1982)

и вземайки предвид че 84.5% от жените в детеродна възраст в нашата проучвана популация са CMV IgG позитивни, общия популационен риск за CMV трансмисия към плода на имунните майки е 0.8%, което е приблизително 8 пъти по-малко, отколкото след потенциална първична майчина инфекция (табл. 5).

Таблица 5. Хипотетичен популационен риск за вертикална трансмисия при неинфектирани (n=250) и инфектирани жени (n=1362) в детеродна възраст в проучваната популация.

		Изчислен риск за вертикална трансмисия	Популационен риск
Неинфектирани 15.5%	жени-	40%	6.2%
Инфектирани 84.5%	жени-	1%	0.8%

В съответствие със заразеността на своите майки, 82.9 % от децата до 6 месеца в нашето проучване бяха anti CMV IgG позитивни най-вероятно поради пасивна трансмисия на anti CMV IgG. Ако не настъпва ново заразяване, би следвало пасивно преминалите майчини антитела да намаляват постепенно и да не се откриват към 6 месечна възраст на детето. За да проследим тази тенденция разделихме децата в 3 възрастови групи с еднакъв фиксиран диапазон от месеца: 0 до 2 месеца, 3 до 4 месеца и 5 до 6 месеца. Резултатите показват тенденция за спад от 86.7% до 68.1% (табл. 6).

Таблица 6. Сравнителни резултати от изследването на деца до 6 месечна възраст (n=614) за определяне на anti CMV IgG и IgM позитивност, групирани в двумесечни интервали.

Възраст	Брой	Anti CMV IgG+	%	95% CI	Anti CMV IgM+	%	95% CI
0-2 м.	444	385	86.7	83.5-89.8	72	16.2	12.7-19.6
3-4 м.	101	77	76.2	67.8-84.5	34	33.6	24.3-42.8
5-6 м.	69	47	68.1	57.1-79.1	20	28.9	18.2-39.6
Общо	614	509	82.9	79.9-85.9	126	20.5	17.3-23.7

При предходно проучване в България, сред случайно подбрани новородени, средната серопозитивност в реакцията свързване на комплекта е установена в 78.51% и достига 21.35% при децата на 6 месечна възраст, отразявайки постепенната загуба на пасивните майчини антитела. При изследване в ELISA серопозитивността при новородените е била 84.44% и 35.6% при децата на 6 месечна възраст (Иванова Л 2000). Различията, установени от нас отразяват спад в серопозитивността от 86.7% при новородените деца до 68.1% при децата на 6 месечна възраст, и вероятно се дължат на различния профил на извадката. В настоящото проучване са включени предимно хоспитализирани деца, при които ролята на CMV не може да се изключи, а не случайно подбрани деца. Различията могат да произтичат и поради нееднаквата чувствителност на различните използвани тестове.

Заразяването с CMV започва в повечето случаи след изчерпване на пасивните майчини антитела, и при част от децата, в зависимост от първоначално полученото количество от техните майки се случва в този възрастов диапазон. Задържащият се висок относителен дял на серопозитивни деца на 5-6 м., предполага насложил се инфекция в ранния кърмачески период, за което говори и сравнително високият относителен дял на anti CMV IgM позитивните деца (28.9%). Заразяването с вируса често се осъществява посредством целувка и с кърменето, но високият относителен дял на остри инфекции във възрастова група 2 м. – 5 м., е възможно да се дължи на факта, че въпреки новите тенденции за хранене на децата след навършване на 6 месечна възраст, все пак за голяма част от тях храненето започва на 3 м. - 4 м. В този смисъл изказваме предположение, че ролята могат да оказват вредните навици на майките да облизват бибероните и приборите на децата, с цел да ги предпазят от „бактериални инфекции“ и дори да сдъвкват храната им. Високият процент anti CMV IgG серопозитивни деца (68.1%) към 6 месечна възраст (табл.6) може да се дължи на факта, че специфичните антитела към този вирус от двата типа се появяват почти едновременно и могат да отразяват настъпило междуременно ново ранно заразяване с битов контакт или на последици от интранатално заразяване, което протича преимуществено безсимптомно при здрави доносени новородени, но би могло да доведе до увеличаване на количеството на антителата.

Поради възможността за връзка на клиничната симптоматика с CMV инфекция и суспектността за конгенитална или ранна постнатална

инфекция, конкретизираме получените данни за децата до 3 месечна възраст.

Общо изследваните деца на възраст от 1 ден до 3 месеца са 517. Изследването е извършено в единична серумна проба. Момчетата съставляват по-голям дял 60.35% (95% CI: 56.13 - 64.57, n=312) от изследваните. Момичетата са 39.65% (95% CI: 35.43 - 43.87, n=205). Новородени в неонаталния период (0 - 28 дни) са 187 (36.17%, 95% CI: 32.03 - 40.31). Деца на възраст 1 м. - 3 м. са 330 (63.83%, 95% CI: 59.69 - 67.97). Децата са с различна клинична симптоматика, при която CMV инфекцията не може да се изключи особено в неонаталния период и до 3 месечна възраст, поради по-продължителното персистиране на anti CMV IgM антителата след първично заразяване.

Резултати и обсъждане:

От общо изследвани 517 симптоматични деца до 3 месечна възраст, 97 (18.8%, 95% CI: 15.4 - 22.2) бяха anti CMV IgM позитивни и 420 (81.2%, 95% CI: 77.8 - 84.5) бяха anti CMV IgM негативни. Съответно, 438 (84.7%, 95% CI: 81.6 - 87.8) бяха anti CMV IgG позитивни и 79 (15.3%, 95% CI: 12.2 - 18.4) бяха anti CMV IgG негативни. От anti CMV IgM позитивните деца, 91 бяха anti CMV IgG позитивни (17.6% от всички, 95% CI: 14.3 - 20.9), докато от anti CMV IgM негативните деца, 347 (67.1%, 95% CI: 63.1 - 71.2) бяха anti CMV IgG позитивни (табл. 7). Децата бяха разпределени в две групи: група А (0 м. – 1 м.) (табл. 8) и група В (1 м. – 3 м.) (табл. 9).

Таблица 7. CMV серологичен статус при деца 0 м. - 3 м., n=517.

IgM+/IgG-	IgM+/IgG+	IgM-/IgG+	IgM-/IgG-
n=6	n=91	n=347	n=73
(1.2%,	(17.6%,	(67.1%,	(14.1%,
CI: 0.3-2.1)	CI: 14.3-20.9)	CI: 63.1-71.2)	CI: 11.1-17.1)

Таблица 8. CMV серологичен статус при новородени 0 м. - 1 м., n=187 (група А).

IgM+/IgG-	IgM+/IgG+	IgM-/IgG+	IgM-/IgG-
n=2	n=10	n=147	n=28
(1.1%,	(5.3%,	(78.6%,	(15%,
CI: 0.4-2.6)	CI: 2.1-8.5)	CI: 72.7-85.4)	CI: 9.9-20.1)

Таблица 9. CMV серологичен статус при деца 1 м. - 3 м., n=330 (група В).

IgM+/IgG-	IgM+/IgG+	IgM-/IgG+	IgM-/IgG-
n=4	n=81	n=200	n=45
(1.2%, CI: 0.03-2.4)	(24.5%, CI: 19.9-29.1)	(60.6%, CI: 55.3-65.9)	(13.6%, CI: 9.9-17.3)

В група А, новородените деца (0 м. - 1 м.), 12 (6.4%, 95% CI: 2.9 - 9.9) бяха anti CMV IgM позитивни (табл. 8). Данните свидетелстват за конгенитална CMV инфекция, както вече беше отбелязано. В група В, на децата на възраст 1 м. - 3 м., 85 (25.8%, 95% CI: 21.1 - 30.5) бяха anti CMV IgM позитивни (табл. 9). Като се има предвид, че anti CMV IgM антителата може да персистират в тази група симптоматични деца не може да се изключи конгенитална инфекция.

Десет от 12 anti CMV IgM позитивни новородени бяха anti CMV IgG позитивни също (5.3%, 95% CI: 2.1 - 8.5), докато anti CMV IgG негативни бяха само 2 (1.1%, 95% CI: 0.4 - 2.6) (табл. 8). В група В, 81 (24.5%, 95% CI: 19.9 - 29.1) бяха anti CMV IgM и IgG едновременно позитивни и 4 (1.2%, 95% CI: 0.03 - 2.4) бяха anti CMV IgG негативни и anti CMV IgM позитивни (табл. 9).

Конгенитална CMV инфекция се доказва недвусмислено чрез детекция на anti CMV IgM или CMV-DNA в телесни секрети (урина, слюнка) или серум/плазма на новороденото в първите 21 дни след раждането (Mosca F 2007). След това време е трудно лабораторното разграничение на конгениталната от ранно постнатално придобита инфекция, но разбира се може да се изкаже клинично обосновано предположение за типа на инфекцията. Предхождащи данни за Североизточна България при случайно подбрани новородени деца свидетелстват за честота на вродената CMV инфекция в 1.11% (Иванова Л 1996). Според цитирани данни в литературен обзор, пет годишни проучвания в ДУПБ "Царица Йоана", установяват признаци за конгенитална цитомегалия при 2.4% от родените деца (Дундаров С 2008). В нашето проучване 6.4% от изследваните симптоматични деца в неонатална възраст и 25.8% от децата на възраст 1 м. – 3 м., средно (18.8%, n=517) бяха anti CMV IgM позитивни, което е индикатор за остра инфекция.

Присъствието на специфични anti CMV IgG показва най-общо казано

стара инфекция или трансплацентарно преминали майчини антитела, което е пряко свързано със серопозитивността на популацията. Количеството на антителата на новороденото винаги трябва да се анализира съвместно с резултатите на майката и срока, до който е износена бременността. Майчините антитела защитават фетуса и новороденото от тежки форми на CMV инфекция. Едно бразилско проучване изследва ефикасността на плацентарния трансфер на тотални майчини anti CMV IgG антитела и на неутрализиращи антитела в различни гестационни възрасти. То е проведено сред 182 здрави CMV серопозитивни бременни жени и техните 196 деца (родени от 28 до 40 г.с.), доказано неинфектирани с CMV чрез отрицателен резултат от CMV-DNA детекция в урина. Авторът прави заключение, че плацентарният трансфер на естествено придобити майчини неутрализиращи и тотални anti CMV IgG антитела е еднакво ефикасен след 34 г.с. Преди това се трансферират предимно неутрализиращите антитела, които достигат неонаталния серум в 99% при родените преждевременно деца (Mussi-Pinhata MM 2003).

Според нашите данни от ретроспективен анализ 84.5% от жените в детеродна възраст са инфектирани с CMV. Високата майчина серопозитивност може да играе роля на рисков фактор за конгенитална CMV инфекция. Подобни резултати са получени и в други Европейски страни (De Vries JJ 2013, Barbi M 2006). При едно проучване, проведено във Финландия е установено, че мнозинството от симптоматичните конгенитални инфекции (54%) се дължат именно на непървична майчина инфекция, 27% се дължат на майчина първична инфекция, случила се в първия триместър или около концепция и 19% по време на втория или третия триместър (Puuhakka L 2017). В съответствие със заразеността на майките си, 84.7% от децата до 3 месеца, включени в нашето ретроспективно проучване бяха anti CMV IgG позитивни.

CMV е най-честата причина за конгенитална инфекция на новороденото с докладвана честота от различни региони по света от 0.2 до 2.5% (Vorpana SB 2011). Предходни данни от нашия регион показват честота от 1.11% в ELISA (anti CMV IgM позитивни) в случайно подбрани новородени (Иванова Л 1996). Според бразилски автори конгенитална CMV инфекция е потвърдена в 1.08% от скринирани 8 047 новородени деца (Mussi-Penhata MM 2009). Според литературата честотата на конгениталната CMV инфекция, определена най-често с тестване за вирусна

ДНК на изсушени кръвни петна (DBS-test) или урина в Европейските страни се движи между 0.18 – 0.48% (Barbi M 2006, Halwachs-Baumann G 2000). В едно проучване вродена CMV инфекция е била идентифицирана с проспективен скрининг от клиничен материал урина в 4 (0.14%) от 2 841 новородени деца за близо 2 годишен период в Словения (Paradiž KR 2012). Резултатите от провеждани скринингови проучвания и изследването на симптоматични новородени в популация с висока CMV серопревалентност осигуряват допълнително доказателство в подкрепа на това, че конгениталното CMV заболяване или свързани с него разстройства се случват с по-висока честота именно в такива популации. Новородени с изразена симптоматична конгенитална инфекция развиват по-често усложнения и трайни последици, от тези идентифицирани случайно на скрининг (Dreher MA 2014).

Асимптоматичните новородени с конгенитална CMV инфекция, доказана при скрининг, обикновено имат по-леки нарушения от тези, които са имали клинични симптоми при раждането. Проспективно проучване показва, че приблизително половината от децата родени със симптоматична инфекция ще развият трайни последици в бъдеще (Vorpana SB 2013). Вродената CMV инфекция обикновено е асимптоматична при раждането с кумулативни ефекти върху заболяемостта и смъртността в последствие, както установява едно 17 годишно проучване сред 777 смъртни случаи в САЩ, асоциирани с конгенитална CMV инфекция (Bristow BN 2011).

Нашите данни показват, че 12/187 (6.4%) от новородените деца с клинични симптоми (Група А) имат anti CMV IgM, и с голяма вероятност показват данни за конгенитална инфекция. Според друго проучване симптоми са наблюдавани в 11% от CMV инфектираните новородени и 42% от тях са имали трайни последици (Townsend CL 2013).

Изследваните симптоматични деца в Група В (1 м. - 3 м.) са вероятно интранатално или ранно постнатално инфектирани. Те са anti CMV IgM позитивни в 25.7% – 4 пъти по-висока честота от тази, констатирана при новородените деца от група А. Това кореспондира с предходни литературните данни, които говорят за 30% участие на CMV в случаите с преждевременно раждане, вродени аномалии и продължителна жълтеница в региона (Иванова Л 2000). Според литературата повечето доносени новородени са асимптоматични, защото имат майчини преминали anti CMV IgG антитела, които значително модифицират конгениталната инфекцията

и правят признаците сравнително меки от клинична гледна точка, а 15% - 20% от инфектираните недоносени деца, които не получават пълния набор майчини антитела, могат да развият клинично CMV заболяване (Stehel EK 2005). В друго проучване перинатално или ранно постнатално инфектиране е доказано в 22.1% от изследваните недоносени новородени деца (Mussi-Penhata MM 2004). Това поставя недоносеността като един от основните признаци при които активно трябва да се търси CMV инфекция. В популации с висока CMV серопревалентност, честотата на перинаталните инфекции е висока, както е в нашето проучване. Кърменето и продължителността му също допринасят за това. Риск съотношението (1 м. - 3 м. / 0 м. - 1 м.) е 4.0 и след изчисление на вариабилността на пробите, възрастта може да се счита като фактор, увеличаващ риска от остра CMV инфекция след раждането от 2.2 до 7.1 пъти ($\chi^2=29.3$; $p<0.05$). Контрастиращо не беше намерена никаква значителна разлика в anti CMV IgG позитивността между новородените деца и децата на възраст 1 м. - 3 м. – 84% и 85% съответно ($\chi^2=0.1$; $p\text{-value} = 0.7$).

Провеждането на скрининг за CMV инфектираност на бременните жени в България не е рутинна практика. Но данните, които получихме в това наше ретроспективно проучване силно насочват към необходимостта от провеждането на такъв. Препоръчваме скрининг за anti CMV IgM / IgG и IgG авидност на всички бременни, за да се идентифицират рисковите групи и за да се подобрят диагностичните възможности, което е предпоставка за избягване на риска от трансмисия на вируса към плода и тежките и дълготрайни последици на конгениталната, интранаталната и ранна постнатална CMV инфекция (Halwachs-Baumann G 2000).

4.1.3. Ретроспективни серологични проучвания на CMV инфекцията при пациенти с онкохематологични заболявания и вероятна имуносупресия поради основното заболяване.

Изследвани са 591 деца, хоспитализирани в Клиниката по Детска онкохематология и 637 възрастни пациенти, хоспитализирани в Клиниката по Хематология на МБАЛ “Св. Марина“ гр. Варна. Клиничните диагнози на включените в прегледа пациенти са: МДС, Апластична анемия, Агранулоцитоза, БХ, НХЛ, ОЛЛ, ХЛЛ, ОМЛ, ХМЛ, Мултиплен миелом. Тестването е извършено в единична серумна проба.

Децата до 1 г. бяха разделени в 3 възрастови групи: до 3 м., 4 - 6 м. и 7м. - 1г. Пациентите на възраст от 2 г. до 89 г. бяха разделени в 18 възрастови групи през равен 5 годишен интервал.

Резултати и обсъждане:

Сумарният дял на заразеност на децата с онкохематологични заболявания (n=591) е 66% (95% CI: 62.18 - 69.82), а дела на острите или реактивирани инфекции е 27% (95% CI: 23.42 - 30.58). Тези относителни дялове почти не се отличават от съответните такива, установени в ретроспективното проучване на деца с друга клинична симптоматика в същите възрастови групи, съответно за носителство на anti CMV IgG (64.8%) (p=0.67032) (табл.1) и anti CMV IgM (30.64%) (p= 0.03643) (табл. 3).

При разпределение по възрастови групи обаче, във всяка възрастова група, с изключение на бебета до 6 месечна възраст, децата с онкохематологични заболявания показват малко по-висока степен на CMV заразеност (anti CMV IgG+). В трите възрастовите групи до 1 г. получихме също така по-висок дял на остри или реактивирани инфекции (anti CMV IgM+). Това касае децата на възраст 0 м. - 3 м., с данни за остра инфекция (31%), тези на възраст 4 м. - 6 м. (50%) и тези на възраст 7м. - 1 г. (38%). Общо 36.5% (34/93) от децата до 1 г. с онкохематологични заболявания са anti CMV IgM позитивни в сравнение с 25.8% (238/919) от децата до 1 г. с друга клинична симптоматика. Разликата не е статистически значима, p=0.97866.

Възможно е инфектирането в твърде ранна възраст, при незрялост на имунната система, да е причина за по-продължителното носителство на anti CMV IgM антителата и това да води до по-бавното овладяване на инфекцията и преминаване в латентна фаза. Допускаме евентуално по-често съпътствие на CMV инфекцията при болните с онкохематологични заболявания и участие в патогенезата на различни видове тумори. Отдавна се търси връзката между CMV инфекцията и някои ракови заболявания, тъй като вирусът засяга голям дял от населението асимптоматично и експресира множество протеини, които му позволяват да избегне имуносистемния контрол (Powers C 2008). CMV също инфектира повече от 90% от глиобластомите, туморите на простатата, гърдата и дебелото черво, в които се смята, че промотира туморен растеж и вероятно туморогенеза (Cobbs CS 2002, Harkins L 2002, Samanta M 2003). Но ролята му в туморогенезата е все още недостатъчно проучена и изяснена, въпреки че се събират все повече

доказателства за онкомодулаторния му ефект (Michaelis M 2009 MMI, Soroceanu L 2011).

Ние анализирахме ретроспективно CMV серопревалентността сред възрастни пациенти с онкохематологични заболявания, както и честотата на реактивация на инфекцията според серологичните данни. Делът на инфектираните (anti CMV IgG позитивни) възрастни пациенти с онкохематологични заболявания е 93% (95% CI: 91.02 - 94.98) и надвишава с 4% заразеността в общата популация от същите възрастови групи (89%), въпреки, че разликата не е статистически значима ($p=0.99977$). Тази зависимост се отнася за всяка една от възрастовите групи, които сме оформили за проучването.

При възрастните пациентите с онкохематологични заболявания, позитивен anti CMV IgM резултат, говорещ за остра или реактивирана инфекция получихме в 16% (95% CI: 13.15 - 18.85) от изследваните. Във възрастови групи 31 г. - 35 г. и 36 г. - 40 г. получихме завишен спрямо общата популация дял на острите или реактивирани CMV инфекции (anti CMV IgM позитивни), съответно 25%, 32% срещу 19.6%, 16%. От ретроспективното проучване CMV инфектираността сред възрастните пациенти с онкохематологични заболявания е изключително висока (93%) и не бива да се negliжира. Заради широката употреба на имуносупресивни медикаменти при пациентите с онкохематологични заболявания, CMV инфекцията е една от най-честите причини за заболяемост и смъртност в тази рискова група (Piukovics K 2017).

4.1.4. Ретроспективни серологични проучвания на CMV инфекцията при пациенти, живеещи с HIV инфекция.

Анализирахме резултатите от изследването на 93 лица, живеещи с HIV инфекция, хоспитализирани в Първа инфекциозна клиника на МБАЛ „Св. Марина“ гр. Варна или новооткрити реактивни в ELISA пациенти, потвърдени като серопозитивни от “Националната референтна HIV потвърдителна лаборатория” гр. София. Лицата са тествани в единична серумна проба.

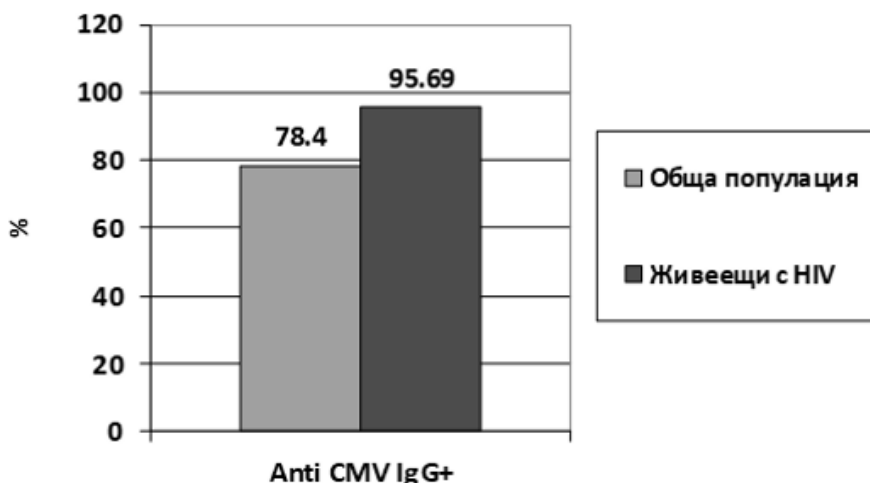
Участниците в проучването бяха на възраст от 2 г. до 65 г., средна възраст 37.22 г. ($SD\pm 11.32$), от които 75.27% (95% CI: 66.5 - 84.04, $n=70$) са мъже и 24.73% (95% CI: 15.96 - 33.5, $n=23$) са жени.

Резултати:

От изследваните 93 HIV инфектирани пациента 89 (95.69%, 95% CI: 91.56 - 99.82) бяха anti CMV IgG позитивни.

При 19 (20.43%, 95% CI: 12.24 - 28.62) от тях получихме данни за остра или реактивирана инфекция, манифестирана с anti CMV IgM позитивност, при едновременно IgG позитивен резултат. Трима (3.23%) от пациентите не показаха серологични данни за заразеност CMV (IgM, IgG отрицателни) - дете на 2 г. и двама мъже (23 г. и 29 г.). При един пациент (мъж на 27 г.), получихме серологични данни за първична CMV инфекция (anti CMV IgM положителен резултат) при anti CMV IgG отрицателен резултат.

Графика 4. CMV серопревалентност в общата популация и при лица, живеещи с HIV.



Обсъждане:

От проведения сравнителен анализ става ясно, че заразеността на лицата, живеещи с HIV инфекция, значително надвишава тази, доказана от нас в общата популация (графика 4). При сравнение на двете независими групи с използване на Z-test за сравняване на пропорции се установи, че разликата е сигнификантно значима (www.mccallum-layton.co.uk). CMV инфекцията е най-честата опортюнистична инфекция при пациенти, живеещи с HIV (Cheung TW 1999). Високият дял на коинфектираност с двата вируса може да има дълбоко отражение върху прогресията на промените в организма на пациентите и да увеличи смъртността в тази високо рискова група. В наскоро проведено проучване в Нигерия сред 250 HIV негативни и 250 живеещи с HIV лица, също се установява

статистически значима разлика в дела на CMV серопревалентността в двете проучвани групи (72.8% и 86% съответно) (Adeiza MA 2016). Подобна висока CMV серопревалентност е била докладвана при предходно проучване и сред HIV инфектирани деца (Duliege AM 1990). Следователно нашите данни съвпадат с тези от различни литературни източници, но лимитиращ фактор при проучването ни е значително по-малкия брой на включените в анализа HIV инфектирани лица.

CMV е добре познат патоген в контекста на HIV инфекцията, защото имуносупресията излага пациентите на по-голяма заплаха при съпътстваща CMV инфекция. След въвеждането и успехите на антиретровирусната терапия, клиничния и научен интерес към CMV/HIV коморбидността съвсем естествено отслабва. Клиничното представяне на CMV заболяването може да е директна последица от взаимодействието между двата вируса, или може да възникне в резултат на нарушените имунорегулаторни механизми при тези пациенти и системното възпаление (Adland E 2015). Проблемът е най-актуален, когато честотата на коинфекциите е голяма, както в нашата проучвана група (95.69%). Това изисква по-строг контрол на CMV инфекцията при тези пациенти. Според нас, прилагането на молекулярно-биологични методи на изследване, и по-специално Real time PCR, би допринесло за адекватен терапевтичен поход, особено в случаите при наличие на серологични данни за реактивация на CMV инфекцията при живеещите с HIV лица.

4.2. ПРОСПЕКТИВНИ ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ CMV ИНФЕКЦИЯТА ПРИ РИСКОВИ ГРУПИ ПАЦИЕНТИ (2016 - 2018 г.)

4.2.1. Проспективно серологично проучване на инфектираността и давността на CMV инфекцията при бременни жени.

Цел на настоящия анализ беше да определим серопревалентността при бременни жени в регион Североизточна България, както и давността на тяхната инфекция, което да ни даде възможност да оценим степента на заплаха за плода и новороденото.

Описание на извадката:

Проспективно в периода август 2016 – юли 2017 г. изследвахме 121 случайно подбрани бременни жени, в различен срок на бременността (от 5 г.с. до 39 г.с.) в единична серумна проба. Пробите отговаряха на критериите

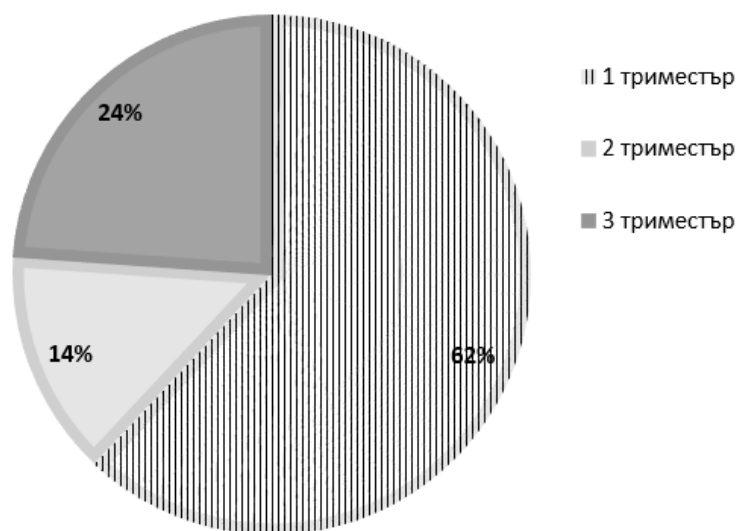
за лабораторна серологична диагностика - нехемолитични, нелипемични и неиктерични. Към момента на изследването участничките бяха клинично здрави бременни жени. При 9 от тях (7.44%, 95% CI: 2.76% - 12.12%) получихме анамнестични данни за предхождащи спонтанни аборти. Две от бременните жени съобщиха за предхождащо мъртво раждане, 2 – за предхождащ аборт по желание, 1 – за раждане на дете със синдром на Даун и 1 – за раждане на дете със синдром на Търнър.

Демографска характеристика:

Участвалите в проучването бременни жени бяха на възраст между 14г. - 41г., средна възраст 28.66 г. (SD \pm 5,88). При направената справка с данните от Националния статистически институт (www.nsi.bg) за 2016 г., установихме, че средната възраст на майката при раждане на първо дете в регион Варна е 27.9 г., а при раждане на второ дете - 29.5 г. Средната възраст на родилките за региона е 28.7 г. Това се доближава изключително много до средната възраст на бременните жени, участвали в настоящото проучване и потвърждава представителността на извадката.

Най-голям дял в проучването имат бременните жени в първи триместър от бременността (до 13 г.с.) - 62% (95% CI: 53.35 - 70.65, n=75). Бременните жени във втори триместър (14 г.с. - 27 г.с.) са 14.1% (95% CI: 7.9 - 20.3, n=17) и в трети триместър (28 г.с. - 40 г.с.) – 23.9% (95% CI: 16.3 - 31.5, n=29) (графика 5).

Графика 5. Разпределение на бременните жени в зависимост от срока на бременността.



Резултати и обсъждане:

Таблица 10. Серологичен скрининг на бременни жени за определяне на anti CMV IgM и anti CMV IgG.

ELISA тест	Позитивен резултат n (% , CI)	Негативен резултат n (% , CI)
Anti CMV IgG	105 (86.8%, 95% CI: 80.77 - 92.83%)	16 (13.2%, 95% CI: 7.17 - 19.23%)
Anti CMV IgM	12 (9.9%, 95% CI: 4.58 - 15.22%)	109 (90.1%, 95% CI: 84.78 - 95.42%)

От изследваните 121 бременни жени, 105 (86.8%, 95% CI: 80.77 - 92.83) на средна възраст 28.53 г. (SD \pm 5.88), бяха anti CMV IgG позитивни, а 16 (13.2%, 95% CI: 7.17 - 19.23), на средна възраст 29.50 г. (SD \pm 5.91), бяха anti CMV IgG негативни (табл. 10). При anti CMV IgG позитивните бременни жени доказахме наличие на специфични IgG антитела в обхват от 23 RU/ml до 323 RU/ml, като количество >22 RU/ml се счита за положителен резултат според критериите на теста. Средноаритметично установеният титър на позитивните бременни е сравнително висок - 128 RU/ml (SD \pm 61.44).

От изследваните 121 бременни жени, 12 (9.9%, 95% CI: 4.58 - 15.22) със средна възраст 27.50 г. (SD \pm 5.91) са anti CMV IgM позитивни, а 109 (90.1%, 95% CI: 84.78 - 95.42) със средна възраст 28.79 г. (SD \pm 5.84) - anti CMV IgM негативни. Позитивните за anti CMV IgM бременни жени бяха също и anti CMV IgG позитивни.

На anti CMV IgG позитивните бременни жени, проведохме допълнителен тест за определяне авидност на антителата от клас IgG. Според критериите на теста антитела с висок относителен индекс на авидност RAI $>60\%$ се считат маркер за инфекция придобита в по-далечното минало. Антителата с нисък относителен индекс на авидност RAI $<40\%$ се считат за синтезирани в последните 18 - 20 седмици преди изследването. При 104 от инфектираните бременни жени установихме високоавидни антитела (RAI $>60\%$) и само при една бременна жена получихме граничен резултат (сива зона – RAI=57%).

Детекция на anti CMV IgM при бременни жени

При 12 (9.9%, 95% CI: 4.58 - 15.22) от бременните жени получихме anti CMV IgM позитивен имунен отговор. Всички те бяха положителни и в anti CMV IgG теста. Това предполага скорошна остра инфекция, реактивация на хроничната инфекция, и/или реинфекция с нов вирусен щам. Различните предположения са свързани с различни рискове за развиващия се плод. Според приложения тест за авидност на anti CMV IgG антителата уточнихме по-голяма давност на инфекцията при тях.

При направеното от нас обследване на част от тези бременни жени по анамнестични и клинични данни установихме следното: Една от бременните жени (19 г.) съобщава за предходна бременност, завършила с аборт по медицински показания. Втората бременна жена (38 г.) съобщава за предхождащи 2 спонтанни аборта в 11 г.с. Третата бременна жена (22 г.) претърпява ранен спонтанен аборт в 7 г.с. При липса на други доказани причини, можем сериозно да подозираме ролята на CMV в тези неблагоприятия при предхождащи и настоящи бременности и евентуално по-дълго задържане на специфичните anti CMV IgM в серума на тези жени, и/или многократни реинфекции. При четвъртата бременна жена на 21 г. с anti CMV IgM позитивен резултат настъпи раждане в 38 г.с. на конгенитално CMV инфектиран плод (лабораторно потвърдено с доказване на вирусен товар в RT-PCR анализ на плазма от новороденото). Бебето беше от мъжки пол, доносено, но с ниско за гестационната си възраст тегло, затруднена адаптация и респираторни проблеми. След 10 дневно лечение с Sumavene състоянието му се подобри, започна да наддава на тегло. При петата обследвана от нас бременна жена на 32 г., настъпи раждане на клинично здрав плод. За останалите 7 бременни жени с anti CMV IgM положителен резултат нямахме обратна връзка. Според нас при всички тези случаи вероятно се касае за реактивация на латентна цитомегаловирусна инфекция на майката по време на бременността.

В резюме можем да кажем, че при проучените от нас бременни жени с позитивен anti CMV IgM отговор, спектърът на клиничния изход за плода бе твърде различен - от спонтанен аборт, раждане на конгенитално инфектиран плод, до раждане на клинично здрав плод. Тези данни поставят много етични проблеми по отношение на вземането на решение за изхода на бременността при жените с anti CMV IgM позитивен резултат. Това води и до необходимостта от разработване на диагностичен алгоритъм и провеждане

на допълнителни тестове за определяне на авидност на IgG антителата и PCR анализ на плазмени проби от бременната или на фетални проби след кордоцентеза (фетална кръв) или амниоцентеза (амниотична течност), при съгласие от страна на родителите. Времето за вземане на пробите за изследване трябва да се подбере много внимателно в такива случаи, защото твърде ранното пробонабиране крие риск от фалшиво негативни резултати. Пренаталната диагноза на конгениталната CMV инфекция, когато се основава на амниоцентеза, трябва да се направи най-малко 7 седмици след предполагаемото време на майчината инфекция и след 21 г.с. на бременността, по литературни данни. Този интервал е важен според авторите, тъй като след фетална инфекция и последващата репликация на вируса в бърбреците, за да се натрупа откриваемо количество вирус в амниотичната течност, са нужни от 5 до 7 седмици. Многократно се съобщава, че пренаталните диагностични процедури, извършени твърде скоро след началото на майчината инфекция, носят значителен риск от фалшиво отрицателни резултати (Bonalmi S 2011).

Проучването ни при бременните жени показва, че 13.2% (16/121) от тях не са се срещали с CMV (anti CMV IgM и anti CMV IgG негативни). Те са в най-висок риск за трансмисия на вируса към плода, в случай на първична инфекция в хода на настоящата бременност, което по литературни данни е около 40% (Fowler KB 1992). Средната възраст на неинфектираните бременни жени в нашето проучване е 29.50 г. (SD±5.91), което е с 1 година повече от средната възраст на инфектираните (28.53 г.). Очакваният резултат би бил те да са в по-млади, както установихме в ретроспективния анализ на жените в детеродна възраст, където неинфектираните жени са с почти 5 години по-млади от инфектираните. Но може би тук роля играе малкият брой неинфектирани жени в настоящото изследване (n=16). Две от тях - бременна жена (21 г.) в трети триместър на бременността и бременна жена (31 г.) в първи триместър на бременността, имаха анамнестични данни за няколко спонтанни аборта, предшестващи настоящата бременност, поради което се търсеше връзка и с CMV-инфекция, но такава не се откри. В най-рисковия по-отношение на сериозни увреждания за плода първи триместър на бременността са 11 от 16-те неинфектирани бременни жени. Наличието на базов серум при тях много би улеснило диагностиката в случай на някакво бъдещо неблагоприятно или регистриране на сероконверсия в хода на настоящата бременност. Изследване на втора и трета серумни проби в

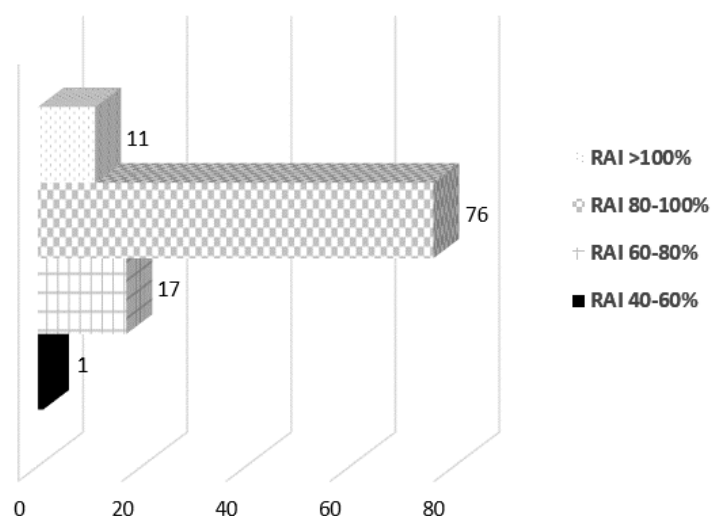
хода на бременността би било най-доброто решение, но те не потърсиха допълнителна лабораторна консултация. Такива бременни жени трябва да бъдат известени за риска от първична цитомегаловирусна инфекция в хода на настоящата бременност и вниманието им трябва да бъде насочено към хигиенно-профилактичните мерки, които е желателно да спазват, за да избегнат заразяване.

Определяне на anti CMV IgG авидност при бременни жени

Използването на ELISA тестовете за определяне на специфични антитела срещу CMV е прието в цял свят като възможност за добра първична ориентация, диагностика и представлява рутинна лабораторна практика. Присъствието на специфични anti CMV IgG в серума най-общо говори за придобита в миналото инфекция, без да може да уточни нейната давност. В нашето проучване 86.8% (105/121) от изследваните бременни жени, на средна възраст 28.53 г. (SD±5.88) бяха anti CMV IgG позитивни. Необходимостта от провеждане на тест за авидност на специфичните anti CMV IgG възникна поради високата серопревалентност, установена от нас при изследваните бременни жени и почти 10% от тях с едновременна anti CMV IgM позитивност. Давността на инфекцията е важен критерий, който може да уточни свързаните с това различни рискове за развиващия се плод и бъдещото новородено дете. Тъй като всички anti CMV IgM позитивни бременни жени имат специфични anti CMV IgG антитела, при липса на базови серуми за сравнение, скорошна остра инфекция или реактивация на хронична инфекция при тях не може да се изключи.

За да уточним давността на инфекцията при всички 105 anti CMV IgG позитивни бременни жени, проведохме допълнителен тест за авидност на антителата от клас IgG. При 104 (99.05%) жени, получихме висок относителен индекс на авидност RAI > 60%, което предполага инфекция придобита в миналото. Тези anti CMV IgG антитела са образувани минимум 18 - 20 седмици назад във времето на настоящото изследване. Само при една от инфектираните бременните жени (0.95%) получихме граничен резултат (RAI=57%) и не установихме нито една бременна с нисък относителен индекс на авидност (RAI<40%), дори и при тези, които бяха едновременно anti CMV IgM позитивни (графика б).

Графика 6. Разпределение на броя anti CMV IgG позитивните бременни жени (n=105) според RAI, изразен в проценти.



Най-голям дял 76 (72.3%) от изследваните инфектирани бременни жени имаха относителен индекс на авидност между 80% и 100%, следвани от 17 бременни (16.2%), с относителен индекс на авидност между 60% и 80% и 11 бременни (10.5%) с относителен индекс на авидност над 100% (графика 6). Само при 1 бременна жена в първи триместър на бременността (26 г.) получихме граничен резултат RAI=57%. Не установихме бременни жени с нисък относителен индекс на авидност, т.е. с данни за скорошна CMV инфекция.

Поради латенцията, следваща първичната CMV инфекция и периодичната реактивация на вируса, трансмисия на вируса към плода в хода на бременността може да е резултат на реактивирана майчина инфекция, както и на първична такава според литературата (Mussi-Penhata MM 2001, De Vries JJ 2013).

Според нови данни се предполага, че конгениталната CMV инфекция може да е имуномедирано заболяване. Оценяването на хуморалния и особено на Т-клетъчния имунен отговор могат да подобрят пренаталната диагностика. Серологични и имунологични проучвания показват, че конгенитална инфекция настъпва в присъствието на висок Th1 (IFN- γ ELISPOT) и нисък и забавен Th2 (CMV IgG Avidity) майчин отговор. Това заключение предполага, че един небалансиран майчин Th1/Th2 имунен отговор може да доведе до конгенитална CMV инфекция. Други автори

съобщават за случаи с конгенитална инфекция при променен цитокинен модел на плацентарно ниво при майката. Hamilton et al. съобщават за повишение на нивата на MCP-1 (хемокин) и TNF- α (цитокин), както в плацента от CMV-инфектирани мъртвородени, така и в хистологични материали от плацента на конгенитално инфектирани деца (Hamilton ST 2012). Според последни съобщения CMV инфекцията индуцира съществена децидуалната секреция както на IFN- γ , така и на IP-10 (Interferon inducible Protein-10), привличащ Т-клетките хемокин (Weisblum Y 2015). Смушенията в цитокиновия баланс на плацентарно и децидуално ниво могат да задействат силен Th1 имуен отговор и да благоприятстват разпространяването на вируса към фетуса, да намалят обмяната на хранителни вещества и газове към плацентата. Това в крайна сметка може да доведе до тъканна хипоксия и да обясни неврологичните аномалии, наблюдавани при симптоматични бебета. Авторите смятат, че е промененият плацентарен цитокинен модел, заедно с небалансирания Т-клетъчен отговор в периферната кръв, може да доведе също до фокални лезии в плацентата, което позволява преминаването на CMV към фетуса.

Първичната майчина инфекция по литературни данни се предава по често към плода и по-вероятно може да доведе до тежки увреждания. В допълнение изглежда, че тази, която се случва в ранна гестационна възраст е с по-тежък изход за фетуса (Kenneson A 2007, Demmler GJ 1991). Освен реактивация на ендемичния вирус, реинфекция с нов вирусен щам също може да доведе до интраутеринна трансмисия, но такива събития обикновено протичат безсимптомно и идентифицирането на имунните бременни в риск е почти невъзможно (Yamamoto AY 2009).

При възникнало съмнение за първична майчина инфекция, то може да бъде потвърдено надеждно и именно това беше една от целите на нашето проучване. Златен стандарт е демонстриране на сероконверсия – anti CMV IgG негативен резултат с последващ anti CMV IgG позитивен резултат в хода на бременността. Това изисква наличие на базов серум от преди концепцията, или взет в ранните срокове на бременността. Нито една от 16-те серонегативни бременни, които установихме, не потърси повторно лабораторно изследване, което предполага, че не са настъпили никакви съмнения за първична CMV инфекция в хода на тези бременности. Когато обаче такъв базов серум не е наличен, едновременното установяване в еднинична серумна проба на специфични IgM и IgG, насочва към

заклучението за скорошна първична инфекция (Lazzarotto T 1998). Но реактивен anti CMV IgM отговор може да бъде намерен и в случаи с непървична инфекция. Тези антитела могат да персистират месеци след първичната инфекция, така че не предсказват надеждно риска от конгенитална инфекция (Stagno S 1985). Ние установихме 12 (9.9%, 95% CI: 4.58 - 15.22) бременни жени с реактивен anti CMV IgM отговор в присъствие на anti CMV IgG. Такъв резултат трябва да бъде оценен по-нататък с тест, определящ зрелостта (авидността) на CMV IgG антителата, както процедирахме. Ниско авидните антитела (тези, които се свързват по-нестабилно с таргетния им протеин) са продуцирани в първите 18 - 20 седмици след първичната инфекция (Grangeot-Keros L 1997). Последващият процес на зреене генерира високоавидни антитела, които се свързват здраво с таргетния си протеин. Високоавидните антитела изключват скорошна първична инфекция и когато са установени преди 16 г.с. на бременността показват значително нисък риск от конгенитална инфекция (Lazzarotto T 1999). Обратно, установяването на нискоавидни антитела, съвместно с реактивен anti CMV IgM резултат, насочват към диагнозата майчина първична инфекция в предходните 3 - 4 месеца и идентифицират жените в най-висок риск да предадат инфекцията на плода (Lazzarotto T 2000 VI).

От нашето изследване се установи, че 13.2% (16/121) от бременните жени в региона са неинфектирани и в пряка опасност от развитие на първична майчина инфекция. Феталните увреди най-често възникват при майчина първична инфекция, като са по-тежки, ако заразяването е станало около концепция или в ранните срокове на бременността (Enders G 2011). Не трябва да се забравя риска от фалшиво негативен IgM, ако пробата се вземе в ранните фази на инфекцията, когато антителата още не са образувани или са под нивото на детекция на теста. Фалшиво позитивни anti CMV IgM резултати могат да бъдат намерени при пациенти с остра Epstein-Barr вирусна инфекция, при които възниква неспецифична поликлонална активация на В-лимфоцити, както и при интерференция с ревматоиден фактор и други автоимунни заболявания, или съпътстваща кортикостероидна терапия. Желателно е провеждането на Western blot анализ на anti CMV IgM реактивните проби, за да се потвърдят като такива и да се снижи риска от фалшиво позитивни резултати (Miendje Deyi Y 2000). Поради различните ефекти върху плода и новороденото дете, много важно е да се отидиференцира първична от персистентна CMV инфекция при

бременните жени, за което по настоящем anti CMV IgM, anti CMV IgG теста и авидността на IgG антителата са най-добрите методи (Lazzarotto T 2000 JP) Златният стандарт за потвърждаване на първична инфекция е доказването на сероконверсия от IgG негативен резултат към позитивен резултат. Това изисква наличие на базов серум от началото на бременността или непосредствено преди нея. Доказването само на anti CMV IgM изисква потвърждаването му с Western blot анализ и изследване в динамика за евентуална поява на антитела от клас IgG. Присъствието в една серумна проба на IgM и IgG едновременно прави необходимо тестването за авидност на IgG антителата, което помага в отиференциране остра активна и инфекция придобита в миналото (Dollard SC 2011). Нискоавидните антитела могат да персистират 18-20 седмици след първичната инфекция (Evans C 2013). След това време започват да циркулират високоавидни антитела. В случай, че има сериозно съмнение за първична инфекция следващата стъпка е да се обсъди риска за CMV трансмисия към плода и възможните усложнения. Известно е, че приблизително 33% от инфектираните фетуси са симптоматични при раждането (Adler SP 2011). Честотата на трансмисия варира според срока на бременността към момента на първичната майчина инфекция. Според публикувани данни, на база 248 бременности, потвърдената трансмисионна честота в първия, втория и третия семестър е установена съответно като 30.1%, 38.2% и 72.2% (Enders G 2011). След обсъждане на тези значителни рискове с родителите, трябва да се предложи комбинация от методи за по-точно определяне на трансмисията на вируса и потенциалните последици. Неинвазивните методи включват следене за фетални аномалии или удебеляване на плацентата с ултразвукова диагностика на всеки 2 - 3 седмици. Инвазивните методи включват амниоцентеза или кордоцентеза. За да се минимизира риска от фалшиво негативни резултати, амниоцентезата трябва да се извърши 6 - 7 седмици след предполагаемата дата на първичната инфекция и след 21 г.с. (Yinon Y 2010). Това време обхваща феталния инкубационен период и предполага достатъчно развитие на феталните бъбреци за адекватна вирусна уринна екскреция в амниотичната течност. Оптималното време на амниоцентезата е много важно в етично отношение, защото резултата от нея може да повлияе пряко на решението за евентуално прекъсване на бременността. След 21 г.с., PCR техниката за определяне на вирусен товар достига висока чувствителност, но въпреки това детекцията на CMV-DNA в амниотичната

течност не предсказва тежестта на феталната инфекция и увреди. Висок вирусен товар в амниотичната течност може да бъде индикатор за симптоматична конгенитална инфекция на относително ранен етап в хода на бременността, което е свързано с повече увреждания. Друга диагностична възможност е детекцията на специфични IgM антитела във фетална кръв, взета след кордоцентеза, което обикновено е свързано с тежък изход за плода и новороденото дете по литературни данни (Enders G 2001). Ехографското проследяване от акушер-гинеколог или рентгенолог може да открие признаци на фетални увреждания, но има редица ограничения, и изисква опитен специалист. Ако един фетус се развива нормално в последователни ехографски прегледи, рискът от клинично представена конгенитална цитомегаловирусна инфекция е около 10%, което потвърждава ограниченията на това изследване (Bernstein H 2007).

Труден остава въпросът за имунните майки, които могат да предадат инфекцията на плода, което се случва в около 1% по литературни данни (Stagno S 1982). Въпреки, че рискът е в твърде нисък процент, в случая реактивацията и реинфекцията са основния допринасящ фактор за общия брой конгенитални инфекции и заболявания по света (Wang C 2011, Ornoy A 2006). При имунни майки, усилията трябва да са насочени към внимателна и насочена анамнеза, целяща откриване на най-малки признаци за реактивация на вирусната инфекция, като субфебрилитет или отпадналост. Най-често обаче такива липсват клинично. В нашето изследване за определяне авидност на специфичните IgG антитела, не доказахме бременна жена със серологични данни за наскоро придобита първична майчина CMV инфекция. Лимитиращ фактор тук може да бъде факта, че 29 бременни (23.9%, 95% CI: 16.3 - 31.5) бяха в трети триместър на бременността, което не изключва първична инфекция около концепцията, или в ранна бременност. Според нас такъв вероятно е случаят с раждането на дете с доказана конгенитална инфекция с RT-PCR от клиничен материал плазма. Майката (21 г.) беше изследвана в трети триместър и серологичният ѝ профил показва anti CMV IgM: 1.5 R>1.1 R - положителен резултат; anti CMV IgG: 227 RU/ml > 22 - положителен резултат и RAI=82% - висока авидност на IgG антителата. Тъй като майката беше изследвана за пръв път именно в последния триместър на бременността (38 г.с), не можем да изключим първична инфекция в ранна бременност или непосредствено преди концепцията. За това свидетелства и ниско позитивния IgM имуноен отговор.

Майката съобщава за нормално протекла бременност, без оплаквания от какъвто и да е характер. Лабораторни резултати насочват към предполагаема реактивация на CMV инфекцията и не изключват първична инфекция в ранна бременност със задържане на IgM реактивния резултат. Както вече описахме се роди бебе с ниско за гестационната си възраст тегло (2000 гр.), с затруднена адаптация и респираторни проблеми, изискващи отглеждането му в кувиоз. Серологичните резултати при бебето на възраст 2 дни бяха: anti CMV IgM - негативен; anti CMV IgG: 116 RU/ml > 22 RU/ml, положителен; QRT-PCR за CMV-DNA от плазма – 3360 IU/ml. Детето не беше образувало специфични IgM, но имаше значително по-нисък титър на IgG антителата от своята майка, което може да говори в полза на феномена на изчерпването на антителата при нужда от тях. На база на детекция на CMV-DNA в проба плазма от новороденото недвусмислено доказахме конгенитална CMV инфекция, но поради липса на базов серум на майката, не можем да сме категорични дали се касае за първична или реактивирана майчина инфекция.

Независимо от това дали бъдещите майки са имунни (86.8% по наши данни) или неинфектирани (13.2% по наши данни), трябва да бъдат полагани усилия в посока заостряне вниманието към тази вирусна инфекция, както и в посока повишаване на здравната култура и грамотност на бъдещите майки за начините на предаване на вируса, за значението на хигиенните мерки, и за избягване на тесни контакти с източници на инфекцията, какъвто често се оказват другите малки деца в семейството. В тази насока са получените резултати от френско изследване на бременни жени. Те показват, че ако се даде ясна информация за цитомегаловирусната инфекция в хода на бременността, то честотата на сероконверсия е по-ниска в групата на жените, с които проблемът е бил обсъждан, отколкото в групата на жените, които не са имали нужната информация (Vauloup-Fellous C 2009). Нуждата от профилактични мерки се засилва още повече от факта, че протоколите за антивирусно лечение и пасивна имунизация в хода на рисковата бременност все още се оценяват и са противоречиви (Leruez-Ville M 2016). В допълнение, според литературата само рекомбинантна CMV гликопротеин В (gB) ваксина, поставена с адювант MF59 е била оценена в серонегативни жени и показала приблизително 50% редукция на майчините инфекции във ваксинираните жени. Това проучване във фаза 2 също така регистрира една конгенитална инфекция в групата на ваксинираните жени, сравнено с три - в плацебо групата, въпреки че бройката на пробите е лимитиращ фактор по отношение на статистическото валидиране на това

анализирано наблюдение (Pass RF 2009).

Въз основа на изследваните проби и анализа, препоръчваме следния **алгоритъм** при бременност:

1. Серологичен скрининг за anti CMV IgM/IgG на всички бременни жени в ранна бременност. Считаме за подходящо да се съчетае със задължителния ранен биохимичен скрининг в 11-13 г.с.
2. При наличие единствено на anti CMV IgM позитивен резултат, да се извърши потвърждение в WB анализ и да се предложи повторно изследване след 2-3 седмици с цел търсене на сероконверсия.
3. При серопозитивните бременни жени, с наличие единствено на anti CMV IgG, или при едновременна детекция на anti CMV IgM / anti CMV IgG, провеждане на допълнителен тест за авидност на anti CMV IgG антителата.
4. При установена ниска авидност се обсъждат рисковете с родителите. Предлага се комбинация от методи за по-точно определяне на трансмисията на вируса и потенциалните последици.
 - Неинвазивни методи - проследяване за наличие на фетални аномалии или одебеляване на плацентата с помощта на ултразвукова диагностика от квалифициран специалист на всеки 2 седмици.
 - Инвазивни методи - амниоцентеза с определяне на вирусен товар в PCR или кордоцентеза - в ELISA и PCR. За минимизиране на риска от фалшиво негативни резултати, амниоцентезата трябва да се извърши 6 - 7 седмици след предполагаемата дата на първичната инфекция и след 21 г.с. за достатъчна зрялост на плода и бъбречна екскреция на вируса.
5. При установена висока авидност на anti CMV IgG на родителите се предоставя информация за минималните рискове от трансмисия на вируса към плода.
6. При установяване на неинфектирана бременна се обсъждат начините за предпазване и се препоръчва второ серологично изследване към момента на късния биохимичен скрининг (30 г.с.).

4.2.2. Проспективно проучване на CMV инфекция при суспектни деца до 3 месечна възраст.

Целта на настоящата разработка е да дефинираме ролята на CMV в конгениталната и ранната постнатална патология на суспектни по клинични данни деца до 3 месечна възраст сравнително в ELISA и PCR.

Описание на извадката:

Изследвахме 50 деца в единична проба плазма. Пробите бяха събирани със съдействието на неонатологичното отделение на СБАГАЛ „Проф. Д-р Димитър Стаматов“ Варна (n=21, 42%, 95% CI: 28.32% - 55.68%) и детските клиници на УМБАЛ „Света Марина“ Варна (n=29, 58%, 95% CI: 44.32% - 71.68%).

Демографска характеристика:

Преобладават децата от мъжки пол - 60% (95% CI: 46.42% - 73.58%, n=30). Децата от женски пол са 40% (95% CI: 26.42% - 53.58%, n=20). Възрастовият диапазон на изследваните е от 1 ден до 90 дни, средна възраст 27.18 дни (SD±25.46). Условно разделихме децата в две възрастови групи – до 21 дни и от 21 дни до 3 мес. С цел да бъдем по-категорични за типа на инфекцията – конгенитална или постнатална, разделихме децата в две възрастови групи, като границата беше 21 навършени дни. Във възрастта в която недвусмислено доказваме конгенитална инфекция (до 21 дни), бяха половината от децата - 50% (95% CI: 36.14% - 63.86%, n=25). Останалите 25 деца 50% (95% CI: 36.14% - 63.86%, n=25), бяха на възраст от 1 до 3 месеца, с клинични данни, които не изключват цитомегаловирусна инфекция. Децата са изследвани за участието на множество патогени и показаха негативни резултати за хепатит В, хепатит С, рубеола, херпес симплекс вирус тип 1, херпес симплекс вирус тип 2 вродени инфекции. Седем от децата (14%, 95% CI: 4.38% - 23.62%) бяха изследвани за носителство на anti HIV 1/2 Ag/Ab и Syphilis Ab и също показаха негативни резултати. Разпределихме децата в зависимост от преимуществено водещият клиничен синдром, по повод на който всяко дете е включено в проучването (табл. 11).

Таблица 11. Водещи клинични симптоми при 50 суспектни деца.

Водеща клинична проява	n=50	%
Недоносеност и ниско за гестационната възраст тегло	21*	42%
Хепатит или протрахиран иктер	6	12%
Сепсис	5	10%
Вродени аномалии	3	6%
Гастроезофагеална рефлуксна болест	3	6%
Обрив	3	6%
Хидроцефалия	2	4%
Хемолитична анемия	2	4%
Тромбоцитопения	2	4%
Неуточнени гърчове	1	2%
Стомашно-чревна кървене	1	2%
Пневмония	1	2%

*Новородените деца с данни за недоносеност са от СБАГАЛ „Проф. д-р Димитър Стаматов“ Варна (n=21). Те са родени преждевременно (между 25 и 37 г.с.), средно в 31.66 г.с. (SD±4.19), с ниско за гестационната си възраст тегло от 700 до 2600 гр., средно тегло 1552 гр. (SD±665). Освен недоносеността, част от децата имаха и други прояви, суспектни за вродена цитомегаловирусна инфекция (хидроцефалия, мозъчни аномалии, микроцефалия, пневмония, тромбоцитопения).

Децата са изследвани в ELISA за детекция на специфични anti CMV IgM и anti CMV IgG антитела. Следващото изследване включва количествен RT-PCR за детекция на CMV-DNA в плазма. Две от децата (на 28 и на 52 дни), с положителен резултат в PCR, имахме възможност да проследим във времето с нови изследвания.

Резултати:

Anti CMV IgM позитивни резултати установихме в 8/50 (16%, 95% CI: 5.84% - 26.16%) деца, anti CMV IgM гранични резултати получихме в 3/50 (6%, 95% CI: -0.58% - 12.58%), а anti CMV IgM негативни бяха 39/50 деца (78%, 95% CI: 66.52% - 89.48%). Полуколичественото измерване в пробите с позитивен anti CMV IgM резултат показва обхват от 1.3 R до 6.8 R (средно 3.88 R) > 1.1 R.

Anti CMV IgG позитивни резултати бяха установени при 46/50 (92%, 95% CI: 84.48% - 99.52%) деца. Anti CMV IgG негативни бяха 4/50 деца (8%,

95% CI: 0.48% - 15.52%). Титърът на специфичните IgG антитела при позитивните деца се движи в обхват от 26 RU/ml до 244 RU/ml (средно 100.87 RU/ml) > 22 RU/ml.

PCR:

От изследваните деца 12/50 (24%, 95% CI: 12.16% - 35.84%) показаха положителен CMV-DNA резултат в плазмените проби. Вирусният товар бе в обхват от 65 IU/ml (log 1.81) до 1 628 879 IU/ml (log 6.21), средноаритметично 144 707.2 IU/ml (log 5.16). Половината от PCR позитивните деца 6/12 (50%) имаха anti CMV IgM+ имунен отговор.

При разпределяне на резултатите по обособените възрастови групи, позитивен вирусен товар (3360 IU/ml) установихме при 1/25 деца (4%), които са във възрастта, в която недвусмислено доказваме конгенитална инфекция (до 21 дни). CMV-DNA открихме при 11/25 деца (44%) на възраст от 1 до 3 месеца, със суспектни клинични симптоми за цитомегаловирусна инфекция.

Обсъждане:

Според литературата мнозинството от живородените конгенитално инфектирани новородени са асимптоматични при раждането, защото получават пълна гама майчини трансплацентарни anti CMV IgG от серопозитивните майки. Тези антитела значително модифицират конгениталната инфекция и правят признаците сравнително меки от клинична гледна точка. Около 15% - 20% от инфектираните недоносени деца, които не получават пълния набор майчини антитела, могат да развият клинично CMV заболяване (Stehel EK 2005). В друго проучване 22.1% от изследваните недоносени новородени деца развиват симптоматична инфекция (Mussi-Penhata MM 2004). Това поставя недоносеността като един от основните признаци при които активно трябва да се търси конгенитална или интранатална CMV инфекция.

В нашите проучвания направихме опит да идентифицираме рисковите бременни жени и да изследваме проспективно новородени деца, суспектни за цитомегаловирусна инфекция. Това ни позволява да установим относителният дял на CMV в патологията на новородени деца от регион Североизточна България, да направим връзка със серостатуса на бременните, както и да потърсим динамика в сравнение с предходни проучвания. С помощта на PCR анализ доказахме, че относителният дял на CMV в неонаталната и ранната кърмаческа патология в региона е 24% (12/50

деца). Проучване с такава цел, направено в миналото, въз основа на серологичния статус на децата (anti CMV IgM позитивност), установява относителен дял на CMV в етиологията на ниското тегло при раждане в 23.26% (10/43) и в 16.87% (14/83) от децата с вродени аномалии до 3 месечна възраст (Иванова Л 2000). В сравнителен аспект резултатите означават, че CMV продължава да играе значителна роля в патологията на новородените и до известна степен е negliжиран.

С цел да бъдем по-категорични в определяне типа на инфекцията, дали се касае за конгенитална или постнатална, разделихме децата в две възрастови групи – от 1 ден до 21 дни и от 21 дни до 3 месеца.

Откриването на вирусен товар в плазма при децата от малката възрастова група (до 21 дни), би потвърдило конгенитална CMV инфекция, придобита по вертикален път, докато откриването на CMV-DNA във възрастта след 21 дни не изключва интранатално (вертикално) и ранно постнатално (хоризонтално) инфектиране. В този случай ориентир може да бъде тежестта на клиничната изява (Mosca F 2007). В нашето проучване недвусмислено доказахме вродена инфекция при едно дете 4% (1/25). При обстояното му проучване се установи, че е родено от майка на 21 г. от първа нормално протекла бременност. Детето е от мъжки пол, родено в 38 г.с. с ниско за гестационната си възраст тегло (2000 гр.), с трудна адаптация и респираторни проблеми, изискващи отглеждането му в кувиоз. Серологичните резултати при бебето на възраст 2 дни бяха: anti CMV IgM - негативен; anti CMV IgG: 116 RU/ml > 22 RU/ml, положителен; PCR за CMV-DNA – 3360 IU/ml. Серологичният профил на майката показва anti CMV IgM: 1.5R>1.1R позитивност; anti CMV IgG: 227 RU/ml > 22 позитивност и RAI=82%, висока авидност на IgG антителата. Новороденото не беше образувало специфични anti CMV IgM, но имаше значително по-нисък титър на anti CMV IgG антителата от своята майка. Това говори в полза на феномена на изчерпването на специфичните антителата при активна инфекция. По-вероятно се касае за реактивирана майчина инфекция или първична такава, в много ранен срок на бременността. Допускаме, че конгениталната инфекция при това бебе е модифицирана от наличните пасивно преминали anti CMV IgG антитела, поради което признаците от клинична гледна точка са сравнително меки. Детето се повлия добре след лечение с Cumevene i.v. за 10 дни, започна да увеличава теглото, и бе дехоспитализирано в добро общо състояние.

Във възрастова група до 21 ден след раждането, не доказахме вирусен товар или позитивен anti CMV IgM имунен отговор при останалите деца. Едно дете (на 12 дни), с клинична диагноза хепатит имаше граничен anti CMV IgM резултат и позитивен anti CMV IgG (91RU/ml) резултат, но не установихме положителен вирусен товар. Три от децата бяха с едновременно негативен anti CMV IgM и anti CMV IgG серологичен профил.

Поради по-голямата възраст на децата във втората възрастова група (21 дни - 3 м.) не можем да бъдем категорични относно типа на CMV инфекцията (вертикална или хоризонтална), но тежестта на клиничните симптоми би позволила да изкажем обосновано предположение, защото инфектирането по хоризонтален път на здрави доносени новородени обикновено не води до тежки клинични последици. Подобно становище е изказано в едно проучване на Dworsky сред случайно подбрани родилки и техните новородени деца, което установява, че 69% от децата се инфектират с CMV с майчината кърма и излъчват вируса продължително време след това, без сериозни здравни последици. Само при две от децата, които са били преждевременно родени, се е развила пневмония, която отшумяла без хронични последици (Dworsky M 1983).

В нашето изследване на деца във възраст 1 - 3 месеца, със suspectни клинични симптоми за цитомегаловирусна инфекция, CMV-DNA установихме при 44% (11/25). Вирусният товар при тях се движеше в обхват от 65 (log 1.81) до 1 628 879 IU/ml (log 6.21). Всички 11 деца (6 момчета и 5 момичета, две от децата са близнаци) с позитивен вирусен товар бяха anti CMV IgG позитивни. Съпътстващи anti CMV IgM антитела имаха 6/11 (54.5%) от децата и едно дете 1/11 (9.1%) показва граничен резултат. Тези данни ни дават основание да заключим, че отрицателният серологичен anti CMV IgM резултат не отхвърля активна CMV инфекция и във всички suspectни деца е наложително и изследване за определяне на вирусен товар в PCR. Най-честите клинични изяви при децата с позитивен вирусен товар бяха както следва: недоносеност и ниско за гестационната си възраст тегло (3/11), повръщане и ГЕРБ (3/11), сепсис (2/11), пневмония (2/11), тромбоцитопения (2/11), хемолитична анемия (1/11) и обрив (1/11). Симптомите са повече от броя на PCR позитивните деца, защото при някои от тях беше представен комплекс от клинични изяви. Тези клинични случаи са описани подробно в дисертацията.

CMV инфекцията е водеща причина за конгенитални инфекции по

целия свят. Проблемът обаче не е добре оценен и в известен смисъл е negliжиран. В нито една страна в Европа, както и у нас, не провежда задължителен пренатален скрининг на бременните жени, както и постнатален CMV скрининг на всички деца, родени с данни за фетално страдание, както и в послеродовия период. По литературни данни и според нашите широкомащабни проучвания, CMV инфекцията е огромен здравен проблем, защото е най-честата конгенитална инфекция и най-честата ненаследствена причина за глухота и нарушено нервно-психическо развитие при новородените деца (Demmler-Harrison GJ 2009). Заразеността при раждане в световен мащаб е изчислена на 0.64%, но варира значително според различните проучвани популации от 0.3% до 2.3% от всички живородени (Vorrana SB 2013). Всъщност вродената цитомегаловирусна инфекция е по-честа от няколко други заболявания, които са включени в задължителния скрининг на новородените деца в редица страни от Европейския съюз (De Vries JJ 2011). Вродената цитомегаловирусна инфекция е по-честа от други състояния, за които жените са наясно, че увреждат плода, като алкохол, синдром на Даун, spina bifida и HIV (Cannon MJ 2009). В последните години привлича интерес майчиния пренатален скрининг, който може да помогне в ранната идентификация на рисковите бременности и на инфектираните бебета. Такава идентификация ще даде възможност за терапевтични интервенции при бременните и техните деца, които да намалят последиците от инфекцията, за което все повече се говори в последните години (Nigro G 2011).

Въз основа на изследваните проби и анализа препоръчваме следния **алгоритъм** при проследяване на суспектни за вродена инфекция новородени:

1. Серологичен скрининг майка–бебе на всички суспектни случаи за първоначална ориентация, за определяне количеството антитела от IgG тип, преминали трансплацентарно от майката. Това особено касае недоносените новородени деца.
2. При позитивен anti CMV IgM и/или anti CMV IgG резултат в предварителния серологичния скрининг задължително провеждане на PCR в клинични материали плазма и/или слюнка от новороденото.

4.2.3. Проспективно проучване на безсимптомна CMV инфекция при клинично здрави новородени.

Предвид установеното високо ниво на серопревалентност при бременните жени в региона и сериозното участие на CMV, установено от нас при изследване на суспектни симптоматични новородени деца, си поставихме за цел да установим честотата на безсимптомната конгениталната CMV инфекция чрез прилагане на съвременни молекулярно-биологични методи (RT-PCR) за доказване на вирусната екскреция в слюнка на случайно подбрани клинично здрави новородени деца.

Описание на извадката:

В единична проба слюнка изследвахме 63 случайно подбрани клинично здрави новородени. Задължително условие за включване в проучването беше да бъдат на възраст, в която недвусмислено доказваме конгенитална инфекция (до 21 дни). Пробите бяха събирани със съдействието на неонатологичното отделение на СБАГАЛ „Проф. д-р Димитър Стаматов“, МБАЛ “Майчин дом“ и МБАЛ „Света Анна“ – гр. Варна от август 2017 г. до април 2018 г.

За оценка адекватността на избория от нас материал за изследване и ефикасността на прилагания метод, паралелно тествахме слюнка от дете с клинично проявена вродена цитомегаловирусна инфекция, доказана лабораторно от плазма в RT-PCR, като позитивна контрола.

Демографска характеристика:

В настоящото изследване преобладават децата от мъжки пол - 55.55% (95% CI: 43.28% - 67.82%, n=35). Децата от женски пол съставляват 44.44% (95% CI: 32.17% - 56.71%, n=28). Преобладават децата родени от едноплодна бременност - 90.5% (95% CI: 83.26% - 97.74%, n=57). Шест от децата са 3 двойки близнаци - 9.5% (95% CI: 2.26% - 16.74%, n=6). Децата са на възраст от 1 ден до 16 дни, средна възраст 2.6 дни (SD±2.86). Родени са между 28 и 40 г.с., средно 38.39 г.с. (SD±2.55). Теглото при раждане е в обхват 1100 - 4100 гр., средно 3041 гр. (SD±714).

Резултати:

В проба слюнка от едно дете – 1.58% (95% CI: -1.5% - 4.66%) от тестваните 63 клинично здрави новородени открихме ниско позитивен вирусен товар CMV-DNA 74 IU/ml (lg 1.87)(табл. 12).

Таблица 12. Резултати от изследване с PCR от слюнка на безсимптомни новородени.

Брой изследвани безсимптомни деца	Брой позитивни в PCR от слюнка
n=63	n=1 (1.58%, 95% CI -1.5% - 4.66%)

При конгенитално инфектираното симптоматично дете на 52 дни, което ползвахме като позитивна контрола, вирусният товар в слюнка беше 3 725 965 IU/ml (lg 6.57). За сравнение вирусния товар на същото дете в плазма беше близо 82 пъти по-нисък (45 722 IU/ml, lg 4.66). Лимитиращ фактор при това сравнение е разликата от 5 дни между двете пробонабирания. На по-късен етап, когато детето беше навършило 5 месеца, отново имахме възможност да го проследим с изследване в PCR от двата типа клинични материали взети този път едновременно. Правилото за по-висок вирусен товар в материал слюнка, сравнено с плазма се потвърди. На 5 месечна възраст на детето вирусният товар в слюнка беше 201 518 IU/ml (lg 5,3), а вирусния товар в плазма беше многократно по-нисък (197 IU/ml, lg 2,2). Този път факторът разлика във времето между двете пробонабирания не беше на лице.

Обсъждане:

Конгениталната CMV инфекция е най-честата интраутеринна инфекция, засягаща от 0.4 до 2.3% от всички живородени (Demmler GJ 1991). По-нови данни не показват промяна в заразеността с CMV при раждане в световен мащаб. Според литературата е установена в 0.64%, като варира значително според различните проучвани популации в географски и социално-икономически аспект от 0.3% до 2.3% от всички живородени (Vorrana SB 2013). В друго проучване е установена обща честота на конгенитална CMV инфекция при раждане по света в 0.7% (Dollard SC 2007). От същото проучване става ясно, че CMV е водещата причина за вродени аномалии в Съединените щати, причинявайки сериозни трайни увреждания на повече от 5 500 деца годишно. Приблизително 13% от заразените деца са симптоматични при раждане. В същото време, 20% от новородените деца, инфектирани безсимптомно, по-късно развиват постоянни последици, като загуба на слуха или когнитивно увреждане. Най-

често срещаното увреждане при конгенитално заразените деца е сензорноневрална загуба на слуха, и засяга около 36% от симптоматичните и 12% от асимптоматичните бебета, според литературата (Dollard SC 2007). Въпреки, че проблемът е сериозен, понастоящем няма универсална CMV скринингова програма. В САЩ, CMV скринингът е обвързан с Националната слухова скринингова програма, което е добра възможност и би могъл да се приложи и в други страни (Korver AMH 2010).

Лабораторният материал слюнка се оказва по-показателен за количествено доказване на CMV и дава по-висок вирусен товар от този открит в плазмата. Това сравнително доказахме при контролно изследваното конгенитално инфектирано новородено в нашето проучване, описано по-горе след двукратно изследване. В нашето проучване открихме едно позитивно безсимптомно дете от 63 изследвани (1.58%). Малкият брой изследвани новородени (сравнено с други проучвания по света), вероятно не ни позволява да открием по-точно реалната честота на безсимптомно заразените деца. За установяване на статистическа достоверност в резултатите от подобен скрининг е необходимо тестване на голям брой проби, което е в зависимост от много повече финансови средства. По света, за установяване на честотата на безсимптомното заразяване на новородените деца, са правени проучвания сред голям брой участници. При дългосрочно проучване (1977-1985 г.) на конгениталната CMV инфекция в Швеция, процентът на безсимптомно заразените, установен с вирусна изолация от урина е 0.5%, при изследване на 16 474 новородени (76/16474) (Ahlfors K 1999). Същата честота 0.5% е установена и при тестването на 34 989 новородени във Великобритания (177/34 989), в материал течна или изсушена слюнка, чрез използване на PCR (Vorrapa SB 2011). Авторите правят заключение, че RT-PCR приложен в материал течна или изсушена слюнка (взета със стерилен памучен тампон и разтворена в последствие в 300 µl PCR-grade water), показва висока чувствителност и специфичност за детекция на CMV инфекция и може да се счита за потенциален скринингов метод за търсене на инфекцията при новородени деца, какъвто опит направихме и ние. Честотата на конгениталната инфекция в Словения, определена в PCR от клиничен материал урина е сред най-ниските докладвани в света - 0.14% (4/2841 новородени деца) (Paradiž KR 2012). Друго проучване, проведено също с вирусна изолация от клиничен материал урина, на новородени деца до 14 дневна възраст, сравнява честотата на

конгениталната CMV инфекция в Кайро и Лондон. При проучването се откриват 2 деца с позитивен резултат от 178 изследвани в египетската популация (1.28%), срещу нито едно позитивно дете от 176 тествани в английската популация (0%) (Salwa El-S. Abdel Hamid 2011).

Въпросът, касаещ най-подходящите клиничен материал и лабораторен тест за доказване на вродената CMV инфекция е доста противоречив. Вирусната изолация от урина или слюнка се счита за златен стандарт в тази диагностика по литературни данни. Едно мултицентрово проучване докладва, че делът на конгенитално инфектираните новородени, открити в RT-PCR е 8.2% (28/340), а с вирусна изолация - 7.4% (25/340). Авторите търсят обяснение за тези противоречиви на класическото схващане данни, в по-дългото време за транспортиране на част от пробите. Приемайки културелното изследване за отправна точка, то RT-PCR има чувствителност 100%, докато чувствителността на културелното изследване е 89.3% (De Vries JJ 2012). Авторите приемат това за достатъчна обосновка за да се предпочита RT-PCR като метод на избор в конкретното търсене.

В друго проучване, са сравнени резултатите от анализ на проби урина и слюнка с помощта на вирусна изолация в клетъчна култура и PCR от 80 деца, за да се определи диагностичната приложимост на RT-PCR при доказване на вродена CMV инфекция. Според резултатите от приложение на PCR техниката, 98.8% от пробите урина показват положителен резултат. Три проби с положителен резултат в PCR са били отрицателни в клетъчна култура. Резултатите от изследване на материал слюнка в PCR и клетъчна култура са съгласувани при 78 от пробите (97.5%). Две от позитивните в PCR проби слюнка са показали отрицателен резултат в клетъчна култура. Тези сравнителни анализи демонстрират, че PCR техниката е достатъчно индикативна, както и културелното изследване, за диагностициране на вродена CMV инфекция в клиничен материал урина или слюнка. Пробите слюнка се събират много по-лесно и са абсолютно щадящи и неинвазивни за бебетата. Авторите изтъкват и други предимства. PCR предлага по-бърз краен резултат. Вероятността условията за съхранение и транспорт на пробите да оказват сериозно отражение върху резултата от PCR е много по-малка. PCR има по-ниска цена и може да бъде адаптиран към ситуации за целенасочено тестване и широкомащабен CMV скрининг (Ross SA 2014). Осланяйки се на тези резултати ние се насочихме към събиране на проби слюнка, като най-лесно събираем материал за изследване от клинично здрави

новородени. Открихме едно клинично здраво безсимптомно конгенитално инфектирано дете (1.58%). Към момента на изследването детето беше на 3 дни, от женски пол, родено в 37 г.с. с тегло 2650 гр. от майка на 20 г., първо раждане. За сравнение при предходно серологично проучване в България от кръв от пъпна връв на 90 клинично здрави новородени деца е установен изключително близък процент - едно (1.11%) anti CMV IgM позитивно дете, което впоследствие прави протрахиран иктер в продължение на 2 месеца след раждането (Иванова Л 2000). Приложихме в практиката един лесноизпълним, възпроизводим и достъпен метод за скрининг на вродена CMV инфекция от клиничен материал, взет неинвазивно, както е описано в литературата при други изследвания (Vorpana SB 2011).

4.2.4. Проспективно проучване на CMV инфекция/реактивация при пациенти с различни видове лимфоми.

Поставихме си за цел да дефинираме заразеността на пациентите с различни видове лимфоми чрез определяне носителството на anti CMV IgM и IgG, както и да определим честотата на реактивация на инфекцията в количествен RT-PCR.

Описание на извадката:

Изследвахме 50 пациенти с различни видове лимфоми в единична проба плазма. Пробите бяха събрани със съдействието на Клиниката по хематология на МБАЛ „Света Марина“ Варна, където пациентите са хоспитализирани или диспансеризирани от ноември 2016 до май 2017 г. По-голяма част от пациентите, n=40 (80%, 95% CI: 68.91% - 91.09%) са с клинична диагноза Неходжкинов лимфом (НХЛ), който се среща по-често като заболяване в нашата страна в сравнение с БХ. От пациентите с НХЛ, 21 са с клинична и хистологична диагноза дифузен В-едроклетъчен лимфом, 2 – с дребноклетъчен фоликуларен лимфом, 2 – с маргинално-зонов лимфом, 7 – с периферен Т-клетъчен лимфом, 1 – с прекурсорен Т-клетъчен лимфом, 6 – с фоликуларен лимфом и 1 - неуточнен. С клинична и хистологична диагноза Болест на Ходжкин (хистологичен вариант - Нодуларна склероза) са 9 пациента (18%, 95% CI: 7.35% - 28.65%) и 1 (2%, 95% CI: -1.88% - 5.88%) - с Мултиплен миелом (IgG kappa). Мнозинството от пациентите в проучването, n=49 (98%, 95% CI: 94.12% - 101.88%) бяха във II, III и IV стадий на основното заболяване. Само един пациент (2%, 95% CI: -1.88% -

5.88%) беше в първи стадий на заболяването. Шест (12%, 95% CI: 2.99% - 21.01%) от участниците бяха без започната антинеопластична терапия, а останалите 44 (88%, 95% CI: 78.99% - 97.01%) бяха на антинеопластична цитостатична терапия. Мнозинството от пациентите, n=30 имаха коморбидности от най-различно естество (60%, 95% CI: 46.42% - 73.58%), а 20 пациента (40%, 95% CI: 26.42% - 53.58%) нямаха придружаващи заболявания.

Демографска характеристика:

Възрастта на пациентите, включени в проучването е в обхват от 23 до 78 г., средна възраст 52.56 г. (SD±13.92). Средната възраст на пациентите с НХЛ е 53.7 г.(SD±14.5). Средната възраст на пациентите с БХ е по-ниска – 47.8 г. (SD±11.3). Преобладават мъжете – n=30 (60%, 95% CI: 46.42% - 73.58%). Пациентите от женски пол са n=20 (40%, 95% CI: 26.42% - 53.58%). Средната възраст на изследваните жени е по-висока от тази на мъжете (табл. 13).

Таблица 13. Разпределение на пациентите с различни видове лимфоми в зависимост от възрастта и пола.

Пол	n	Мин. Възраст	Макс. възраст	Средна възраст	Стандартно отклонение
Мъже	30	23	76	50.9	SD±13.56
Жени	20	28	78	55.1	SD±14.45
Общо	50	23	78	52.56	SD±13.92

Разпределението на пациентите с лимфоми в зависимост от клинично-морфологичната характеристика на основното заболяване са представени на таблица 14 и таблица 15.

Таблица 14. Клинико-морфологична характеристика на пациентите с НХЛ (n=40), средна възраст 53.7 г. (SD±14,5).

	Променлива	n	%
Хистологичен резултат	дифузен В-едроклетъчен	21	52,5
	дребноклетъчен	2	5
	фоликуларен	2	5
	маргинално-зонов	7	17,5
	периферен Т-клетъчен	1	2,5
	прекурсорен Т-клетъчен	6	15
	фоликуларен	1	2,5
	неуточнен		
Клиничен стадий	I А	1	2,5
	II А	2	5
	II В	3	7,5
	III А	5	12,5
	III В	14	35
	III С	1	2,5
	IV А	6	15
	IV В	8	20
Цитостатична терапия	С терапия	34	85
	Без терапия	6	15
ЛДХ*	>378 U/L	24	60
	В норма	16	40
Левкоцити*	<3,5x10 ⁹ /L	5	12,5
	В норма	25	62,5
	>10x10 ⁹ /L	10	25
Лимфоцити*	<20%	16	40
	В норма (20-40%)	24	60

*Използвани са референтните стойности на клиничко-лабораторните показатели на Клинична лаборатория към МБАЛ „Св. Марина“ гр. Варна.

Таблица 15. Клинико-морфологична характеристика на пациентите с БХ (n=9), средна възраст 47.8 г. (SD±11.3).

	Променлива	n	%
Хистологичен резултат	Нодуларна склероза	9	100
Клиничен стадий	II B	2	22,22
	III C	1	11,11
	IV B	6	66,66
Цитостатична терапия	С терапия	9	100
	Без терапия	0	0
ЛДХ*	>378 U/L	5	55,55
	В норма	4	44,44
Левкоцити*	<3,5x10 ⁹ /L	0	0
	В норма	5	55,55
	>10x10 ⁹ /L	4	44,44
Лимфоцити*	<20%	6	66,66
	В норма (20-40%)	3	33,33

*Използвани са референтните стойности на клинико-лабораторните показатели на Клинична лаборатория към МБАЛ „Св. Марина“ гр. Варна.

Резултати:

Серологичен скрининг за определяне носителството на специфични anti CMV IgM и IgG в **ELISA**:

От изследваните 50 пациента с различни видове лимфоми, 44 (88%, 95% CI: 78.9%-97%) показаха anti-CMV IgG позитивен резултат. Останалите 6 (12%, 95% CI: 2.9% - 21%) бяха anti-CMV IgG негативни. Anti-CMV IgG негативните пациенти бяха anti-CMV IgM негативни също, т.е., неинфектирани.

От изследваните anti CMV IgG позитивни пациенти 5/44 (10%; 95% CI: 1.6% - 18.%) показаха anti-CMV IgM позитивен резултат. Не установихме серологичен профил anti-CMV IgM+ / anti-CMV IgG-, характерен в някои случаи за остра инфекция. Титърът на anti-CMV IgG позитивните пациенти се движеше в диапазон 40 RU/ml - 327 RU/ml, при средноаритметичен титър 152.1 RU/ml (SD ±66.9). За прегледност групирахме резултатите в три диапазона: <100 RU/ml; 100-200 RU/ml; >200 RU/ml (табл. 16).

Таблица 16. Резултати от изследването в ELISA на anti-CMV IgG позитивните пациенти с лимфоми.

Титър в ELISA	n	%
<100 RU/ml	11	25
100-200 RU/ml	21	47.7
>200 RU/ml	12	27.3

QRT PCR:

От изследваните пациенти (n=50) с различни видове лимфоми, при 5 (10%, 95% CI: 1.6% - 18.3%) доказахме присъствие на CMV-DNA в плазма. Останалите 45 пациента (90%; 95% CI: 81.6% - 98.3%) бяха с неоткриваем вирусен товар.

Всички пациенти с откриваем вирусен товар в PCR принадлежат към серологичния профил anti-CMV IgM- / anti-CMV IgG+ (табл. 17).

Таблица 17. Сравнителен анализ на позитивните в PCR пациенти, съотнесени към резултатите им в ELISA.

Пол	Възраст	Цитостати- чна терапия	CMV- DNA (IU/ml)	Anti-CMV IgM	Anti-CMV IgG (RU/ml)
мъж	64 г.	не	3966	Негативен	122
мъж	71 г.	да	3228	Негативен	173
мъж	44 г.	да	5688	Негативен	159
мъж	62 г.	да	3872	Негативен	101
мъж	76 г.	да	2332	Негативен	327

Обсъжданите по-горе пациенти бяха мъже с клинична диагноза Неходжкинов лимфом (3 с дифузен В едроклетъчен лимфом, 1 с дребноклетъчен фоликуларен лимфом и 1 с периферен Т-клетъчен лимфом). По-високи вирусни товари бяха регистрирани при тримата пациенти с хистологичен вариант дифузен В едроклетъчен лимфом. Към момента на тестването, 4 от положителните пациенти бяха на антинеопластична терапия и 1 – нямаше терапия на основното заболяване.

Обсъждане:

Лимфоцитите и в частност цитотоксичните Т-клетки, играят съществена роля в контрола на хроничната цитомегаловирусна инфекция (Salomon N 1999). Пациентите с нарушен клетъчен имунитет, като тези с различни видове лимфоми, са във висок риск от реактивация на латентна цитомегаловирусна инфекция, или пък ако са неинфектирани, са сериозно заплашени от развитие на крайно-органно заболяване при евентуална първична цитомегаловирусна инфекция в хода на основното заболяване (De la Hoz RE 2002). В нашето проучване, с помощта на серологичните методи установихме дела на инфектираните пациенти с различни видове лимфоми (88%), за които съществува риск от реактивация на CMV инфекцията. Останалите 12% от пациентите са незаразени и са във висок риск от развитие на първична инфекция със сериозни последици на фона на увреден клетъчно-медиран имунитет. Според нас, в двете групи пациенти трябва да се работи с прилагане на различни стратегии в хода на основното заболяване. В групата на вече инфектираните пациенти, трябва да се следи насочено за клинични белези на реактивация на CMV инфекцията или активно да се търсят свидетелства за такава, с помощта на съвременни лабораторни методи (QRT-PCR) още преди клиничната изява. В групата на неинфектираните пациенти, усилията трябва да са насочени към профилактика на първичната инфекция, чрез разясняване на възможните пътища за предаване на вируса и начините за избягване на вирусната инфекция с хигиенно-профилактични мерки.

CMV се открие като значителна причина за заболяемост и смъртност при пациенти с различни видове лимфоми и при реципиенти на хемопоеични стволови клетки в ранния или късния посттрансплантационен период (Konoplev S 2001, Nguyen Q 2001, Nguyen Q 1999). В литературата тези въпроси са разглеждани, като са описани редица клинични случаи, докладвани са проучвания за относителния дял на смъртността, причинявана от съпътстваща основното заболяване CMV инфекция. Има също публикации от проучвания на малък брой случаи (Manna A 2003, Chawla R 2005). Поради тази причина, ние решихме да определим в проспективно проучване не само CMV серопревалентността при пациентите с различни видове лимфоми, но и да потърсим лабораторни данни за реактивация на инфекцията, като определим честотата ѝ със съвременни лабораторни методи при тази високо рискова група пациенти.

На базата на проведеното от нас по-широко ретроспективно серологично проучване сред възрастни пациенти с онкохематологични заболявания (n=637), установихме висок относителен дял на anti CMV IgG позитивност в тази популация (93%) и данни за остра или реактивирана инфекция (anti-CMV IgM позитивни) в 16% от пациентите от същата група . Такава висока серопревалентност в рисковата група пациенти, предполага и висока честота на реактивация на CMV инфекцията. Това са пациенти с увреден клетъчно-медиран имунитет. Една голяма част от пациентите с различни видове лимфоми допълнително са подложени на съвременна антинеопластична терапия с алкилиращи агенти и моноклонални антитела (МАТ), които се свързват с CD52 рецептора на зрелите лимфоцити. Тази антинеопластична терапия води често до тежка лимфопения и неутропения и е предпоставка за опортюнистични инфекции, в това число CMV реактивация, значителна заболяемост и смъртност. В нашата Университетска болница се осъществява серологично изследване за инфектираност с CMV на всички пациенти с различни видове лимфоми, но не се провежда рутинно, скрининг за реактивация на инфекцията. Обикновено CMV реактивацията започва да се търси при клинични симптоми като необясним фебрилитет, цитопения, белодробни инфилтрати или гастроентероколитни оплаквания от пациента, разбира се наред с тестването за други рутинни патогени.

За да определим връзката на CMV инфекцията и симптомите на пациента с лимфом, първо трябва да сме наясно с имунния статус в серологично ELISA изследване. При проведения от нас анализ на 50 проби плазма установихме, че 44 (88%) от пациентите с лимфоми са инфектирани (anti-CMV IgG позитивни), а 6 пациента (12%) бяха серонегативни. При тях можем да изключим етиологичната роля на CMV като опортюнистичен патоген. Но в мнозинството от пациентите (88%, 95% CI: 78.4% - 97.6%), той би могъл да играе съществена роля в заболяемостта и дори при смъртността, тъй като са вече инфектирани. При серопозитивните пациенти доказахме наличие на специфични anti-CMV IgG антитела в количествен обхват от 40 RU/ml до 327 RU/ml. Средноаритметично установеният титър на тези антитела беше висок - 152.1 RU/ml (SD \pm 66.9), което предполагаше като причина чести реактивации на инфекцията и поддържане на високи титри на специфичните антитела. При сравнение със средноаритметичния титър на специфичните anti-CMV IgG антитела, установен от нас при 105 клинично здрави CMV серопозитивни бременни жени - 128 RU/ml

(SD±61.44), този на пациентите с различни видове лимфоми е по-висок, и можем да предположим по-висока честота на реактивация при тях, дори и сравнено с групата на бременните жени, при които имунните реакции са модифицирани (Mor G 2010). Висок титър на IgG антитела обаче не може да се тълкува еднозначно като маркер за реактивация на инфекцията, ако липсват последователни двойни серумни проби, както и проследяемост във времето.

При 11.4% (5/44) от CMV инфектираните пациенти с различни видове лимфоми, доказахме наличие на специфични anti-CMV IgM, за което също няма еднозначна интерпретация. Би могло да се тълкува като остра инфекция (особено при висок титър на IgM) или като реактивация на хроничната латентна инфекция. Значението на този маркер е несигурно, тъй като той се позитивира неспецифично при пациенти със съпътстваща EBV инфекция или при такива, подложени на кортикостероидна терапия (Miendje Deyi Y 2000). Описва се продължително задържане с години на този маркер в кръвта след остра инфекция, каквито случаи сме наблюдавали през годините нееднократно и в нашата лабораторна практика. При тези 5 anti-CMV IgM позитивни пациенти не установихме високи титри на антителата при полуколичественото измерване в ELISA. Всички се движеха в интервала $1,2 R \div 2 R$ (средно $1.52 R$) $> 1.1 R$, което ни насочва по-скоро към предположението за реактивация на инфекцията, или интерференция с кортикостероидната терапия, която им е прилагана, отколкото за първична инфекция с продължителна персистенция на IgM отговора. Средноаритметичният титърът на специфичните anti CMV IgG антитела при тези 5 пациента, суспектни за реактивация, беше висок - 184.6 RU/ml, и по-висок от общия средноаритметичния титър на CMV инфектираните пациенти с различни видове лимфоми - 152.1 RU/ml (SD ±66.9). При липса на последователни двойни и тройни серумни проби, и вероятността за неспецифично позитивиране на IgM имунния отговор, и този маркер се оказва недостатъчен за еднозначно тълкуване. Гореизложеното налага търсенето на по-сигурни лабораторно-диагностични методи за доказване на CMV реактивация. Въпреки, че CMV pp65 антигенемия реакцията е широко използвана по света като метод за мониториране на CMV инфекцията, тя има някои ограничения и недостатъци, като необходимостта от незабавно обработване на пробите в лабораторията и липсата на стандартизация, касаеща тази обработка; трудоемкост и времеемкост; необективност в

околичествяването. Процедурата изисква адекватен брой левкоцити в кръвта на конкретния пациент (Choi SM 2009).

Ние се спряхме на QRT PCR за откриване и околичествяване на CMV-DNA в плазма на пациентите с различни видове лимфоми. Избрахме този метод, като бърз и надежден, също така и поради факта, че 12.5% (5/40) от пациентите с НХЛ бяха с левкопения (табл. 14). Други методи, като CMV pp65 антигенемия, не биха били достатъчно показателни за всички пациенти от нашето проучване. Резултатът при този метод се съобщава в брой CMV инфектирани клетки на 1 000 000 бели кръвни клетки. В този смисъл, изисква наличие на адекватен брой бели кръвни клетки.

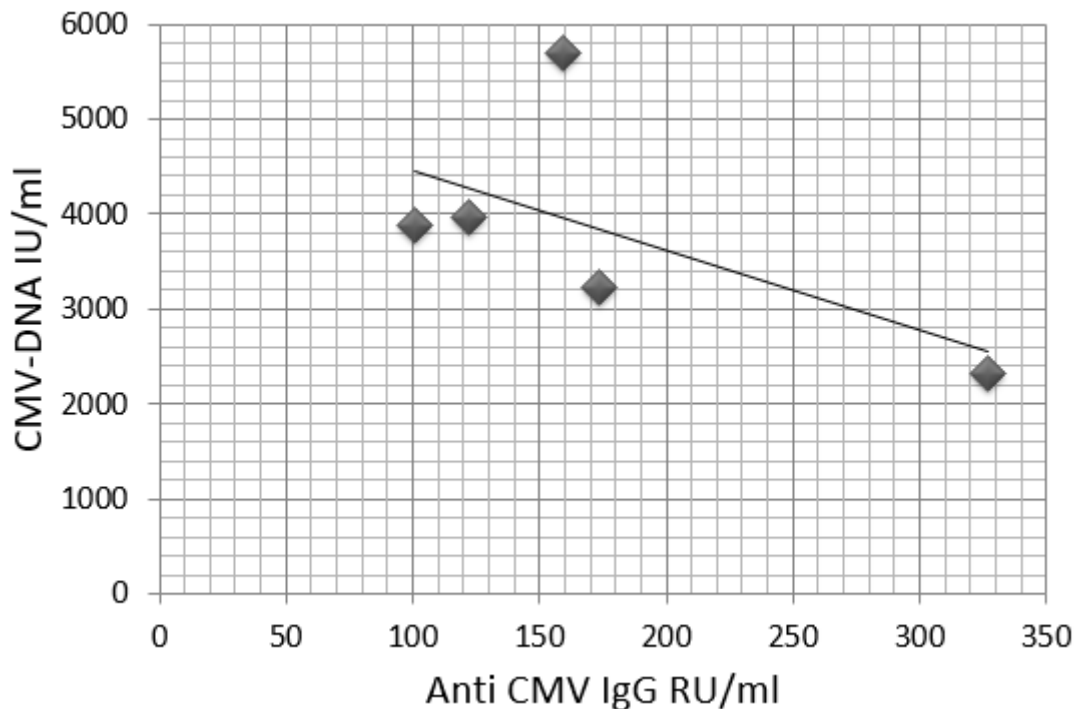
В RT-PCR на 50 пациента с различни видове лимфоми доказахме CMV-DNA в плазмените проби на 5 пациента (10%; 95% CI: 1.6% - 18.3%). Очаквано не установихме позитивни резултати при шестимата серонегативни в ELISA пациенти. От групата на серопозитивните пациенти, откриваем вирусен товар имаха 5/44 пациента (11.4%, 95% CI: 2.01% - 20.79%). Ние предполагахме, че е по-вероятно да докажем вирусен товар в групата на anti-CMV IgM позитивните пациенти, но обратно на очакванията, нито един от тях не даде позитивен резултат в RT-PCR. Вирусна репликация при тях не се доказва, следователно наличието или отсъствието на anti-CMV IgM не може да се използва надеждно като маркер за установяване на CMV реактивация. Не установихме връзка между anti-CMV IgM положителните резултати и наличие на CMV-DNA в плазмените проби на пациентите. Навярно в тези случаи се касае по-скоро за продължително задържащ се IgM имунен отговор, или дори за фалшиво позитивен резултат в ELISA. Въпросът може да се реши според някои автори с провеждане на допълнителен Western blot (WB) анализ (Lazarotto T 1996). В това проучване се посочва именно, че наблюдаваното съответствие между IgM, открити в WB, и резултатите, получени при вирусологичното откриване на HCMV (документирано на база изолация, антигенемия pp65 или PCR), е значително по-високо (88.7%) отколкото съответствие между IgM, открито с конвенционална ELISA и вирусологичните резултати (67.5%).

Серологичният профил на петте пациента, дали положителен вирусен товар в PCR, беше anti-CMV IgM-/IgG+ (табл. 26). Всички имаха висок титър в ELISA > 100 RU/ml, в обхват 101 - 327 RU/ml (средноаритметичен титър 176.4 RU/ml), по-висок от общия средноаритметичния титър на PCR негативните anti-CMV IgG позитивни (n=39) пациенти с различни видове

лимфоми - 149 RU/ml (SD \pm 64.4).

Установеният вирусен товар при положителните пациенти беше в обхват 2 332 IU/ml – 5 688 IU/ml (средноаритметична стойност 3 817.2 IU/ml) и е представен на графика 7, в корелация с титъра на специфичните IgG антитела в ELISA. Не установихме модел на обратна зависимост между количеството anti-CMV IgG в RU/ml и установения вирусен товар в RT-PCR в IU/ml при всички позитивни пациенти. Въпреки това можем да подчертаем, че пациентът с най-висок титър на anti-CMV IgG (327 RU/ml), беше с най-нисък вирусен товар (2 332 IU/ml) от PCR позитивните. Подобна тенденция наблюдавахме и при мониторирането на реципиентите след бъбречна трансплантация.

Графика 7. CMV-вирусен товар в RT-PCR и anti-CMV IgG в ELISA при позитивните пациенти с лимфоми.



Всички 5 положителни в PCR пациенти бяха от мъжки пол (100%), на възраст от 44 до 76 г., средна възраст 63.4 години, значително по-висока от тази на общо установената в проучването средна възраст - 52.56 г. (SD \pm 13,92). Въпреки не големия брой пациенти в нашето проучване, мъжкият пол и високата възраст се оказват рискови по отношение на CMV реактивация при пациентите с различни видове лимфоми.

Всички 5 положителни в PCR пациенти бяха с клинична диагноза Неходжкинов лимфом (100%). При пациентите с Ходжкинов лимфом не установихме пациенти с DNA-емия - 0/9 (0%). При използването на T-test за сравняване на две независими пропорции получихме статистически значима разлика с $p = 0.01088$.

Четирима от позитивните в PCR пациенти (80%) към момента на установяването на позитивен вирусен товар вече бяха започнали антинеопластична терапия. Тя би могла да се приеме като допълнителен рисков фактор за CMV реактивация, съвместно с увредения клетъчно-медиран имунитет поради основното заболяване. Счита се, по литературни данни, че съвременната антинеопластична терапия има по-малко странични ефекти от конвенционалната терапия (Rummel MJ 2005). Рискът от тежки инфекции, като странична реакция на съвременната терапия с алкилиращи агенти е по-нисък в сравнение с конвенционалната цитостатична терапия. Въпреки това, са регистрирани често срещани случаи на лимфоцитопения, с особено редуциран брой на CD4+ Т-клетките. Така се увеличава рискът от опортюнистични инфекции. Описани са няколко случая на CMV реактивация в ретроспективни проучвания на пациенти на лечение със съвременни алкилиращи агенти (Hosoda T 2013, Kotton CN 2013, Lim SH 2012).

Едно проучване на 38 пациенти с диагноза нискодиференциран В-клетъчен лимфом, лекувани с Bendamustine (съвременен алкилиращ агент), установява честота на CMV реактивация с използване на pp65 антигенемия тест в 10.5% от пациентите, без да се развие крайно-органно заболяване (Isono N 2016). Нашето проучване установи обща честота от 10% (5/50), но ако разглеждаме само серопозитивните пациенти с лимфоми $n=44$, то установената от нас честота на реактивация с RT-PCR е 11.4% (5/44) (95% CI: 2.01% - 20.79%). В последните години RT-PCR се посочва като референтен метод за мониториране на CMV инфекцията при реципиенти след трансплантация и имunosупресирани пациенти, тъй като има репутация на надежден количествен метод (Pillet S 2014).

4.2.5. Проспективно проучване на CMV инфекция/реактивация при трансплантирани реципиенти.

4.2.5.1 Скрининг и мониторинг на CMV инфекцията при пациенти след бъбречна трансплантация.

Поставихме си следните цели в това проучване:

- 1) Да извършим скрининг за инфектираност с CMV на потенциални бъбречни реципиенти и техните донори, и да определим рисковите групи по отношение на първична CMV инфекция/реинфекция.
- 2) Да се мониторираме CMV инфекцията при пациенти след бъбречна трансплантация, както със серологичен (ELISA) метод, така и с количествен RT-PCR за да се оцени честотата на CMV реактивация при тази рискова група.

Описание на извадката:

Пациентите бяха разделени в две групи:

Група А включва 20 потенциални бъбречни реципиента, средна възраст 33.15 г. (SD±6.26), от които 11 мъже и 9 жени и 29 потенциални бъбречни донори, средна възраст 55 г. (SD±8.24), от които 15 мъже и 14 жени за скринингово определяне на серологичният CMV статус в ELISA.

Група В включва 30 възрастни реципиенти на бъбреци, средна възраст 41.76 г. (SD±10.69), от които 14 мъже и 16 жени. CMV инфекцията на реципиентите мониторирахме в ELISA и QRT-PCR за периода от 09.2015 до 10.2017 г. От реципиентите бяха получени общо 65 плазмени проби. Дванадесет от реципиентите бяха изследвани еднократно. Осемнадесет от реципиентите бяха изследвани повече от веднъж на регулярни интервали след трансплантацията и/или при поискване от наблюдаващите клинични лекари нефролози при наличие на съмнение за реактивация на инфекцията (табл. 18).

Таблица 18. Кратност на изследванията и общ брой изследвания в бъбречни реципиенти (n=30).

Брой пациенти (n=30)	Брой анализи на пациент (средно x 2,17)	Общ брой анализи (n=65)
12	x1	12
9	x2	18
6	x3	18
2	x5	10
1	x7	7

Резултати и обсъждане:

В група А нямаше anti CMV IgM позитивни резултати в

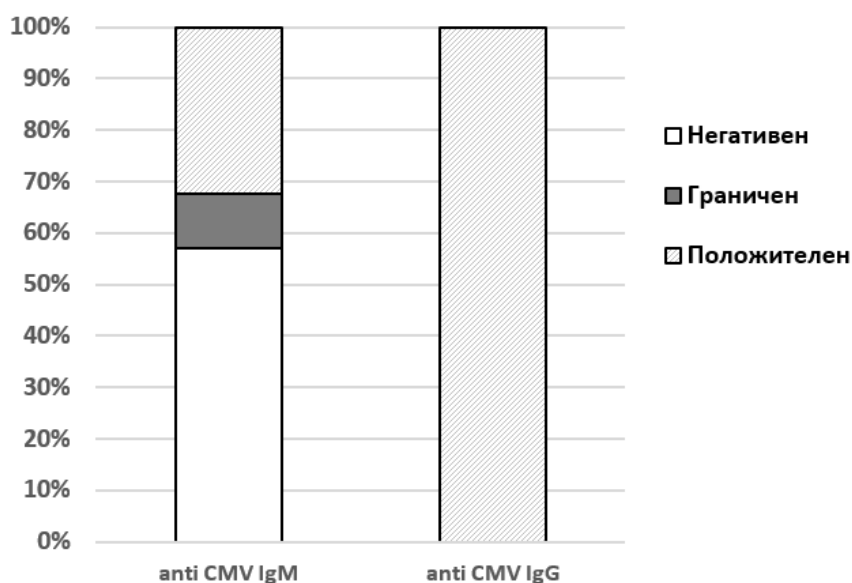
предварителния скрининг, а серологичните резултати от CMV скрининга за IgG показаха следните резултати (табл. 19).

Таблица 19. Резултати от предварителен серологичен скрининг на потенциални реципиенти и донори.

	Anti CMV IgG (-)	Anti CMV IgG (+)
Потенциални реципиенти (n=20)	4 (20%, 95% CI: 2.5 - 37.5)	16 (80%, 95% CI: 62.5 - 97.5)
Потенциални донори (n=29)	1 (3.5%, 95% CI: -3.2 - 10.2)	28 (96.5%, 95% CI: 89.8 - 103.2)

В група В серологичните изследвания на реципиентите на бъбреци от общо изследвани 65 плазмени проби показаха следните резултати: 37 (56.9%, 95% CI: 44.86% - 68.94%) от пробите показват негативни резултати за anti-CMV IgM, 7 (10.7%, 95% CI: 3.19% - 18.21%) гранични резултати и 21 (32.3%, 95% CI: 20.93% - 43.67%) anti-CMV IgM положителни резултати. Всички 65 (100%) плазмени проби показват anti-CMV IgG положителни резултати (графика 8).

Графика 8. Резултати от серологичния мониторинг на проби от бъбречни реципиенти, n=65.



При изследване в RT-PCR на реципиентите от група В, CMV-DNA открихме при общо 5/30 (16.66%, 95%CI: 3.33% -29.99%). Останалите 25 реципиенти бяха с неоткриваем вирусен товар. При калкулирането на резултатите спрямо брой проби от общо проведените 65 QRT-PCR анализа за откриване на CMV-DNA показват 8 (12.31%, 95% CI: 4.32% - 20.28%) положителни проби и 57 (87.69%, 95% CI: 79.72% - 95.68%) отрицателни проби.

Репликация на CMV открихме в 8 плазмени проби на общо 5 бъбречни реципиента, изследвани в различно време след трансплантацията - от 20 дни до почти 8 години. Съставихме резюме от демографските характеристики на тези с позитивен вирусен товар в съчетание със серологични, вирусологични и клинични данни, съотнесени към времето след трансплантацията (табл. 20). Останалите 57 плазмени проби бяха с неоткриваем вирусен товар, въпреки положителните резултати за anti-CMV IgM в ELISA при 16 от тях (табл. 21).

Таблица 20. Резюме за бъбречните реципиенти с позитивен вирусен товар.

Пол/ Пациент	Възраст	Време след БТ	Вирусен товар	Серологичен резултат	Свързани симптоми
1. Жена (АРБ)	34	20 дни	6000 IU/ml	CMV IgM-/ CMV IgG +	Висока температура
2. Мъж (АМХ)	31	3 г.	123 IU/ml	CMV IgM+/ CMV IgG +	Висока температура, повишен креатинин и инфекция на уринарния такт
3. Мъж (КСМ)	35	1 г.	227 IU/ml	CMV IgM-/ CMV IgG +	Без оплаквания
4. Мъж (ЙКЙ)	34	6 м.	838 IU/ml	CMV IgM-/ CMV IgG +	Без оплаквания
5. Жена (НСН)	32	6 г. 6 м.	538 IU/ml	CMV IgM+/ CMV IgG +	Фебрилитет, отпадналост

33	7 г. 3 м.	832 IU/ml	CMV IgM+/ CMV IgG +	Отпадналост, рецидивиращ лабиален херпес
33	7 г. 6 м.	1370 IU/ml	CMV IgM+/ CMV IgG +	Висока температура, повишен креатинин и инфекция на уринарния такт
33	8 г.	2074 IU/ml	CMV IgM+/ CMV IgG +	Фебрилитет, отпадналост

Таблица 21. Сравнителни резултати в ELISA и QRT PCR на изследваните 65 плазмени проби от бъбречни реципиенти.

Anti-CMV IgM			Anti-CMV IgG Позитивен (+)	CMV-PCR (-) Негативен	CMV-PCR (+) Позитивен
Негативен (-)	Граничен (+/-)	Позитивен (+)			
37/65 (56.9%)	7/65 (10.7%)	21/65 (32.3%)	65/65 (100%)	57/65 (87.69%)	8/65 (12.31%)

Обсъждане:

Понастоящем се счита, че CMV инфекцията е често срещана при реципиенти след бъбречна трансплантация, но това първо е било документирано морфологично през 1964 година с описание на цитомегаловирусни пневмонии в шест бъбречно-трансплантирани реципиенти (Rifkind D 1964). По-късно, през 1965 година вирусът бил изолиран от бъбречно-трансплантирани реципиенти (Hedley-Whyte ET 1965, Rifkind D 1965). И още в следващата 1966 година е докладвана CMV инклузионна болест при аутопсия на 8/25 (32%) бъбречно-трансплантирани реципиенти на имunosупресивна терапия (Kanich RE 1966).

При имунокомпетентни индивиди CMV инфекцията е доброкачествена, субклинична, с липса на откриваем вирус, което е отличителен белег на латентната инфекция. Обратно, реактивирането от латентност при имунокомпрометирани индивиди може да доведе до животозастрашаващи крайно-органи заболявания (Sinclair J 2008). Първичната CMV инфекция, реинфекция от донорния орган, или нейното

реактивиране, е една от най-честите опортюнистични инфекции след бъбречна трансплантация и може да представлява риск за остро отхвърляне на донорния орган при бъбречни реципиенти (Giakoustidis D 2012). CMV води до значителна заболеваемост и смъртност след бъбречна трансплантация. Развитието на тежки инвазивни форми е рядко в днешно време с провеждането на пост-трансплантационния мониторинг, профилактичните режими при високорисковите пациенти и ранното превантивно лечение с Ганцикловир (Ramanan P 2013). За да се намали въздействието на CMV след трансплантацията, са направени забележителни усилия за подобряване на диагностиката, профилактиката и лечението. Въпреки този значителен напредък, CMV продължава да оказва голямо влияние върху преживяемостта на пациентите и алографта при бъбречно трансплантираните пациенти чрез различни преки и косвени ефекти (Rubin RH 2007).

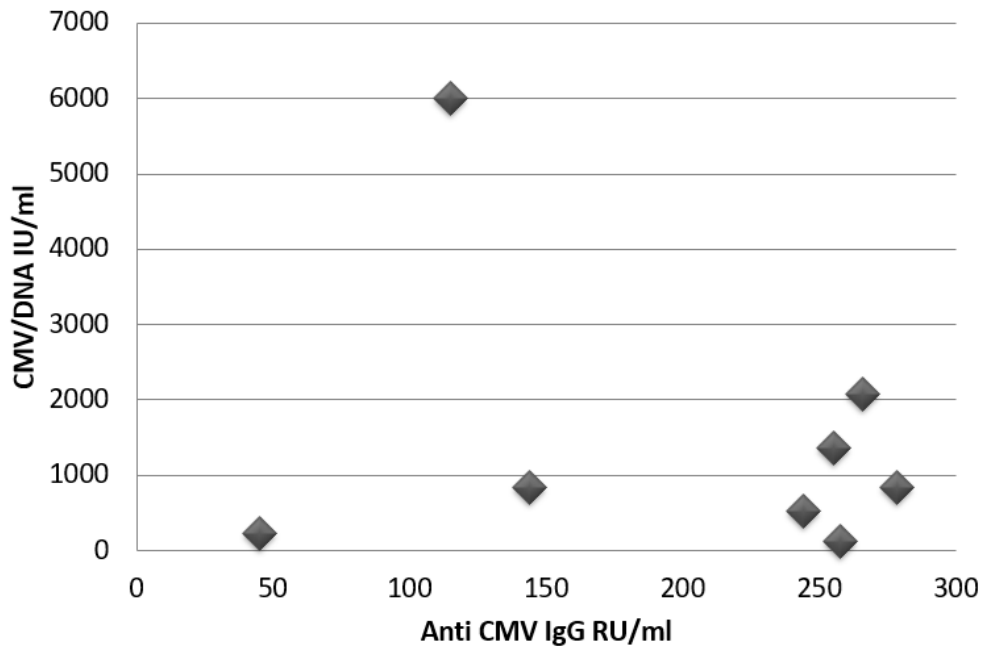
Според нашите данни CMV инфекцията е широко разпространена в България с обща серопревалентност 78.4% в населението от Североизточна България (Stoykova Zh 2016). Такава висока серопревалентност може да има дълбок ефект върху CMV заболеваемостта и инвазивната CMV болест след трансплантация. Това ни задължава да провеждаме скрининг за идентификация на високорискови пациенти преди трансплантация и регулярен мониторинг на трансплантираните пациенти, въпреки затрудненията при съгласуването на клиничко-лабораторните визити. Лабораторно потвърждение на CMV реактивация/заболяване се налага при случаи на общо неразположение, повишена температура, левкопения и засягане на крайни органи, когато не може да се открие друга очевидна причина и ако има клиничен отговор при намаляване на имуносупресията или от лечението с Ганцикловир (Ljungman P 2002).

Рискът от развитие на CMV заболяване е най-висок в случаите на първична инфекция при серонегативни трансплантирани реципиенти с трансплантиран орган от серопозитивния донор (D +/- R-) (Egli A 2007). В нашето изследване при скрининга на потенциални реципиенти и техните донори, само 4/20 (20%) от реципиентите са изложени на висок риск от първична инфекция след трансплантация, когато получат бъбрек от серопозитивен донор. Други автори съобщават подобен резултат, а именно 23% от пациентите след бъбречна трансплантация принадлежат към групата с висок риск по отношение на първична CMV инфекция (Carstens J 2006). В

нашето изследване установихме висок вирусен товар (6000 IU/ml) 20 дни след трансплантацията при един от реципиентите, идентифициран предтрансплантационно като високо рисков. Пациентката в последствие претърпя сероконверсия. В допълнителни две изследвания по-късно, проведени на втория месец след трансплантацията и 2 години след това, получихме негативен PCR резултат. Останалите трима високорискови серонегативни пациенти претърпяха сероконверсия след трансплантацията с доказване на anti CMV IgG. В техни плазмените проби от различните клинично-лабораторни визити след трансплантацията не се откри вирусна репликация. Останалите 16 потенциални реципиента и техните потенциални донори бяха положителни в теста за определяне на anti CMV IgG. Поради съществуващия предхождащ специфичен имуен отговор, те не бяха изложени на висок риск от развиване на първична CMV инфекция и инвазивно CMV заболяване. Реинфекция, внесена с трансплантирания орган, и/или реактивация на съществуващата инфекция е по-вероятно да възникне в тези случаи. Такава възможност възниква при 30% - 80% от пациентите, подложени на трансплантация на солидни органи по литературни данни. Честотата и наличието на симптоми варират в зависимост от вида на трансплантацията, наличието на рискови фактори и използваните профилактични стратегии (Aguado JM 2012). В друго проучване, проведено в център за бъбречни трансплантации в Китай, общата честота на реактивиране на CMV сред 319 пациенти след бъбречна трансплантация е установена като 8.8% с количествен RT-PCR. Пациентите от това проучване в рамките на два периода - от 3 до 6 месеца и от 5 до 10 години след трансплантацията са имали по-често епизоди на CMV реактивация (Feng S 2016). В друго проучване, проведено в Гърция сред 592 бъбречни реципиенти, тоталната честота на CMV реактивация, установена с RT PCR е била 12.8% - 76/592 (Giakoustidis D 2012). Броят на тестваните при нас пациенти е малък - 30, но положителните резултати от QRT-PCR анализите са в същите периоди след трансплантацията и с подобна честота (табл. 29 и 30). Отнесено към броя пациенти, установената от нас честота на CMV реактивация е 5/30 пациента или 16.66% (95% CI: 3.33% - 29.99%).

Позитивните 8 проби в QRT PCR от общо 5 пациента са представени сравнително с техните кореспондиращи титри в ELISA (графика 9).

Графика 9. CMV-вирусен товар в RT-PCR и anti-CMV IgG в ELISA при позитивните бъбречни реципиенти.



Въпреки малкият брой позитивни проби в PCR ($n=8$) установихме, че преобладават проби с невисок вирусен товар (в обхват 123 - 2074 IU/ml), които кореспондират с високи титри на специфичните anti-CMV IgG антитела в порядъка 250-300 RU/ml. Това ни дава основание да допуснем, че високият титър на специфичните IgG антитела при тази група реципиенти, все пак не позволява да се развият твърде високи нива на вирусна репликация. Най-високо положителната проба, която установихме в PCR (6000 IU/ml) има кореспондиращ титър в ELISA 115 RU/ml, който е около три пъти по-нисък в сравнение с титрите на реципиентите от основната група.

Таблица 22. Резултати при PCR негативни ($n=57$) и при PCR позитивни проби ($n=8$) на реципиенти с кореспондиращите им титри на anti-CMV IgG в ELISA.

	Общ средноаритметичен титър на плазмените проби $n= 65$	Средноаритметичен титър на PCR (-) плазмени проби $n=57$	Средноаритметичен титър на PCR (+) плазмени проби $n=8$
Anti-CMV IgG	183,1 RU/ml	180,6 RU/ml	200,5 RU/ml

От друга страна, от представените в таблица 22 обобщени резултати прави впечатление по-високият средноаритметичен титър в ELISA на позитивните в PCR 8 проби (200.5 RU/ml), в сравнение с този на PCR негативните 57 проби (180.6 RU/ml), т.е. антителата се синтезират и натрупват във високи титри при активна цитомегаловирусна инфекция.

За 60% (18/30) от бъбречно трансплантираните реципиенти бяха проведени многократни серологични (anti CMV IgM, anti CMV IgG) и RT-PCR изследвания, но представяме лонгитодиналните резултати на най-често мониторираните трима от тях, за да направим изводи за значението и информативността на всеки от използваните методи (табл. 23, 24, 25).

Таблица 23. Пациент АМХ, 33 г., мъж.

Време след бъбречна трансплантация	Anti CMV IgM (>1.1 R, положителен)	Anti CMV IgG (>22 RU/ml, положителен)	CMV-DNA (IU/ml)
2 г.	(+) 1.8	(+) 270	Не се открива
2 г. 8 м.	(+) 1.6	(+) 257	Не се открива
2 г. 9 м.	(+) 1.6	(+) 257	(+) 123
3 г.	(+) 1.6	(+) 286	Не се открива
4 г.	(±) 0.95	(+) 272	Не се открива

Първият пациент е мъж с хронична бъбречна недостатъчност, претърпял бъбречна трансплантация от родствен донор през 2013 г., на 29 годишна възраст. Преди трансплантацията, серологичният статус на донор и реципиент показват anti-CMV IgG позитивност. При мониторирането на този пациент след трансплантацията, той запазва anti CMV IgM позитивен имунен отговор през цялото време, без съществена динамика в anti CMV IgG титрите на антителата (диапазон от 257 до 286 RU/ml), но в една от пробите даде позитивен PCR резултат 2 години и 9 месеца след трансплантацията.

Таблица 24. Пациент ТТС, 46 г., жена.

Време след бъбречна трансплантация	Anti CMV IgM (>1.1 R, положителен)	Anti CMV IgG (>22 RU/ml, положителен)	CMV-DNA (IU/ml)
1 м.	(+) 1.8	(+) 154	Не се открива
2 м.	(+) 1.5	(+) 220	Не се открива
3 м.	(+) 1.8	(+) 181	Не се открива
6 м.	(+) 1.2	(+) 223	Не се открива
1 г.	(±) 0.9	(+) 208	Не се открива

Вторият пациент е жена с хронична бъбречна недостатъчност, претърпяла бъбречна трансплантация през 2016 г. от неродствен съвместим донор на 44 годишна възраст. Преди трансплантацията, серологичният статус на донор и реципиент показват anti-CMV IgG позитивност. При мониторирането на тази пациентка след трансплантацията, тя също през цялото време запазва anti CMV IgM позитивен имуен отговор, но при по-значима динамика в anti CMV IgG титрите на антителата (диапазон от 154 до 223 RU/ml). Въпреки тази динамика, в нейните плазмени проби никога не се открие CMV-DNA.

Таблица 25. Пациент НСН, 33 г., жена.

Време след бъбречна трансплантация	Anti CMV IgM (>1.1 R, положителен)	Anti CMV IgG (>22 RU/ml, положителен)	CMV-DNA (IU/ml)
6 г.	(+) 2,6	(+) 252	Не се открива
6 г. 6 м.	(+) 4	(+) 244	(+) 538
7 г.	(+) 1.7	(+) 228	Не се открива
7 г. 3 м.	(+) 1.4	(+) 278	(+) 832
7 г. 6 м.	(+) 1.3	(+) 255	(+) 1370
7 г. 9 м.	(+) 1.5	(+) 254	Не се открива
8 г.	(+) 1.4	(+) 266	(+) 2074

Третият пациент е жена с хронична бъбречна недостатъчност, претърпяла трансплантация през 2009 г. от родствен донор на 25 годишна

възраст. Преди трансплантацията, серологичният статус на донор и реципиент показват anti-CMV IgG позитивност. Това е най-дълго проследяваната пациентка в нашето проучване. При седемкратното тестване също така винаги се запазва anti CMV IgM позитивен резултат при несъществена динамика в anti CMV IgG титрите на антителата (диапазон от 228 до 278 RU/ml). При нея наблюдавахме редуване на позитивни резултати в PCR, последвани от противовирусно лечение и последващо негативиране на резултата. При едно от проследяванията регистрирахме по-съществено повишаване нивото на вирусния товар (от 832 IU/ml до 1370 IU/ml), което беше в резултат на самоволно спиране на противовирусното лечение поради настъпил в хода стомашно-чревно разстройство и общо неразположение. След регистрираното от нас повишаване на вирусния товар, лечението беше подновено и последвалата плазмена проба даде негативен резултат в PCR. В последната за сега изследвана от нас плазмена проба отново констатирахме позитивен резултат.

Серологичните методи за откриване на антитела срещу CMV обикновено се използват в диагностичните лаборатории в нашата страна масово. Ключов диагностичен въпрос при тази инфекция обаче, е разграничаването между активното заболяване и латентна инфекция (Rubin RN 2007). При тези пациенти, серологичните CMV маркери имат информативна стойност преди трансплантацията, и могат да бъдат използвани за оценка на риска от CMV заболяване впоследствие (Heemann U 2002). След трансплантацията се счита, че имат само ограничена стойност. Проучванията, проведени от Flechner и съавтори (Flechner SM 1999) и Prieser и съавтори (Prieser W 2001) обобщават, че серологичните тестове нямат стойност при диагностициране на реактивацията на CMV инфекцията при пациенти след трансплантация. В някои случаи антителата може да не се синтезират поради имunosупресия, или да се откриват, след като заболяването вече е претърпяло обратно развитие, или може да продължат да се позитивират в продължение на години. Подобни резултати наблюдавахме и в нашето проучване. Една пациентка от тези, проследявани многократно, 8 години след трансплантацията показва позитивен anti CMV IgM имунен отговор. Обяснение може да се търси и в съпътстващата след трансплантация кортикостероидна терапия в намаляващи дози.

В нашето проучване, общата честота на CMV реактивация, дефинирана в QRT-PCR според изследваните плазмени проби е 12.31% (8/65). При

съотнасяне към изследваните общо 30 бъбречно трансплантирани пациенти, тя е 16.66% (95%CI: 3.33% - 29.99%, n=5). При проследяване на случаите с позитивен anti-CMV IgM имунен отговор, получихме серологични данни за реактивиране на инфекцията в 32.3% от същите изследвани плазмени проби. От друга страна 5 от 8-те положителни проби в QRT PCR са едновременно anti-CMV IgM позитивни в един или повече от един епизоди на пациент. Поради това считаме, че положителните IgM серологични резултати, допълнени със суспектни клинични данни, са показателни в някои случаи и винаги изискват допълнителен QRT-PCR анализ.

4.2.5.2. Проспективно проучване на CMV инфекцията при пациенти след автоложна и алогенна трансплантация на хемопоетични стволови клетки (ТХСК).

В настоящото проучване си поставихме следните цели:

- 1) Да определим серологичния CMV статус на пациенти, подготвени за ТХСК в ELISA.
- 2) Да мониторираме пациентите в посттрансплантационния период за определяне честотата на реактивация на латентната CMV инфекция и/или реинфекция в QRT-PCR и паралелно в ELISA.

CMV инфекция при пациенти след автоложна ТХСК

Описание на извадката:

Изследвахме 5 пациента преди и след автоложна ТХСК. Първоначалните данни относно серологичния CMV статус в ELISA бяха уточнени 1 седмица преди самата автоложна ТХСК съобразно поставената цел. В рамките на първия месец след трансплантацията пациентите бяха проследени в ELISA и QRT-PCR. Двама от пациентите бяха с клинична диагноза множествен миелом, един - с абдоминален невробластом, един - с Болест на Ходжкин и един - с прекурсорен Т-клетъчен лимфом.

Демографска характеристика:

Възрастта на пациентите, взели участие в проучването, беше в обхват от 6 до 60 г., средна възраст 41.2 г. (SD \pm 21.88). Преобладаваха мъжете 80% (95% CI: 44.94% - 115.06%, n=4). Единствената пациентка е момиче на 6 г. 20% (95% CI: 15.06% - 55.06%, n=1) (табл. 26).

Таблица 26. Разпределение на пациентите с автоложна ТХСК по възраст и пол.

Пол	n	Мин. възраст	Макс. възраст	Средна възраст	Стандартно отклонение
Мъже	4	39	60	50	SD±11.04
Жени	1	6	6	6	
Общо	5	6	60	41.2	SD±21.88

Резултати:

Серологичен предтрансплантационен скрининг.

Всички пациенти бяха изследвани в ELISA за наличие на специфични CMV антитела от двата типа една седмица преди манипулацията, представляваща вливане на съхранени посредством дълбоко замразяване и криопротектант собствени мобилизирани периферни стволови клетки. При четирима от пациентите серологичният профил показва anti-CMV IgM негативност, anti-CMV IgG позитивност. Количеството на специфичните IgG антитела е в обхват 53 RU/ml - 232 RU/ml (>22 RU/ml). Един от пациентите, мъж на 42 г., показва негативни резултати по отношение двата типа специфични антитела.

Посттрансплантационен мониторинг на пациентите след автоложна ТХСК.

Един месец след трансплантацията не установихме промяна в серологичните профили в ELISA на всичките пет пациента. Отклонението в титрите на специфичните IgG антитела беше в рамките на вътрелабораторните вариации.

Резултати от посттрансплантационното приложение на QRT-PCR при реципиентите показва неоткриваем вирусен товар в 80% (95% CI: 44.94% - 115.06%, n=4) от случаите. При един от пациентите (20%, 95% CI: 15.06% - 55.06%) открихме ниско позитивен вирусен товар - 132 IU/ml., мъж на 39 г. и серологичен статус anti CMV IgM негативен / anti CMV IgG позитивен (53 RU/ml > 22 RU/ml).

Обсъждане:

Счита се, че честотата на CMV реактивация/заболяване след

автоложна ТХСК е значително по-ниска от тази след алогенна ТХСК (Jain T 2016). Но много автори публикуват резултати за значителен процент на CMV реактивация и дори крайноорганно заболяване именно след автоложна ТХСК. При ретроспективно проучване е анализирана честотата на реактивация и рисковите фактори, свързани с нея при 327 пациенти след автоложна ТХСК. Симптоматична CMV инфекция е доказана с честота 11% при възрастните пациенти с лимфом и миелом. Прилаган е количествен RT-PCR. Според това проучване предтрансплантационна anti Hbc Total позитивност и диагноза Т-клетъчен НХЛ трябва да се считат за независими предиктори на CMV реактивация (Marchesi F 2015). В нашата проучвана група пациенти не беше открит „скрит“ носител на хепатит В вирусна инфекция (anti Hbc Total серопозитивен), но положителен вирусен товар доказахме именно при пациент на 39 г. с Т-клетъчен лимфом. Според друго проучване на 136 пациенти след автоложна ТХСК, в 29.4% от пациентите (n=40) е доказана CMV реактивация с положителен pp65 антигенемия тест, средно 32 дни след реинфузията на стволовите клетки (Rossini F 2005). И в двете гореспоменати проучвания се касае за пациенти, които са били CMV серопозитивни преди трансплантацията и при нито един не са открити първични CMV инфекции. Групата от пациенти, която ние имахме възможността да изследваме след автоложна ТХСК е малка, но при един пациент (20%, 95% CI: -15.06% - 55.06%) открихме ниско позитивен вирусен товар (132 IU/ml) един месец след реинфузията на собствени стволови клетки. Серологичният профил на този пациент беше anti CMV IgM негативен/anti CMV IgG позитивен (53 RU/ml > 22 RU/ml). Титърът на anti CMV IgG е най-нисък в сравнение с тези на останалите 4 негативни в PCR пациенти. Въпреки, че мониторирането на CMV инфекцията след автоложна ТХСК не е включено като задължителна процедура, в литературата са описани дори фатални случаи на CMV заболяване след такава трансплантация. През 2006 г. в Унгария, след тежък кондициониращ режим, е проведена автоложна ТХСК при млада жена, страдаща от детството си от рефрактерен системен лупус еритематодес с тежко бъбречно, неврологично и костномозъчно въвличане, която за съжаление е екзистирала на ден 38 след трансплантацията, с картината на тежко CMV крайноорганно заболяване с пневмонит, хепатит, панцитопения и мултиорганна недостатъчност (Váróczy L 2012). Други автори описват случай на тежък CMV колит след автоложна ТХСК при пациент на 56 г. с

мултиплен IgG kappa миелом (Ramsey D 2000). Тези описани случаи говорят в полза на тезата, че не бива да се подценява ролята на CMV в посттрансплантационната заболяемост след автоложна ТХСК.

CMV инфекция при пациенти след алогенна ТХСК

Описание на извадката:

Изследвахме многократно 7 пациента (4 жени и 3 мъже), подложени на алогенна ТХСК, в общо 65 проби плазма. Шест от пациентите бяха с клинична диагноза остра миелоидна левкемия (ОМЛ) и един - с остра лимфобластна левкемия (ОЛЛ). Първоначалните данни за серологичния CMV статус на всички пациенти в ELISA уточнихме 1 месец преди самата ТХСК. Всички те показаха anti CMV IgG положителен резултат. След процедурата по трансплантация мониторирахме реципиентите всяка седмица в ELISA и QRT-PCR. По време на епизоди на CMV реактивация реципиентите бяха мониторирани по-често - 2 пъти седмично. Серологичният CMV статус на техните донори показва заразеност с вируса (anti-CMV IgG позитивност). Донор (D) / реципиент (R) бяха съвместими 10/10 по HLA. За шестима от трансплантираните пациенти донорът беше родствен (брат или сестра), а при един пациент - донорът беше неродствен. Пробите плазма (общо n=65) бяха събирани със съдействието на Клиниката по хематология на УМБАЛ „Света Марина“, Варна, където пациентите бяха хоспитализирани от юли 2016 до април 2018 г. Шестима от пациентите бяха трансплантирани и мониторирани посттрансплантационно в Клиниката по хематология на УМБАЛ „Света Марина“, Варна. Един пациент беше хоспитализиран по повод влошаване на състоянието след претърпени две алогенни трансплантации от родствен донор в СБАЛХЗ гр. София и последвали три рецидива на основното заболяване – остра миелоидна левкемия. Двама от пациентите починаха, което е причината за по-малкия брой изследвания при тях, съответно 1 и 5 изследвания в посттрансплантационния период (табл. 27).

Таблица 27. Клинични данни и общ брой изследвания за всеки пациент след алогенна ТХСК.

Пол	Възраст	Основна диагноза	Брой изследвания за реципиент	Изход
1.Жена*	34	ОМЛ	1	Exitus letalis с тежък GvHD
2.Мъж	43	ОЛЛ	5	Exitus letalis с тежък GvHD
3.Мъж	43	ОМЛ	20	Жив
4.Жена	58	ОМЛ	18	Жив
5.Мъж	55	ОМЛ	9	Жив
6.Жена	29	ОМЛ	7	Жив
7.Жена	39	ОМЛ	5	Жив
n=7	Средна възраст 43.0 г. (SD±10.5)		Общо n=65	

*двукратна (през 2 месеца) ало-ТХСК от същия родствен донор (поради наличие на graft failure след първата) е проведена в друг център в гр.София, след което пациентката е претърпяла 3 рецидива на основното заболяване в рамките на 3 години.

Демографска характеристика:

Пациентите в нашето проучване, са на възраст 29 г. - 58 г., средна възраст 43.0 г. (SD ±10.5). Преобладават жените 57.1% (95% CI: 20.44% - 93.76%, n=4). Мъжете съставляват 42.9% (95% CI: 6.24% - 79.56% , n=3) (табл. 28).

Таблица 28. Разпределение на пациентите с алогенна ТХСК по възраст и пол.

Пол	n	Мин. възраст	Макс. възраст	Средна възраст	Стандартно отклонение
Мъже	3	43	55	46	SD±6.93
Жени	4	29	58	40	SD±12.67
Общо	7	29	58	43.0	SD±10.5

Резултати:

Предварителен серологичен скрининг:

Всички пациенти (100%), бяха изследвани в ELISA за наличие на специфични CMV антитела от двата типа около месец преди вливането на стволовите клетки. Серологичният статус показва anti CMV IgM негативност / anti CMV IgG позитивност. Количеството на специфичните IgG антитела е в обхват 72 RU/ml - 160 RU/ml (>22 RU/ml, положителен).

Посттрансплантационен мониторинг на пациенти след аlogenна ТХСК:

Извършени са общо 65 ELISA и 65 RT-PCR анализа. Пациентите бяха проследени за средно 86.3 дни след трансплантацията (обхват от 7 до 231 дни), средно по 9.28 проби на пациент (обхват от 5 до 20 проби) бяха взети за анализ.

ELISA резултати:

Резултатите от тестовете за определяне на anti CMV IgM антитела показаха 53 (81.5%, 95% CI: 72.06% - 90.94%) негативни резултати, 2 (3.1%, 95% CI: -1.11% - 7.31%) - граничен резултат и 10 (15.4%, 95% CI: 6.63% - 24.17%) - положителен резултат.

Резултатите от тестовете за определяне на anti- CMV IgG антитела показаха общо 58 (89.2%, 95% CI: 81.65% - 96.75%) позитивни резултати и 3 (4.6%, 95% CI: -0.49% - 9.71%) - в гранична (сива зона) и 4 (6.2%, 95% CI: 0.34% - 12.06%) негативни резултата (след феномен на изчерпване). При една пациентка количеството на антителата в хода на мониторирането двукратно спаднаше постепенно до негативиране. Количеството на anti CMV IgG антителата е в обхват 23 RU/ml - 330 RU/ml, като стойности > 22 RU/ml се считат позитивни в използвания търговски тест. Преобладават пробите със стойности над 100 RU/ml (n=43, 66.2%, 95% CI: 54.7% - 77.7%).

PCR резултати:

При приложение на QRT-PCR установихме епизоди на активирана CMV инфекция, демонстрирана с позитивен вирусен товар в определени моменти от мониторинга при всички (100%) от реципиентите (n=7).

От общо 65 анализирани проби плазма за определяне количеството на CMV-DNA, 31 (47.69%, 95% CI: 35.55% - 59.83%) показаха позитивен резултат. Вирусният товар при тях се движеше в обхват 117 IU/ml - 53 762 IU/ml, средно 6235.71 IU/ml. Средното време за поява на първия позитивен PCR след трансплантация беше 40.5 дни.

Лонгитудиналният анализ на изследваните пациенти след алогенна ТХСК в ELISA и QRT-PCR е описан подробно в дисертацията.

Обсъждане:

Повече от 25 000 трансплантации на хематопоеични стволови клетки се провеждат всяка година за лечение на лимфоми, левкемия, имунодефицитни заболявания, вродени метаболитни дефекти, хемоглобинопатии, миелодиспластични и миелопролиферативни заболявания. Преди трансплантацията пациентите получават интензивна миелоаблативна химиотерапия. Автоложната ТХСК се извършва със собствени хематопоеични стволови клетки на пациента, които се събират предварително, замразяват се и се инфузират отново след миелоаблацията. При алогенната ТХСК се използва HLA-сходни стволови клетки получени от донор. Източници на стволови клетки могат да бъдат костен мозък, периферна кръв или кръв от пъпна връв. Преживяемостта след алогенна трансплантация зависи от много фактори, като съвместимостта между донор/реципиент, CMV- серологичния статус на донора и реципиента, отговора на присадката срещу приемника (GvH), развитието на ефекта на присадката срещу левкемията, както и от многото съпътстващи посттрансплантационния период инфекциозни усложнения (Hatzimichael E 2010). Цитомегаловирусното заболяване продължава да бъде важна причина за заболяемост и смъртност при реципиенти на хемопоеични стволови клетки. Това важи особено за пациентите след алогенна ТХСК, които са подложени на тежка имunosупресивна терапия. По литературни данни, след алогенна ТХСК, около 30% от пациентите получават реактивация на латентната CMV инфекция, обикновено в късния посттрансплантационен период (след ден 100) и е свързано с 46% смъртност (Woesckh M 2003). Дискутабилен остава въпросът за избора на метод за проследяване на реактивацията. Тестът за определяне на pp65 антигенемия е прилаган в много трансплантационни центрове като златен стандарт за мониториране на активна цитомегаловирусна инфекция. Положителният резултат се счита индикация за започване на преемптивна терапия при такива клинични случаи. Този тест обаче има редица недостатъци, защото изисква своевременна обработка на пробите, не може да се автоматизира и отчитането на резултата е субективно. Основен недостатък е неговата неприложимост по време на епизоди на тежка неутропения (Choi SM 2009). В някои случаи според литературата, тестът pp65 антигенемия може да

показва негативен резултат дори в присъствие на активно CMV заболяване (Ruell J 2007, Tanaka Y 2002). Счита се, че определянето на вирусен товар в плазма с помощта на Real time PCR има много предимства, защото позволява ранна детекция на активно CMV заболяване, мониторинг на отговора към антивирусни медикаменти, представлява предиктор на риска от възвръщане на вирусемията, появата на резистентни щамове и евентуално развитие на CMV заболяване (Emery VC 2000, Razonable RR 2002). QRT-PCR може да бъде използван надеждно за определяне момента за започване на преемптивната терапия. При едно рандомизирано клинично изпитване е направено сравнение между ДНК-емия cut off от 10 000 c/ml в цяла кръв и първа позитивна pp65 антигенемия проба за определяне началото на превантивна терапия на CMV инфекция при възрастни пациенти след трансплантация на хемопоетични стволови клетки. Резултатите от него показват, че използването на такъв cut-off значително намалява броя на пациентите, изискващи антивирусно лечение, като по този начин се спестява ненужното прилагане на медикаменти и се избягва евентуалното развитие на резистентни щамове (Gerna G 2008, Verkruyse LA 2006).

Съществуват някои противоречия относно това, кой е оптималният клиничен материал (плазма, цяла кръв, левкоцитна маса) за тестване, с цел инициация на преемптивна терапия. В литературата са публикувани противоречиви резултати по този въпрос (Gentile G 2006, Von Muller L 2007, Von Muller L 2002). Трудно е да се сравняват резултатите от различните проучвания, тъй като са използвани различни методи за изолация на нуклеиновите киселини и различни лабораторни недобре стандартизирани RT-PCR. Сравнително нови данни от аналитичното представяне на няколко високо чувствителни RT-PCR, търговски или лабораторно модифицирани потвърждават, че плазма и цяла кръв са еднакво подходящи за мониторинг на активна CMV инфекция след алогенна ТХСК (Caliendo AM 2007, Kalpoe JS 2004, Leruez-Ville M 2003). В нашите проучвания използвахме клиничен материал плазма и при двете групи реципиенти – след автоложна и след алогенна трансплантация. При 1/5 (20%, 95% CI: 15.06% - 55.06%) реципиенти след автоложна ТХСК открихме много ниско позитивен вирусен товар (132 IU/ml). При регулярния посттрансплантационен мониторинг на 7 реципиенти след алогенна ТХСК доказахме активна CMV репликация в един или повече епизоди при всичките пациенти (100%). При друго подобно проучване на 42 реципиента след алогенна ТХСК в RT-PCR

от плазма са доказани един или повече епизоди на активна CMV инфекция в 88% от пациентите (Gimeno C 2008). Нашият опит с пациенти след алогенна ТХСК е много по-малък и вероятно поради малкия брой (n=7) на проучваните пациенти резултатите не са статистически достоверни, но при всички тях доказахме реактивация в един или повече епизоди на пациент след трансплантацията. Средното време до поява на първия позитивен PCR резултат след трансплантацията изчислихме като 40.5 дни, подобно на времето, което са получили други автори при проучване на 34 реципиенти на стволови клетки, а именно 47 дни (Bieniek R 2011). Авторите докладват, че 94% от алогенно трансплантираните развиват CMV виремия в първите три месеца след трансплантацията, докато за 89% от реципиентите на солидни органи това се случва във времето от 3 до 12 месец след трансплантацията. Според авторите CMV вирусният товар не намалява бързо при лечение и при четвърт от мониторираните пациенти в рамките на 4 дни интервал, резултатът на практика се повтаря, което наблюдавахме и ние. Поради това авторите заключават, че CMV PCR за мониторинг на терапията не е нужно да се извършва повече от веднъж седмично.

5. ИЗВОДИ

5.1. ОБЩИ ЗАКЛЮЧЕНИЯ И ИЗВОДИ ОТ РЕТРОСПЕКТИВНОТО ПРОУЧВАНЕ:

1. Установихме в първо за страната мащабно проучване широко разпространение на CMV инфекцията в региона. Данните показват динамика в посока повишаване относителния дял на позитивните лица сред населението на Североизточна България. Независимо от причините, тенденцията е негативна.
2. Първичната CMV инфекция в региона започва много рано, с пик във възрастовия диапазон 2 г. - 5 г.
3. Женският пол е по-засегнат, както по отношение на заразеността, така и според честота на остри и/или реактивирани инфекции, включително жените в детородна възраст между 15 и 49 години.
4. Необходимо е да се провежда серологичен скрининг при рисковите групи пациенти - бременни жени, симптоматични новородени деца и имунонекомпетентни по различни поводи индивиди.
5. Проучена е ролята на CMV при голям брой новородените деца до

- 1 мес. с различна клинична симптоматика, което дефинира относителен дял на вродената инфекция (6.42%).
6. Дефиниран е висок относителен дял (25.7%) на вероятно интранатално или ранно постнатално инфектирани деца до 3 месечна възраст.
 7. Определени са таргетните групи за вторична профилактика и една ефективна ваксина в бъдеще - имунонекомпетентни индивиди (пациенти с онкохематологични заболявания, пациенти, живеещи с HIV инфекция) и бременни жени, или такива, които възнамеряват да забременяват.

5.2. ОБЩИ ЗАКЛЮЧЕНИЯ И ИЗВОДИ ОТ ПРОСПЕКТИВНОТО ПРОУЧВАНЕ:

1. Дефинирахме относителния дял на неинфектирани бременни жени в пряка опасност от развитие на първична майчина инфекция по време на бременността (13.2%), които се нуждаят от проследяване в хода на бременността за дефиниране на сероконверсия.
2. Доказахме висок индекс на IgG авидност при всички серопозитивни бременни жени, включително и при тези с anti CMV IgM позитивен резултат, което прави теста много надежден за определяне на давността на инфекцията и дефиниране на риска за трансмисия на вируса към плода.
3. Относителният дял на CMV инфекцията в неонаталната и ранната кърмаческа патология при симптоматични новородени деца в PCR показва устойчивост в сравнение с предходни проучвания и не бележи тенденция към редуциране.
4. ELISA-базираните тестове за дефиниране на активна CMV инфекция не са достатъчно индикативни при всички новородени деца, което прави RT PCR задължително съвременно изследване на всички суспектни след раждането.
5. Приложената от нас за първи път в България PCR техника за изследване на безсимптомна вродена CMV инфекция при клинично здрави новородени деца в клиничен материал слюнка позволи дефиниране на честотата ѝ (1.58%).
6. Установихме честотата на реактивация на CMV инфектираните пациенти с различни видове лимфоми (11.4%) с прилагане на RT

PCR техника.

7. Установихме честотата на CMV реактивация на инфектираните реципиенти на бъбрек в RT PCR техника (16.66%).
8. Установихме по-висока честота на CMV реактивация след ТХСК в сравнение с реципиентите на бъбрек, и много по-висока след аlogenна трансплантация (100%), в сравнение с автоложна трансплантация (20%).
9. Установихме средното време след аlogenна ТХСК до появата на първия позитивен PCR резултат (40.5 дни).
10. Според нас мониторирането на CMV инфекцията с помощта на надеждни и чувствителни лабораторни методи като RT PCR след трансплантация, определя в голяма степен решението за започване на преемптивна терапия и предотвратяване на CMV заболяване.

6. СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД:

Приноси с оригинален характер:

1. Направено е мащабно сероепидемиологично проучване върху разпространението на CMV инфекцията сред населението в Североизточна България в продължителен период на наблюдение и е установена динамика в серопревалентността в сравнение с предходни проучвания.
2. Дефинирано е влиянието на възрастта и пола върху началото на първичната инфекция.
3. Дефинирани са различни аспекти на инфекцията по отношение на заразеността на жените в детородна възраст, конгениталната CMV инфекция и инфекцията при имунонекомпетентни пациенти.
4. Дефинирани са рисковите групи бременни жени въз основа на серологични данни за инфектираност и определяне давността на инфекцията.
5. С прилагане на PCR техника от клиничен материал плазма е дефиниран относителният дял на CMV в неонаталната и ранната кърмаческа патология за първи път в страната.
6. За първи път в страната е приложен и потвърден като надежден клиничен материал слюнка за PCR анализ при клинично здрави и при симптоматични новородени деца.
7. Дефинирана е честотата на реактивация на CMV инфекцията при пациенти с лимфоми в RT PCR.

Приноси с потвърдителен характер:

1. Потвърдено е значението на серологичните методи при дефиниране на заразеност с CMV, в диагностиката на първичната CMV инфекция и за определянето на давността на инфекцията.
2. Потвърдена е необходимостта от въвеждане в рутинната практика на RT-PCR, като метод на избор при установяване на вирусна реактивация при пациенти под имunosупресия по повод основното заболяване, след трансплантация на солидни органи и хемопоеични стволови клетки, както и при новородени, суспектни за конгенитална инфекция.

Приноси с приложен характер:

1. Оценени са различни методи приложими в лабораторната диагностиката на CMV инфекциите при различни групи пациенти.
2. Въведен е в практиката широко използван по света съвременен лабораторен метод (RT PCR) за дефиниране и оценка на вирусна реактивация след органна и тъканна трансплантация, което дава възможност за преемптивна терапия, намаляване на усложненията, болничния престой и има полезно финансово измерение.
3. Въведен е в практиката неинвазивен и достъпен метод за скрининг на вродена цитомегаловирусна инфекция.
4. Разработен е алгоритъм за скрининг на бременни жени и мониториране на рисковите бременности.
5. Предложен е алгоритъм за изследване на новородени деца с данни за фетално страдание и недоносеност.

7. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА

1. **Stoykova Zh**, Ivanova L, Todorova T, Kostadinova Tc, Tsaneva-Damyanova D. Seroprevalence of Cytomegalovirus in the North-Eastern Bulgarian Population, 2003-2015, Acta Microbiologica Bulgarica, 2016, том 32, кн.3, 27-32.
2. **Stoykova Zh**, Ivanova L, Todorova T. The role of CMV in congenital and early postnatal disorders in north-eastern Bulgaria, Folia Medica 2017; 59(2), 298-302; doi: 10.1515/folmed-2017-0036.
3. **Stoykova Zh**, Ivanova L, Ikononov V, Teodorova I, Todorova T. Monitoring of CMV infection in kidney transplant recipients. J of IMAB. 2017 Oct-Dec;23(4):1834-1838. DOI:<https://doi.org/10.5272/jimab.2017234.1834>

8. СПИСЪК НА ДОКЛАДИ И ПОСТЕРИ ОТ ПРОВЕДЕНИ НАУЧНИ ФОРУМИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА

1. **Stoykova Zh**, Ivanova L, The role of CMV in congenital and early postnatal infections in Northeastern Bulgaria, Third Congress of Virology (Days of virology in Bulgaria) with International Participation, 2012, Sofia, October 25 – 27, Proceeding and Abstracts, p. 57.

2. **Stoykova Zh**, Ivanova L, Kostadinova Tc, Czankova G. The share of Cytomegalovirus (CMV) in congenital and early postnatal infections in northeastern Bulgaria. 5th Southeast European Conference on Chemotherapy and infection, October 16-19, 2014, Bled (Slovenia).
3. **Stoykova Zh**, Ivanova L, Cytomegalovirus infection and transplantation, 6th Southeast European Conference on Chemotherapy and Infection, Thessaloniki, Greece, 2015, November 13-15, Abstract.
4. **Stoykova Zh**, Ivanova L, Seroprevalence to Cytomegalovirus in the Bulgarian population 2003-2015, Fourth Congress of Virology (Days of virology in Bulgaria) with International Participation, 2016, Sofia, May 18 – 20, Proceeding and Abstracts, p. XXI.

9. УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ПРОЕКТИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА

Участие в научен проект номер 16004/2016 г., към Фонд Наука на Медицински университет - Варна, на тема: „Сероепидемиологични и молекулярно-генетични проучвания на цитомегаловирусната инфекция при рискови групи пациенти. Конгенитална цитомегаловирусна инфекция.“

Изказвам личната си и най-искрена благодарност на:

- ❖ Научния ми ръководител доц. д-р Лилия Иванова за ценните съвети и оказаната подкрепа по време на писане на дисертационния труд, както и за професионалното ми развитие.
- ❖ Екипите на Лаборатория Вирусология и Лаборатория Микробиология на УМБАЛ “Света Марина“ Варна за всеотдайната работа и оказаното съдействие при съхранение и изработване на пробите.
- ❖ Лаборатория Медицинска генетика, Клиника по Нефрология, Клиника по Хематология, Клиника по Детска онкохематология към УМБАЛ “Света Марина“ Варна и Отделение по Неонатология при СБАГАЛ „Проф. д-р Димитър Стаматов“ Варна, Родилните отделения на МБАЛ „Майчин дом“ и МБАЛ “Света Анна“ Варна за оказаното съдействие при събиране на пробите.
- ❖ Колегите ми от Катедра „Микробиология и вирусология“ на МУ-Варна за коректните взаимоотношения, насърчаването и подкрепата по време на писането на дисертационния труд.