



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **58449** (13) **U**  
(51) МПК (2011.01)  
**A61B 10/00**  
**G01N 33/483** (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

**(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ РЕПЛІКАТИВНИХ БЕЗСИМПТОМНИХ ФОРМ ЦИТОМЕГАЛОВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ У ВІЛ-ІНФІКОВАНИХ ЖІНОК РЕПРОДУКТИВНОГО ВІКУ, ВАГІТНИХ ТА НОВОНАРОДЖЕНИХ ДІТЕЙ**

1

(21) u2010111925

(22) 08.10.2010

(24) 11.04.2011

(46) 11.04.2011, Бюл.№ 7, 2011 р.

(72) МАТЕЙКО ГАЛИНА БОГДАНІВНА, ДИКИЙ БОГДАН МИКОЛАЙОВИЧ, ГРИЖАК ІГОР ГНАТОВИЧ, КОНДРИН ОКСАНА ЄВГЕНІВНА, ОСТЯК РОМАН СТЕПАНОВИЧ, ВОРОНОВА ВІКТОРІЯ ЮРІІВНА

(73) ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД "ІВАНО-ФРАНКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ", МАТЕЙКО ГАЛИНА БОГДАНІВНА, ДИКИЙ БОГДАН МИКОЛАЙОВИЧ, ГРИЖАК ІГОР ГНАТОВИЧ, КОНДРИН ОКСАНА ЄВГЕНІВНА, ОСТЯК РОМАН СТЕПАНОВИЧ, ВОРОНОВА ВІКТОРІЯ ЮРІІВНА

(57) Спосіб діагностики реплікативних безсимптомних форм цитомегаловірусної інфекції у ВІЛ-

2

інфікованих жінок репродуктивного віку, вагітних та новонароджених дітей шляхом визначення цитомегалічних клітин у мазках осаду слини, вагінальних змивів і в сечі, який **відрізняється** тим, що діагностику здійснюють усім ВІЛ-інфікованим жінкам репродуктивного віку на етапі прегравідарної підготовки та вагітним незалежно від наявності чи відсутності протицитомегаловірусних антитіл класу класу IgG, IgM у сироватці крові; замість змивів з вагінального тампона береться безпосередній вагінальний змив після ранкового туалету жінки шляхом спринцювання 50 мл 0,9% стерильного розчину натрію хлориду; зішкрябок слизової щік і сечу на наявність цитомегалічних клітин досліджують всім дітям, народженим від ВІЛ-інфікованої жінки.

Заявляється корисна модель, яка стосується медицини, зокрема інфекційних хвороб, проблем ВІЛ-інфекції та СНІДу, акушерства та гінекології, неонатології і може бути використана для діагностики реплікативних безсимптомних форм цитомегаловірусної інфекції (ЦМВІ) у ВІЛ-інфікованих жінок репродуктивного віку, вагітних та їхніх новонароджених дітей.

За останні роки ЦМВІ виходить за межі рідкісної інфекції, перетворюючись в актуальну проблему інфектології, акушерства, перинатології. У вагітних вона може бути причиною перинатального інфікування плода і новонародженого, акушерської патології, ембріо- і фетопатій [3-5, 7, 9, 11, 14, 15]. ЦМВІ у ВІЛ-інфікованих осіб характеризується як опортуністична інфекція, активація якої можлива в умовах наростаючого імунodefіциту [1, 2]. Рівень інфікованості на цитомегаловірус (ЦМВ) вагітних жінок залежить від віку і соціально-матеріального статусу є різним і перебуває в межах 42-94%. В той же час реальна частота вродженої ЦМВІ не перевищує 0,2-2,5%. Пояснюється це тим, що ри-

зик інфікування плода, тяжкість і прогноз при вродженій ЦМВІ залежать не стільки від наявності вірусу в організмі матері, скільки від активності інфекції під час вагітності. Найнебезпечнішим є первинне інфікування жінки ЦМВ під час вагітності. В таких випадках ЦМВІ призводить до ранніх і пізніх викиднів, загибелі плода, розвитку вродливостей, ураження ЦНС, зорового і слухового нервів, печінки, селезінки. Інфікування плода можливе не тільки при первинному зараженні матері ЦМВ під час вагітності, але і в результаті активації хронічної інфекції. Тому діагностика активної (реплікативної) ЦМВІ має принципове значення для вирішення питання про тактику ведення жінок на етапі прегравідарної підготовки, вагітних та новонароджених дітей [3, 5, 14, 15].

ЦМВІ створює підвищену небезпеку для ВІЛ-інфікованих жінок, що пов'язано з імунodefіцитним станом. З наростанням ступеня імунodefіциту, який корелює зі зниженням рівня CD4+T-лімфоцитів, зростають ризики реактивації ЦМВІ, а у вагітних - ризик внутрішньоутробного інфікуван-

(13) **U**

(11) **58449**

(19) **UA**

ня плоду. Серологічна діагностика активних форм ЦМВІ у них ускладнюється зниженням синтезу імуноглобулінів класів IgM [1, 2].

Верифікація діагнозу активної ЦМВІ має вирішальне значення на етап планування вагітності. Вона дозволяє скорегувати терапевтичні заходи провести адекватну прегравідарну підготовку, яка забезпечить контроль імунної системи над вірусом під час гестаційного періоду і дозволить зберегти здоров'я майбутній дитині. Згідно з протоколом діагностики ЦМВІ, постановка діагнозу і встановлення клінічної форми захворювання ґрунтується на комплексному лабораторному обстеженні - визначенні противірусних антитіл методом імуноферментного аналізу (ІФА) та ДНК вірусу методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у крові та інших біологічних рідинах [8, 10, 12]. Особливістю ЦМВІ є персистенція збудника в організмі упродовж всього життя, доказом якої є наявність специфічних IgG. Однак, виявлення анти-ЦМВ IgG при серологічному дослідженні не є свідченням активної інфекції, а чотириразове наростання титрів IgG в парних сироватках у ВІЛ-позитивних осіб не спостерігається. Рівні специфічних IgG у ВІЛ-позитивних не відображають активності інфекційного процесу, а реплікативні форми ЦМВІ виявляються у пацієнтів із низькими і високими титрами, а також у хворих серонегативних (зниження антитіл на тлі імунodefіциту) [6].

Специфічні антитіла класу IgM певною мірою втратили роль показника активної інфекції, оскільки визначаються у крові після первинного інфікування впродовж 12-18 тижнів і співпадають з реплікативною фазою інфекції менше, ніж у 50% випадків. У ВІЛ-позитивних при свіжому інфікуванні цитомегаловірусом IgM часто взагалі не виробляються, а поява IgG очікується через 3-4 тижні. Отже, відсутність специфічних антитіл класів IgM і IgG ще не виключає наявності гострої ЦМВІ. Подібна ситуація може спостерігатися при реактивації хронічної ЦМВІ в стадії СНІДу, коли синтез антитіл ослаблений настільки, що специфічні IgG та IgM не виявляються методом імуноферментного аналізу (ІФА). На фоні імунної недостатності у новонароджених дітей активний інфекційний процес також рідко супроводжується появою специфічних IgM і підвищення рівня IgG. Зрідка IgM можуть бути хибнопозитивними через присутність у сироватці крові ревматоїдного фактору або при реплікації інших герпесвірусів за рахунок перехресної реакції. В імуноскомпроментованих жінок із ВІЛ-інфекцією відсутність антитіл ще не може заперечити наявності активної ЦМВІ. Аналізуючи значимість лабораторних методів діагностики ЦМВІ, дослідники роблять висновки про неінформативність серологічних методів для підтвердження активної інфекції, що особливо притаманно ВІЛ-позитивним особам та їхнім новонародженим дітям [1, 2, 6].

Для діагностики реплікативної форми ЦМВІ найчастіше застосовують метод ПЛР, за допомогою якого досліджують кров або інший матеріал від хворого (слину, сечу, ліквор, зішкрябки із цервікального каналу) в залежності від локалізації уражень [3, 8, 10]. Однак, при безсимптомному пере-

бігу ЦМВІ, який переважає у вагітних (90%), локалізація збудника і зумовленого ним патологічного процесу в організмі невідома. Аналогічна ситуація і при внутрішньоутробній ЦМВІ, яка діагностується на підставі клінічних даних тільки у 10% новонароджених. У таких випадках для верифікації діагнозу ЦМВІ необхідно досліджувати методом ПЛР всі біологічні рідини, в яких може знаходитись вірус, що значно підвищує вартість дослідження і робить його малодоступним для контингенту ВІЛ-позитивних (такі дослідження не належать до обов'язкових протокольних обстежень). Слід відзначити, що визначення ДНК ЦМВ методом ПЛР в слині, сечі, цервікальному секреті не завжди свідчить на користь клінічно активної інфекції, оскільки реплікація вірусу може бути мінімальна і відповідати «здоровому» вірусоносії [6, 10]. Через виражений тропізм ЦМВ до епітелію вивідних протоків слинних залоз, звивистих каналців нирок, цервікального каналу його розмноження у цих клітинах супроводжується розвитком повільного цитопатичного ефекту з індукцією цитомегалічного метаморфозу і виникненням ЦМК. Вони великі за розміром (20-40 мкм), мають округлу форму, велике ядро з характерними внутрішньоядерними оксифільними включеннями, оточеними оптично світлою облямівкою, що нагадують «совине око». Якщо ДНК вірусу в сечі та слині можуть виявлятися також при носійстві та хронічних персистентних формах ЦМВІ, то ЦМК - тільки у випадку реплікації й цитопатичної дії вірусу, що робить їх абсолютним доказом активної ЦМВІ при будь-якому варіанті її перебігу, в тому числі безсимптомному, що найчастіше зустрічається у ВІЛ-позитивних жінок репродуктивного віку, вагітних та їхніх новонароджених дітей. Існують методи цитологічної діагностики ЦМВІ шляхом цитоскопії осаду сечі, слини та біосубстрату із піхви і цервікального каналу у світловому мікроскопі, який базується на виявленні патомонічних для цієї хвороби специфічних цитомегалічних клітин (ЦМК) [10, 12].

Найближчим за суттю до корисної моделі є спосіб діагностики реплікативних безсимптомних форм ЦМВІ у жінок репродуктивного віку, вагітних жінок та новонароджених їхніх дітей, де застосовується визначення цитомегалічних клітин у різноманітних біосередовищах [13]. Однак, недолік методу в тому, що біосубстрат з піхви береться шляхом промивання гігієнічного тампона з піхви у фізіологічному розчині натрію хлориду. Немає достатньої гарантії, що на тканині тампону цитомегалічні клітини можуть зберігатися, а не зазнавати часткового руйнування, що знижує інформативність методу. Крім того, обстеження підлягали жінки з негативним ВІЛ-статусом, але серопозитивні стосовно наявності протицитомегаловірусних антитіл класу IgG.

Спосіб, що заявляється, вперше застосовується з метою цитологічної диференційної діагностики активних безсимптомних форм ЦМВІ у ВІЛ-інфікованих жінок репродуктивного віку в період життя, які пов'язані з вагітністю або підготовкою до неї та в їхніх новонароджених дітей.

В основу корисної моделі, що заявляється, поставлено завдання діагностики активних безсимп-

томних форм ЦМВІ у ВІЛ-інфікованих жінок репродуктивного віку, вагітних жінок та їхніх новонароджених дітей шляхом проведення додаткового цитоскопічного дослідження осаду слини, сечі, змивів із піхви, де виявляють цитомегалічні клітини, які характерні тільки для даної інфекції, і, за наявності навіть однієї такої клітини підтверджують діагноз, а за відсутності - заперечують. Наявність ЦМК, за відсутності антитіл до цитомегаловірусу, свідчить про виражений фоновий імунodefіцит. Наявність цитомегалічних клітин за від'ємного ДНК ЦМВ - свідчить про активну ЦМВІ та недоліки взяття матеріалу на ПЛР. Відсутність цитомегалічних клітин в біосередовищі, за наявності ДНК ЦМВ заперечує активну ЦМВІ, а свідчить про вірусносійство із мінімальним рівнем реплікації.

Суть корисної моделі полягає в тому, що застосовує метод цитоскопічного виявлення ЦМК в біосередовищі у всіх ВІЛ-позитивних жінок репродуктивного віку, які перебувають в періоді підготовки до вагітності або під час вагітності, в їхніх новонароджених дітей, як основне підтверджуюче дослідження для лабораторної діагностики активної безсимптомної форми ЦМВІ.

Наявність суттєвих ознак у корисній моделі полягає в тому, що метод застосовує цитоскопічне дослідження на визначення цитомегалічних клітин у в контингенті ВІЛ-інфікованих жінок репродуктивного віку та їхніх новонароджених дітей незалежно від наявності чи відсутності клінічних проявів ЦМВІ, специфічних протицитомегаловірусних антитіл класів IgM, IgG, позитивного чи негативного якісного ПЛР на виявлення ДНК ЦМВ.

Спосіб здійснюється наступним чином. Всім жінкам із підтвердженою ВІЛ-інфекцією на етапі прегравідарної підготовки береться біосубстрат з піхви після ранкового туалету шляхом спринцювання 50,0 мл 0,9% фізіологічного розчину натрію хлориду з наступним осадженням клітинного вмісту центрифугуванням. Отримана змивна рідина переноситься у центрифужні пробірки, центрифугується при 3000 об/хв впродовж 15 хв, надосадову рідину зливають, а осад ресуспензують у 1 мл фізіологічного розчину і відразу наносять на знежирене предметне скло тонким шаром. Для отримання осаду сечі та слини беруть їх перші ранкові проби, об'ємом не менше 10 мл, центрифугують при вище зазначеному режимі, аналогічно ресуспензують і виготовляють мазки. Мазки висушують при температурі 18-20° градусів, фіксують в етиловому спирті або суміші Нікіфорова протягом 15-20 хвилин, забарвлюють за методом Романовського-Гімзе гематоксилін-еозином і вивчають під світловим мікроскопом (збільшення 40×10). У новонароджених на дослідження беруть сечу та зішкрябок зі слизової щік. Зішкрябок шпателем чи ватним тампоном одразу наноситься на предметне скло з подальшою фіксацією і фарбуванням.

Мікроскопію здійснюють у світловому мікроскопі (збільшення: об'єктив ×40, окуляр ×10). Результат реакції оцінюють за чотирихрестовою схемою: наявність ЦМК в препараті у великій (++++ - більше 20 ЦМК), помірній (+++ - 10-20 ЦМК) і малій (++,+ - до 10 ЦМК) кількості.

Застосування способу, що заявляється, базується на проведених порівняльних дослідженнях ефективності різних методів діагностики безсимптомних форм ЦМВІ у жінок і новонароджених методом ІФА, ПЛР та цитологічного дослідження. Із представлених даних у таблицях 1 і 2 видно, що як у жінок, так і новонароджених дітей відсоток позитивних результатів цитологічного дослідження будь-якого біологічного матеріалу не відрізнявся у порівнянні з відсотком позитивних результатів ПЛР, а у вагінальних змивах - перевищував її. Останнє мабуть пов'язане зі складнощами методики взяття матеріалу з цервікального каналу для ПЛР.

Таблиця 1

Маркери цитомегаловірусної інфекції у ВІЛ-позитивних жінок

Групи ВІЛ-позитивних жінок, матеріал та метод дослідження	Кількість обстежених	Кількість жінок з позитивними результатами	
		абс. число	%
Серопозитивні на ЦМВІ (n=30)			
ПЛР:	30	18	60,0
Слина	30	15	50,0
Сеча	30	9	30,0
Зішкрябок із цервікального каналу	30	18	60,0
Цитоскопія мазків біосубстрату:	30	23	76,67
Слина	30	15	50,0
Сеча	30	10	33,33
Вагінальний змив	30	20	66,67
Серонегативні на ЦМВІ (n=12)			
ПЛР:	12	4	33,33
Слина	12	2	16,67
Сеча	12	1	8,33
Зішкрябок із цервікального каналу	12	4	33,33
Цитоскопія мазків біосубстрату:	12	4	33,33
Слина	12	2	8,33
Сеча	12	1	8,33
Вагінальний змив	12	3	25,0

Таблиця 2

## Маркери цитомегаловірусної інфекції у ВІЛ-позитивних новонароджених дітей

Матеріал і метод дослідження новонароджених	Кількість обстежених	Кількість новонароджених з позитивними результатами	
		абс. число	%
Серологічний (ІФА)	15		100
ПЛР:	15	4	26,67
Слина	15	4	26,67
Сеча	15		0
Цитологічний (цитоскопія):	15	4	26,67
Зішкрябок зі слизової оболонки щік	15	4	26,67
Сеча	15	1	6,67

Отже, результати порівняльного дослідження свідчать про високу діагностичну інформативність цитоскопічного визначення цитомегалічних клітин. У жінок найінформативнішими виявилися результати цитологічного дослідження вагінальних змивів, а в новонароджених - зішкрябка зі слизової щік. Впровадження цитологічного дослідження біологічного матеріалу у жінок репродуктивного віку, вагітних і новонароджених на предмет наявності ЦМК дозволяє вчасно діагностувати реплікативні безсимптомні форми ЦМВІ, призначити адекватне лікування з метою профілактики її несприятливого впливу на перебіг вагітності, стан плода і новонародженого.

Методика здійснення цитоскопії проста, не вимагає складних пристосувань, коштовного лабораторного обладнання, спеціальної підготовки персоналу. Цей високоспецифічний метод діагностики ЦМВІ з достатньо хорошою чутливістю є абсолютно доступним в умовах загально-клінічних лабораторій лікарень, центрів профілактики і боротьби з ВІЛ-інфекцією та СНІДом, жіночих консультацій, ЦРЛ, амбулаторій.

## Література:

1. Дикий Б.М., Грижак І.Г., Щербинська А.Д., Воляк М.Н., Нейко Н. Медико-профілактичні аспекти ВІЛ-інфекції та СНІДу в лікарській практиці. - Івано-Франківськ, Видавництво ІФДМУ, 2007. - 236 с.
2. Запорожан В.М., М.Л. Аряєв ВІЛ-інфекція і СНІД. 2-ге видання перероб. і доп. - Київ: "Здоров'я", 2004 р. - 636 с.
3. Кистенева Л.Б. Цитомегаловірусная инфекция как проблема перинатальной патологии: этиология, патогенез, диагностика // Российский вестник перинатологии и педиатрии. - 2003. - №4. - С. 55-59.
4. Матейко Г.Б. Цитомегаловірусна інфекція у вагітних: особливості перебігу, ризик інфікування плода // Інфекційні хвороби. - 2004. - №4. - С 41-43.

5. Матейко Г.Б. Вплив герпетичної та цитомегаловірусної інфекції на перебіг вагітності і пологів // Галицький лікарський вісник. - 2004. - №3. - С. 57-59.

6. Матейко Г.Б. Значимість серологічних і вірусологічних маркерів в діагностиці цитомегаловірусної інфекції у вагітних жінок // Вісник Вінницького національного медичного університету. - 2004. - Т.8, №2. - С. 513-514.

7. Никонов А.П., Асцатурова О.Р. Цитомегаловірусная инфекция и беременность // Акушерство и гинекология. - 2003. - №1. - С. 53-57.

8. Нисевич Л.Л., Бахмут Е.В., Королькова Е.Л. К вопросу о диагностике внутриутробной инфекции у новорождённых // Акуш. и гинекол. - 1998. - №3. - С. 16-20.

9. Орджоникидзе Н.В., Тютюнник В.Л. Цитомегаловірусная инфекция и беременность // Акушерство и гинекология. - 2002. - №3. - С. 56-63.

10. Прилущий О.С. Діагностика цитомегаловірусної інфекції у вагітних жінок, плода, новонароджених // Лабораторна діагностика. - 2003. - №2. - С. 3-7.

11. Серов В.Н., Манухин И.Б., Кузьмин В.Н. ЦМВІ: патология беременности и плода // Акуш. и гинекол. - 1997. - №6. - С. 16-20.

12. Смілянська М.В. Лабораторна діагностика цитомегаловірусної інфекції // Інфекційні хвороби. - 1998. - №2. - С. 50-51.

13. Спосіб діагностики реплікативних безсимптомних форм цитомегаловірусної інфекції у жінок репродуктивного віку, вагітних та новонароджених / Г.Б. Матейко, Р.С. Остяк, Л.Й. Погоріла / Декларативний пат. Україна, №21854 UA, МКВ А61В5/00 (2006).

14. Тютюнник В.Л., Орджоникидзе Н.В., Зыряева Н.А. Перинатальные аспекты цитомегаловірусной инфекции // Акушерство и гинекология. - 2002. - №1. - С. 9-11.

15. Усачова О.В. Роль цитомегаловірусів у патології вагітності, плоду та дітей раннього віку / Інфекційні хвороби. - 2008. - №2. - С. 18-23.