

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2007

УДК 618.3-06:616.916.1]-078.33:577.21

Э. А. КУЗНЕЦОВА, В. А. ГНЕТЕЦКАЯ, О. Ю. ШИПУЛИНА, М. А. КУРЦЕР, Г. А. ШИПУЛИН
**ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ
 ДИАГНОСТИКИ КРАСНУХИ У БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН, ПЛОДОВ
 И НОВОРОЖДЕННЫХ**

ФГУН Центральный НИИ эпидемиологии (дир. — акад. РАМН В. И. Покровский) Роспотребнадзора,
 Центр планирования семьи и репродукции (главный врач — проф. М. А. Курцер) Департамента
 здравоохранения Москвы

Цель исследования: обосновать ценность применения иммунологических (ИФА) и молекулярно-биологических (ОТ-ПЦР) тестов в комплексной диагностике краснухи у беременных женщин, плодов и новорожденных.

Учреждения: Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Центр планирования семьи и репродукции Департамента здравоохранения Москвы.

Методология: проспективное исследование.

Материал исследования: 162 беременные женщины в возрасте от 19 до 46 лет со сроком беременности от 9 до 30 нед.

Методы исследования: общеклинические, инструментальные, иммунологические, молекулярно-биологические.

Результаты исследований: при проведении первичного серологического скрининга антитела к антигенам вируса краснухи класса IgG обнаружили у 128 (79%) беременных женщин. Титр вирусспецифических антител варьировал от 10 до 426 МЕ/мл. Сомнительные результаты получены у 5 (3%) женщин. У 29 (18%) пациенток вирусспецифические антитела класса IgG не выявлены. Антитела класса IgM к антигенам вируса краснухи обнаружены у 3 (1,9%) беременных женщин. Приведены подробные данные динамических иммунологических и молекулярно-биологических исследований трех беременных женщин с острой краснухой и подозрением на нее.

Заключение: обнаружение антител к антигенам вируса краснухи класса IgM в сыворотке крови не является абсолютным показанием к прерыванию беременности, а служит отправной точкой для проведения дальнейших динамических клинических и лабораторных исследований. Комплексная антенатальная диагностика краснухи должна основываться на выявлении вирусспецифических антител класса IgM в пуповинной крови (ИФА) и идентификации РНК вируса в амниотической жидкости и/или пуповинной крови с помощью ОТ-ПЦР.

Objective: to provide evidence for the value of immunological (enzyme immunoassay (EIA)) and molecular biological (RT-polymerase chain reaction (RT-PCR)) tests in the complex diagnosis of rubella in pregnant females, fetuses, and neonates.

Setting: Central Research Institute of Epidemiology, Russian Consumer Surveillance Committee, Family Planning and Reproduction Center, Department of Public Health, Moscow

Design: a prospective study.

Subjects: 162 pregnant females aged 19 to 46 years at 9 to 30 weeks of pregnancy.

Methods: overall clinical, instrumental, immunological, and molecular biological studies.

Results: Primary serological screening revealed IgG antibodies to rubella virus antigens in 128 (79%) pregnant females. The titer of virus-specific antibodies ranged 10 to 426 IU/ml. Doubtful results were obtained in 5 (3%) females. IgG virus-specific antibodies were not found in 29 (18%) patients. IgM antibodies to rubella virus antigens were detected in 3 (1.9%) pregnant females. The details of follow-up immunological and molecular biological studies of three pregnant females with acute and suspected acute rubella are presented in the paper.

Conclusion: detection of serum IgM antibodies to rubella virus antigens is not an absolute indicator for pregnancy interruption, but serves as the starting point for further follow-up clinical and laboratory studies. Complex antenatal diagnosis of rubella should be based on the detection of IgM virus-specific antibodies in the umbilical blood (EIA) and on the identification of RNA virus in the amniotic fluid and/or umbilical blood, by using RT-PCR.

Краснуха — острое вирусное заболевание, характеризующееся мелкой пятнисто-папулезной сыпью, генерализованной лимфаденопатией, умеренно выраженной лихорадкой и высоким риском поражения плода у заболевших беременных женщин. Развитие эмбриопатии и врожденных пороков развития обусловлено трансплацентарным переносом вируса от матери к плоду, что наблюдается как при острых формах заболевания во время вынашивания, так и при субклиническом течении реинфекции в период беременности у ранее привитых женщин.

Показатель заболеваемости краснухой на 100 000 населения в Российской Федерации в 2003 г. составил 87,22; в 2004 г. — 101,1 [2]; в 2005 г. — 100,12 [1]. С 2004 г. наблюдается тенденция к увеличению количества эпизодов краснухи среди взрослого населения. Сбор официальных статистических сведений по распространению краснухи среди беременных в нашей стране не проводится. Однако, согласно данным отечественных исследователей, от 15 до 41% врожденных пороков разви-

тия различных органов и систем обусловлено вирусом краснухи [3, 7, 8, 10]. Популяционные исследования, проведенные специалистами ВОЗ в рамках эпиднадзора за синдромом врожденной краснухи (СВК) в Европейском регионе до внедрения в практику вакцины, показали, что в условиях эндемичного распространения заболевания ожидаемый показатель СВК составляет 0,1 случая на 1000 новорожденных детей, при эпидемиях — 0,5—3,5 [12].

Распознавание первичного инфицирования вирусом краснухи при наличии типичной клинической картины и проведении своевременных серологических исследований, как правило, не вызывает больших затруднений. Однако при проведении эпидемиологических исследований в очагах инфекции установлено, что более чем в половине случаев краснуха протекает бессимптомно или в стертой форме и не всегда идентифицируется [11]. 75—80% беременных женщин переносят заболевание именно в инapparантной либо атипичной форме [9, 18]. Своевременное установление диагноза в

этой ситуации имеет особенно важное значение и определяет последующую тактику ведения беременности.

Представленные данные свидетельствуют, что диагностика краснухи и СВК на современном этапе невозможна без проведения развернутых лабораторных исследований. Первостепенную роль в лабораторной диагностике заболевания играют иммунологические тесты. Тем не менее в ряде случаев для постановки достоверного диагноза недостаточно традиционного выявления серологических маркеров инфекции (вируспецифических антител классов IgM, IgG) [6, 8, 11—13]. Для ранней идентификации атипичных, интипичных форм краснухи, установления факта инфицирования плодов и новорожденных, подтверждения диагноза в сложных и сомнительных случаях (затруднение интерпретации результатов иммунологических тестов, иммунологическая толерантность новорожденных) необходимо прямое выявление РНК вируса молекулярно-биологическими методами (ОТ-ПЦР) [6, 8, 12—14, 17, 19].

Материал и методы исследования

Согласно схеме динамического наблюдения беременных и родильниц (Приказ Минздрава РФ № 50 от 10.02.03 "О совершенствовании акушерско-гинекологической помощи в амбулаторно-поликлинических учреждениях") были обследованы 162 женщины в возрасте от 19 до 46 лет при сроке беременности от 9 до 30 нед.

Обследование и сбор клинического материала осуществляли с апреля 2004 г. по декабрь 2005 г. на базе Центра планирования семьи и репродукции Департамента здравоохранения Москвы в соответствии с письменного согласия пациенток в соответствии с федеральной политикой по защите прав лиц, вовлеченных в научные исследования (1991).

Серологические скрининговые и динамические исследования проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с выявлением специфических антител к антигенам вируса краснухи классов IgM (качественным) и IgG (количественным). Для этого использовали две независимые коммерческие ИФА тест-системы производства "Diagnostic systems Laboratories", INC и "Abbott" (США).

При выявлении у беременных вируспецифических антител класса IgM и антител класса IgG в нарастающем титре параллельно проводили идентификацию РНК вируса краснухи в плазме, белых клетках периферической и пуповинной крови, амниотической жидкости методом ПЦР с гибридационно-флюоресцентной детекцией результатов в режиме реального времени. Для этого использовали ОТ-ПЦР тест-систему "АмплиСенс® вирус краснухи — FRT", разработанную в ФГУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора. Аналитическая чувствительность данной тест-системы составляет 400 копий РНК вируса краснухи в 1 мл, аналитическая специфичность — 100%.

С целью проведения дифференциальной лабораторной диагностики сыворотки периферической

крови беременных исследовали на наличие антител к антигенам цитомегаловируса (ЦМВ), простейшего *Toxoplasma gondii* классов IgM (качественным) и IgG (количественным) методом ИФА, используя коммерческие ИФА тест-системы производства "Diagnostic systems Laboratories" INC (США) и "Bio Merieux" (Франция).

Для своевременного обнаружения патологических изменений в системе мать—плацента—плод, обусловленных развитием внутриутробной инфекции, проводили ультразвуковое исследование, доплерографию, кардиотокографию, амниоцентез, кордоцентез в динамике согласно стандартным методикам.

Клиническое состояние новорожденных оценивали по шкале Апгар через 1 и 5 мин после рождения. Лабораторную верификацию СВК осуществляли посредством выявления вируспецифических антител классов IgM (качественным), IgG (количественным) методом в сыворотке периферической крови, а также путем идентификации РНК вируса краснухи в образцах плазмы, белых клеток периферической крови и мазке из носоглотки методом ОТ-ПЦР.

Результаты исследования и обсуждение

В результате проведенных скрининговых серологических исследований антитела к антигенам вируса краснухи класса IgG обнаружили у 128 (79%) беременных, обследованных на первичном приеме. Титр вируспецифических антител варьировал от 10 до 426 МЕ/мл. Сомнительные результаты (титр специфических антител класса IgG 5—10 МЕ/мл) были получены у 5 (3%) женщин, у 29 (18%) антитела к антигенам вируса класса IgG не выявлены. Таким образом, 18% обследованных беременных женщин, проживающих на территории Москвы, восприимчивы к первичному инфицированию вирусом краснухи и относятся к группе повышенного риска возникновения осложнений во время настоящей беременности. Следует отметить, что для достижения к 2010 г. сокращения частоты СВК до уровня менее 1 случая на 100 000 новорожденных степень восприимчивости к краснухе женщин детородного возраста не должна превышать 5% [12].

Антитела класса IgM к антигенам вируса краснухи были выявлены у 3 (1,9%) беременных. В связи с тем что коммерчески доступные тест-системы для обнаружения вируспецифических антител класса IgM в сыворотке крови обычно имеют специфичность не менее 95%, а наиболее распространенные причины ложноположительных результатов обусловлены наличием ревматоидного фактора и перекрестными реакциями с неспецифическими антителами класса IgM (например, антителами класса IgM к ЦМВ) [12, 13], женщин обследовали на выявление вируспецифических антител классов IgM и IgG в динамике при помощи двух независимых тест-систем.

В результате проведенных тестов антитела класса IgM наряду с нарастающим титром антител класса IgG к вирусу краснухи были выявлены у двух беременных с клиническим диагнозом крас-



Лабораторная диагностика краснухи во время беременности.

нуха и у одной — с подозрением на краснуху. При лабораторной диагностике заболевания основывались на алгоритме ведения беременных с краснухой, представленном на рисунке [8, 12, 13].

В первом случае была обследована беременная женщина в возрасте 31 года, срок беременности 20—21 нед, клинический диагноз — краснуха. При УЗИ, доплерометрии, кардиотокографии патологических изменений у плода, в плаценте, а также маточно-плацентарного и плодового кровотока выявлено не было. Данные серологических исследований к вирусу краснухи: IgM — сомнительный результат, IgG — 220 МЕ/мл; к *T. gondii* IgM — антитела не выявлены, IgG — 109 МЕ/мл; к ЦМВ IgM — антитела не выявлены, IgG — 38 МЕ/мл. Повторное лабораторное исследование проводилось через 2 нед, при этом результаты иммунологических тестов были следующими: к вирусу краснухи специфические антитела класса IgM — сомнительный результат, IgG — 296 МЕ/мл; к *T. gondii* IgM — антитела не выявлены, IgG — 175 МЕ/мл; к ЦМВ IgM — антитела не выявлены, IgG — 22 МЕ/мл. Известно, что при лабораторной диагностике первичное инфицирование вирусом краснухи определяется путем обнаружения вирусспецифических антител класса IgM, сероконверсии или существенного подъема антител класса IgG. Однако при этом следует учитывать, что специфические антитела к антигенам вируса краснухи класса IgM, появляющиеся в крови в период возникновения сыпи, часто обнаруживаются в течение многих месяцев и даже лет, особенно после вакцинации [6, 12]. Таким образом, если при определении титра вирус-

специфических антител в двух последовательно взятых образцах сыворотки периферической крови показатели существенно не меняются, можно говорить о предположительном исключении первичного инфицирования [6]. Для подтверждения или исключения факта инфицирования плода было принято решение о проведении амниоцентеза. Образец амниотической жидкости необходим для проведения подтверждающего теста, направленного на прямое выявление РНК возбудителя методом ОТ-ПЦР. Следует подчеркнуть, что идентификация РНК вируса краснухи в образцах амниотической жидкости и/или пуповинной крови методом ОТ-ПЦР является достоверным маркером антенатального инфицирования [12, 13]. Однако проведение кордоцентеза методологически оправдано только после 22 нед беременности [13].

Для выявления РНК вируса краснухи в различном клиническом материале мы использовали ОТ-ПЦР тест-систему с гибридационно-флюоресцентной детекцией результатов амплификации в режиме реального времени. Принципиальной особенностью этого теста является возможность проводить одновременно качественные и/или количественные измерения ДНК или РНК инфекционных агентов путем определения накопления продуктов амплификации непосредственно во время проведения реакции. Подобный подход, кроме достоверного увеличения информативности исследования, позволяет значительно снизить число ложноположительных результатов, уменьшив вероятность контаминации реагентов и исследуемых образцов продуктами амплификации [15, 16, 20].

В результате молекулярно-биологических тестов РНК вируса краснухи в образцах амниотической жидкости, плазме и белых клетках периферической крови, взятой у беременной в те же сроки, не обнаружена. Ребенок родился живым доношенным, массой тела 3250 г. Оценка по шкале Апгар — 8/8 баллов. При клиническом осмотре новорожденно-го патологии не выявлено.

Во втором случае была обследована женщина 25 лет при сроке беременности 22 нед с подозрением на краснуху. Данные серологического исследования: к вирусу краснухи IgM — положительный результат, IgG — 74 МЕ/мл; к *T. gondii* и ЦМВ IgM — антитела не выявлены, IgG — 107 и 40 МЕ/мл соответственно. При повторном лабораторном исследовании сыворотки периферической крови (через 2 нед): к вирусу краснухи IgM — положительный результат, IgG — титр антител достоверно увеличился в 3,4 раза и составил 252 МЕ/мл; к *T. gondii* IgM — антитела не выявлены, IgG — 83 МЕ/мл; к ЦМВ IgM — антитела не выявлены, IgG — 17 МЕ/мл. При проведении в динамике УЗИ, доплерометрии и кардиотокографии патологии плода, плаценты, маточно-плацентарного и плодового кровотока не обнаружено. Учитывая, что согласно результатам многолетних исследований, проведенных специалистами ВОЗ, в ряде случаев сероконверсия или существенное повышение титра вирусспецифических антител класса IgG может как означать недавнее первичное инфицирование, так и указывать на повторное инфицирование или неспецифическую стимуляцию иммунной системы [12], для подтвер-

ждения или исключения факта трансплацентарной передачи вируса краснухи плоду были проведены процедуры кордо- и амниоцентеза. Полученный образец пуповинной крови был протестирован на наличие вирусспецифических антител класса IgM и РНК возбудителя. Ни антитела класса IgM к вирусу краснухи в сыворотке пуповинной крови, ни РНК инфекционного агента в эти сроки не обнаружены. При идентификации при помощи ОТ-ПЦР РНК вируса краснухи в образце амниотической жидкости, а также белых клетках и плазме периферической крови беременной не выявлены. Ребенок родился живым, доношенным, массой 2950 г. Оценка по шкале Апгар — 8/9 баллов. При клиническом осмотре новорожденного патологии не выявлено.

На второй день после рождения для лабораторного исключения СВК у новорожденного были взяты образцы периферической крови и мазок из носоглотки. При проведении серологической диагностики вирусспецифические антитела класса IgM не выявлены, титр антител класса IgG составил 215 МЕ/мл. Выявление вирусспецифических антител класса IgG у новорожденного не может служить критерием обнаружения врожденной краснухи, так как известно, что они передаются плоду через плаценту от инфицированной матери и могут сохраняться в диагностических титрах до 6—12 мес [3, 13]. При тестировании методом ОТ-ПЦР образцов плазмы и белых клеток периферической крови, а также мазка из носоглотки новорожденного РНК вируса краснухи не обнаружена.

В третьем случае была обследована беременная в возрасте 25 лет, срок беременности 22 нед, клинический диагноз — краснуха. Данные серологических исследований: к вирусу краснухи IgM — антитела не обнаружены, IgG — 54 МЕ/мл; к *T. gondii* IgM и IgG — антитела не выявлены; к ЦМВ IgM — антитела также не выявлены, IgG — 68 МЕ/мл. Повторное лабораторное исследование проведено через 2 нед. Получены следующие результаты: к вирусу краснухи IgM — положительный результат, IgG — 197 МЕ/мл. Сопоставление результатов двукратного иммунологического обследования показало, что наряду с появлением IgM имели место серологические сдвиги с нарастанием титра антител класса IgG в 3,6 раза. Проведены процедуры кордо- и амниоцентеза для взятия образцов пуповинной крови и амниотической жидкости. В пуповинной крови к вирусу краснухи IgM — не выявлены, IgG — 68 МЕ/мл. При идентификации при помощи ОТ-ПЦР РНК вируса в плазме, белых клетках периферической и пуповинной крови, амниотической жидкости не обнаружена. При проведении УЗИ, доплерометрии, кардиотокографии в динамике патологии плода, плаценты, маточно-плацентарного и плодового кровотока не выявлено. Ребенок родился живым, доношенным, массой тела 3050 г, длиной 49 см. Оценка по шкале Апгар — 9/9 баллов. При клиническом осмотре новорожденного патологии не выявлено.

Согласно результатам проведенных комплексных клинических и лабораторных исследований, ни в одном из описанных случаев не было доказано факта трансплацентарной передачи вируса краснухи от матери плоду. Очевидно, это объясняется

тем, что тяжесть и характер развития СВК в большей мере зависят от того, в какую фазу эмбрио- или фетогенеза произошло заражение. Если в ранние сроки беременности плод инфицируется в 70—90% случаев и в 50—60% случаев развиваются эмбриопатии, приводящие к его гибели, то во второй половине I триместра частота эмбриопатий снижается до 25%. На раннем этапе II триместра инфицируется каждый второй плод, после 17-й недели беременности — только каждый пятый [3—5, 13]. Это, в свою очередь, связано с тем, что в условиях антенатального развития защитные системы плода становятся способны к более адекватному контролю воздействия инфекции, способствующему предотвращению возникновения тяжелых форм заболевания с последующей хронизацией процесса.

Таким образом, проведенные скрининговые серологические исследования показали, что 18% обследованных беременных, проживающих на территории Москвы, восприимчивы к первичному инфицированию вирусом краснухи и относятся к группе повышенного риска по возникновению осложнений во время настоящей беременности. Обнаружение антител к антигенам вируса краснухи класса IgM в сыворотке периферической крови не является абсолютным показанием к прерыванию беременности, а служит отправной точкой для проведения дальнейших динамических клинических и лабораторных исследований. Комплексная антенатальная диагностика краснухи, направленная на установление факта трансплацентарной передачи возбудителя от матери плоду, должна основываться на выявлении вирусспецифических антител класса IgM в пуповинной крови (ИФА) и идентификации РНК вируса в амниотической жидкости и/или пуповинной крови с помощью ОТ-ПЦР.

ЛИТЕРАТУРА

1. Здоровье населения и среда обитания: Информ. бюл. — 2006. — № 1 (154). — С. 42.
2. Инфекционная заболеваемость в субъектах Российской Федерации за 2003—2004 гг.: Информационный сборник статистических и аналитических материалов. / Сост.: Ясинский А. А., Котова Е. А., Штинова Т. Т. — М., 2005. — Ч. 1—3.
3. Кицак В. Я. Вирусные инфекции беременных: патология плода и новорожденных. — Кольцово, 2004.
4. Клинико-эпидемиологические особенности краснухи и кори: Метод. письмо / Семериков В. В., Кузьминых С. И., Николова И. В. и др. — Пермь, 1994.
5. Краснуха: Учеб. пособие для студентов, интернов, клинических ординаторов и врачей. — Барнаул, 1997.
6. Кузьмин В. Н., Адамян Л. В. Вирусные инфекции и беременность. — М., 2005.
7. Лаврентьева И. Н., Сухобаевская Л. П., Жербун А. Б. // Теоретические и практические аспекты элиминации кори: Сборник науч. трудов. — М., 2005. — С. 61—64.
8. Малкова Е. М., Петрова И. Д., Тюнников Г. И. и др. // Проблемы изучения и молекулярной диагностики краснухи в Западно-Сибирском регионе: Сборник науч. трудов. — М., 2005. — С. 73—76.
9. Нисевич Л. Л., Бахмут Е. В., Умарова А. А. и др. // Вопр. охр. мат. — 1991. — № 4. — С. 38—43.
10. Нисевич Л. Л., Бахмут Е. В., Талалаев А. Г. и др. // Краснуха. Синдром врожденной краснухи. — М.: СПб., 1997. — С. 31—37.
11. Нисевич Л. Л. // Дет. доктор. — 2000. — № 5. — С. 26—30.

12. Техническое консультативное совещание ВОЗ по эпиднадзору за корью, краснухой и синдромом врожденной краснухи. — Копенгаген, 2005.
13. Фризе К., Кахель В. Инфекционные заболевания детей и новорожденных: Пер. с нем. — М., 2003.
14. Craddock-Watson J. E., Miller E., Ridehaigh M. K. S. et al. // *Prenat. Diagn.* — 1989. — Vol. 9. — P. 91—96.
15. Heid C. A. // *Genome Res.* — 1996. — Vol. 6. — P. 986—994.
16. Higuchi R. // *Biotechnology.* — 1993. — Vol. 11. — P. 1026—1030.
17. Ho-Terry L., Terry G. M., Londesborough P. et al. // *J. Med. Virol.* — 1988. — Vol. 24. — P. 175—182.
18. Plotkin S. A. // *J. A. M. A.* — 1984. — Vol. 251, N 15. — P. 2003—2004.
19. Revello M. G., Baldanti F., Sarasini A. et al. // *J. Clin. Microbiol.* — 1997. — Vol. 35, N 3. — P. 708—718.
20. Sykes P. J., Neoh S. H., Brisco M. J. et al. // *BioTechniques.* — 1995. — Vol. 13. — P. 444—449.