

# ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПОЧКИ

*Т.В. Амвросьева, З.Ф. Богуш, Н.В. Поклонская*

*Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии*

В Республике Беларусь ежегодно проводится порядка 200 успешных трансплантаций почечного аллографта. При этом серьезной проблемой, существенно влияющей на конечный результат и состояние здоровья реципиента в посттрансплантационном периоде, остаются инфекционные осложнения, из которых до 50% имеют вирусную этиологию [1, 2]. Наиболее грозными из них, в запущенных случаях приводящими к тяжелым последствиям, вплоть до отторжения трансплантата, считаются цитомегаловирусная (ЦМВ) и ВК-вирусная инфекции. В настоящее время в отношении ЦМВ инфекции успешно применяются средства этиотропной терапии, в т. ч. для профилактики после пересадки органа [3]. Существует также ряд лекарственных средств, эффективных в отношении ВК-вирусной инфекции [4, 5]. Кроме того, одним из известных подходов снижения ВК-вирусной нагрузки у пациентов с иммунодефицитом, к которым относятся реципиенты почки, является коррекция схем применения иммуносупрессантов (уменьшение доз, изменение их спектра и т. д.). В связи с этим специфическая диагностика вирусных инфекций, направленная на установление их этиологии для последующего назначения адекватной терапии, включающей соответствующие противовирусные средства, имеет исключительно важное практическое значение.

Работа посвящена анализу результатов лабораторной диагностики вирусных инфекций при пересадке почки с данными об их спектре, частоте развития и доминирующих возбудителях. В ней представлена также этиологическая структура установленных посттрансплантационных вирусных осложнений и рекомендуемый алгоритм вирусологического обследования доноров и реципиентов.

**Материал и методы.** Исследовали 591 образец крови и 446 образцов мочи от 298 пациентов (26 доноров и 176 реципиентов: 84 — без клинических признаков инфекции и 92 — с таковыми, которые могли быть симптомами вирусной инфекции), полученных из РНПЦ трансплантации органов и тканей на базе УЗ «9-я городская клиническая больница» г. Минска).

**Пробоподготовка клинического материала.** Образцы цельной крови инкубировали 1 ч при температуре 37°C, затем центрифугировали при 1500 об./мин в течение 10 мин, после чего отбирали сыворотку. Образцы мочи перед выделением нуклеиновых кислот разводили транспортной средой для проб клинического материала в соотношении 1:1 («АмплиСенс», Россия).

Для определения серостатуса донора и реципиента в отношении трех актуальных вирусных инфекций выявляли IgG к их возбудителям — ЦМВ, вирусу Эпштейна–Барр (ВЭБ), вирусам простого герпеса 1 и 2 типов (ВПГ 1 и 2 т.). Серологические исследования осуществлялись методом ИФА с использованием тест-систем («Вектор-Бест», Россия) в соответствии с инструкциями по применению.

Для выделения вирусных нуклеиновых кислот из сывороток крови применяли коммерческие наборы «РНК-сорб», из цельной крови — «ДНК-сорб В», из образцов мочи — «РИБО-преп» («АмплиСенс», Россия) в соответствии с инструкциями по применению.

Амплификацию нуклеиновых кислот ЦМВ, ВЭБ, ВПГ 1 и 2 типа, вируса герпеса человека 6 типа (ВГЧ<sub>6</sub>), варицелла-зостер вируса (ВЗВ), аденовирусов (АдВ), парвовируса В<sub>19</sub> (ПВ В<sub>19</sub>) осуществляли с использованием коммерческих тест-систем («АмплиСенс», Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Постановку реакции с электрофоретическим учетом результатов проводили на ПЦР-амплификаторе mJMini (BioRad, США). Результаты реакции учитывали с помощью горизонтального электрофореза в агарозном геле. Постановку ПЦР в реальном времени осуществляли на амплификаторах RotorGene 3000 и 6000 (Corbett Life Sciences, Австралия).

Детекцию ВК-вируса проводили с помощью ПЦР в реальном времени. Использовали Taq-полимеразу, 10x реакционный буфер и раствор MgCl<sub>2</sub> («PrimeTech», Беларусь), смесь дезоксинуклеотидов («Fermentas», Литва). Амплификацию осуществляли с применением взятых из литературных источников праймеров и зондов [6], синтезированных фирмой PrimeTech (Беларусь).

Расчет 95% доверительного интервала на основании биномиального распределения вычисляли модифицированным методом Вальда [7]

**Результаты и их обсуждение.** Одним из способов ранней идентификации реципиентов с высоким риском возникновения вирусных осложнений является установление серостатуса (наличие/отсутствие противовирусных Ig G) пар донор/реципиент (Д/Р) в отношении наиболее значимых вирусных патогенов, к которым относятся

ЦМВ, ВЭБ, ВПГ 1 и 2 типа. По результатам серодиагностики определяется принадлежность пар Д/Р к одной из возможных групп риска возникновения и развития посттрансплантационных вирусных осложнений: для сероварианта Д-/Р- (серонегативные донор и реципиент) — группа минимального риска, для серовариантов Д+/Р+ (серопозитивные донор и реципиент), Д-/Р+ (серонегативный донор и серопозитивный реципиент) — группа среднего риска, для сероварианта Д+/Р- (серопозитивный донор и серонегативный реципиент) — группа высокого риска. Практическая значимость серологического обследования пар Д/Р заключается в получении возможности недопущения пересадки органа от серопозитивного донора серонегативному реципиенту, а также в проведении целевой профилактики предполагаемых посттрансплантационных вирусных осложнений путем назначения индивидуального противовирусного лечения и коррекции схем иммуносупрессивной терапии.

В нашем исследовании в группе доноров (n=20) общий уровень выявления IgG к ВПГ 1 и 2 типа составил 100% [81,02; 100], к ВЭБ — 85,0% [63,12; 95,61], к ЦМВ — у 95,0% [74,59; 100]. В группе реципиентов (n=36) обнаружение IgG к ВПГ 1 и 2 типа отмечалось у 97,2% [84,59; 100] обследованных, к ВЭБ — у 97,2% [84,59; 100], к ЦМВ — у 94,4% [80,91; 99,41].

При анализе серостатуса сформированных пар Д/Р (n=22) в отношении каждого из возбудителей оказалось, что абсолютное большинство реципиентов по данному критерию относились к группе среднего риска для всех детектируемых возбудителей. Так, в отношении ЦМВ этой группе принадлежало 90,9% [71,0; 98,66] реципиентов (86,4% [65,82; 96,1] Д+/Р+, 4,5% [0,12; 22,84] Д-/Р+), в отношении ВЭБ — 100% реципиентов (95,5% Д+/Р+, 4,5% [0,12; 22,84] Д-/Р+), в отношении ВПГ 1 и 2 типа — 95,5% [76,49; 100] реципиентов (все Д+/Р+). И только небольшая часть пациентов относилась к группе высокого риска (Д+/Р-): в отношении ЦМВ — 9,1% [1,34; 29,0] обследованных, в отношении ВПГ 1 и 2 т. — 4,5% [0,12; 22,84]. Группа пациентов с низким риском (Д-/Р-) развития вирусных осложнений не была зарегистрирована.

Проведенный впоследствии анализ частоты и сроков развития виремии у реципиентов групп среднего и высокого риска показал, что у 42,1% [21,83; 61,4] реципиентов группы среднего риска по ЦМВ инфекции наблюдалось развитие виремии (выявление ДНК ЦМВ в сыворотке крови) в течение первых 3-х мес. после операции. У одного из реципиентов группы высокого риска (Д+/Р-) наблюдалось раннее развитие виремии уже на 28 сут после трансплантации. Анализ кинетики реактивации ВЭБ инфекции выявил развитие виремии у 19% [6,71; 39,12] реципиентов из группы среднего риска с серостатусом Д+/Р+. У реципиента с серостатусом Д-/Р+ виремия в течение первых 3 мес. не регистрировалась.

По результатам первичного выявления генетических маркеров детектируемых вирусных патогенов (ЦМВ, ВЭБ, ВПГ 1 и 2 т., БК-вируса, ВГЧ 6, ВЗВ, АдВ, ПВ В19) у реципиентов почки без клинических признаков инфекции (n=84) с целью определения этиологической структуры вирусных инфекций установлено, что наиболее часто обнаруживаемыми были маркеры ЦМВ, ВЭБ и ВК-вируса. Так, из 74 обследованных пациентов ДНК ЦМВ была выявлена у 41,9% [31,32; 53,27] (у 31 пациента). Доля реципиентов с установленной ВЭБ инфекцией также оказалась значительной — 30,4% [21,3; 41,27] (n=79 пациентов, положительных — 24). Уровень регистрации ВК-вирусной инфекции составил 17,4% [9,86; 28,8] (n=63, положительных — 11). Молекулярно-генетические маркеры ВГЧ<sub>6</sub> выявлялись у 5,6% [1,8; 14,0] (n=71, положительных — 4), АдВ — у 1,9% [0,05; 10,89] (n=54, положительных — 1), ПВ В<sub>19</sub> — у 1,7% [0,04; 8,94] (n=60, положительных — 1) обследованных реципиентов. При этом случаи обнаружения ВПГ 1 и 2 типа и ВЗВ (n=43 и n=14, соответственно) в обследуемой группе реципиентов отсутствовали.

Отдельным объектом лабораторного диагностического обследования была группа реципиентов (n=92), у которых имелись клинические проявления, которые могли быть связаны с вирусной инфекцией (повышение температуры, общая интоксикация и слабость, снижение аппетита, тошнота, рвота и т.д.), а также отмечались признаки дисфункции трансплантата или рецидива аутоиммунного гепатита, вирусного гепатита В и др. Результаты проведенного в данной группе реципиентов вирусологического обследования показали присутствие генетических маркеров вирусных инфекций у 44 пациентов, что составило 47,8% [37,91; 57,91]. В этиологической структуре вирусных осложнений ожидаемо преобладали ЦМВ, ВЭБ и ВК-вирусная инфекции (24,4% [16,29; 33,62], 18,8% [11,77; 27,71] и 17,6% [10,89; 26,5] соответственно). Доля реципиентов с ВГЧ<sub>6</sub> и ПВ В<sub>19</sub> инфекциями была значительно ниже (7,9% [3,49; 15,12] и 6,7% [2,75; 13,78] соответственно). Инфекции, вызванные ВПГ 1 и 2 типа, ВЗВ и АдВ, не были зарегистрированы. Что касается этиологической структуры выявленных вирусных осложнений, то у 7 из 44 позитивных реципиентов имело место смешанное инфицирование 2-я возбудителями (15,9% [7,61; 29,68]): ЦМВ+ВГЧ 6 (у 3 пациентов — 6,8% [1,68; 18,89]), ЦМВ+ВЭБ (у 2 пациентов — 4,5% [0,42; 15,97]), ВЭБ+ВК-вирус (у 1 пациента — 2,3% [0,06; 12,02]), ВЭБ+ВГЧ<sub>6</sub> (у 1 пациента — 2,3% [0,06; 12,02]). Моноинфекция, вызванная ЦМВ, регистрировалась у 17 пациентов (38,6% [25,69; 53,4]), ВЭБ — у 12 (27,3% [16,23; 41,97]), ВК-вирусом — у 5 (11,4%) [4,5; 24,43], ПВ В<sub>19</sub> — у 2-х (4,5% [0,42; 15,97]), ВГЧ<sub>6</sub> — у 1 (2,3% [0,06; 12,02]).

С целью внедрения накопленного опыта лабораторной диагностики вирусных инфекций при пересадке почки в практическое здравоохранение нами разработан алгоритм вирусологического обследования пациентов, в основе которого лежит использование комплекса современных серологических (ИФА) и молекулярно-

исследования в посттрансплантационный период включаются у доноров и реципиентов почки серологического статуса в отношении вирусов герпетического ряда (ЦМВ, ВЭБ, ВПГ 1 и 2 типа), выявление активной вирусной инфекции в отношении ВК-вируса (определение ДНК вируса в моче), а также проведение исследований по диагностике хронических вирусных гепатитов В, С и ВИЧ инфекции. Лабораторные исследования в посттрансплантационный период осуществляются в отношении только реципиентов и заключаются в скрининге наиболее вероятных этиологических агентов вирусных осложнений: ЦМВ, ВК-вируса и ВЭБ (определение ДНК вирусов в крови, моче). В случаях лабораторно подтвержденной виремии/вирурии (положительный результат качественной ПЦР) или наличия клинических признаков, которые могут указывать на ЦМВ, ВЭБ и ВК-вирусную инфекцию, проводится мониторинг вирусной нагрузки (определение количества ДНК вируса (копий/мл)). Достижение ее пороговых значений (в отношении ЦМВ — 1000–2600 копий/мл, в зависимости от серостатуса, для ВК-вируса —  $\geq 10000$  копий/мл в сыворотке крови, для ВЭБ —  $\geq 10000$  копий/мл при сохранении ее в течение  $\geq 2$  недель [8]) для реципиентов является показанием для назначения специфической этиотропной терапии и/или коррекции иммуносупрессивной терапии (для ВК-вирусной инфекции). В отношении других вирусных инфекций регламентируется вирусологическое обследование реципиентов при наличии клинических показаний, которое включает установление возбудителя с последующим количественным мониторингом вирусной нагрузки. Ключевым моментом использования предлагаемого алгоритма является адекватная интерпретация лабораторных данных, полученных на каждом этапе обследования, по результатам которого назначается противовирусная терапия или проводится коррекция иммуносупрессивной терапии, а их эффективность контролируется динамическим количественным мониторингом вирусной нагрузки.

Разработанный алгоритм вирусологического обследования пациентов при пересадке почки успешно апробирован в клинических условиях. Он рекомендуется для широкого использования в рутинной практике специализированных лабораторий научно-практических центров и лечебно-профилактических учреждений.

## LABORATORY DIAGNOSIS OF VIRAL INFECTIONS IN KIDNEY TRANSPLANTATION

*T.V. Amvrosieva, Z.F. Bogush, N.V. Poklonskaya*

**Field of application:** transplantation, laboratory diagnosis of viral infections.

**Proposals for co-operation:** guidance for laboratory diagnosis of viral infections in kidney transplant recipient.

### Литература

1. Прокопенко, Е.И. Вирусные инфекции и трансплантация почки (Обзор литературы, ч. I) / Е.И. Прокопенко // Нефрология и диализ. — 2003. — Т. 5, № 2. — С. 108–116.
2. Fishman, J.A. Infection in solid-organ transplant recipients / J.A. Fishman // N. Engl. J. Med. — 2007. — Vol. 357. — P. 2601–2614.
3. Prophylactic versus preemptive oral valganciclovir for the management of cytomegalovirus infection in adult renal transplant recipients / J.A. Khoury [et al.] // Am. J. Transplant. — 2006. — Vol. 6. — P. 2134–2143.
4. Treatment of BK virus-associated hemorrhagic cystitis and simultaneous CMV reactivation with cidofovir / T.K. Held [et al.] // Bone Marrow Transplant. — 2000. — Vol. 26. — P. 347–350.
5. Leflunomide for polyomavirus type BK nephropathy / J.W. Williams [et al.] // N Engl J Med. — 2005. — Vol. 352. — P. 1157–1158.
6. Marked Variability of BK Virus Measurement Using Quantitative Real-Time PCR among Commonly Used Assays / N.G. Hoffman [et al.] // J. Clin. Microbiology. — 2008. — Vol. 46, № 8. — P. 2671–2680.
7. Approximate is better than 'exact' for interval estimation of binomial proportions / Agresti A. [et al.] // The American Statistician. — 1998. — Vol. 52, № 2. — P. 119–126.
8. Алгоритм лабораторной диагностики вирусных инфекций при пересадке почки: инструкция по применению, пер. № 015-1213 от 25.03.2014 / Т.В. Амвросьева [и др.]. — Минск: УП «ИВЦ Минфина», 2014. — 20 с.