

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ПАРВОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ ПРИ ВОДЯНКЕ ПЛОДА

*Республиканский научно-практический центр эпидемиологии
и микробиологии, г. Минск, Беларусь*

Парвовирус В19 относится к возбудителям, которые могут передаваться трансплацентарно и вызывать поражение плода. В течение 2013–2014 гг. в Республике Беларусь при лабораторном обследовании 23 случаев неиммунной водянки плода в 7 (30,4%) была установлена парвовирусная этиология. ДНК парвовируса В19 была выявлена в сыворотке крови всех 7 женщин, а также в сыворотке крови или экссудате серозных полостей 5 из 6 обследованных новорожденных или плодов. Специфические IgM антитела были обнаружены у 2 (28,6%) из 7 женщин и ни у одного из 6 новорожденных/плодов. IgG антитела к парвовирусу В19 имели все женщины и только 50% новорожденных и плодов. Представленные результаты свидетельствуют о важности комплексного лабораторного обследования как женщины, так и плода для установления парвовирусной этиологии неиммунной водянки. Наиболее информативным методом является выявление ДНК парвовируса В19 в различных видах клинических образцов.

Ключевые слова: *парвовирусная инфекция, водянка плода, лабораторная диагностика.*

М. А. Yermalovich

LABORATORY DIAGNOSIS OF A PARVOVIRAL INFECTION AT FRUIT DROPSY

Parvovirus b19 is human pathogen that has transplacental transmission and can cause fetal damage. During 2013–2014 in belarus in total 23 cases of non-immune hydrops fetalis were laboratory tested and in 7 (30.4%) of them parvovirus etiology was confirmed. Dna of parvovirus b19 was

□ Оригинальные научные публикации

detected in blood serum samples of all 7 women and in blood or ascitic fluid samples of 5 from 6 tested newborn/foetus. specific igm antibodies were presented in 2 (28.6%) of 7 women and in none of 6 newborn/foetus. Positive level of igg to parvovirus b19 was detected in all women and only in 50% of their foetus. data obtained confirmed an importance of comprehensive laboratory investigation for both woman and her foetus for the conformation of parvovirus etiology in non-immune hydrops fetalis. The most reliable laboratory test is detection of parvovirus b19 dna in different kinds of clinical samples.

Key words: *parvovirus infection, hydrops fetalis, laboratory diagnosis.*

Водянка плода является полиэтиологическим синдромом и может быть обусловлена гемолитической болезнью плода вследствие иммунологической несовместимости с матерью (иммунная водянка), а также неиммунными факторами, включающими хромосомные аномалии, сердечно-сосудистые и метаболические нарушения, внутриутробные инфекции и другие причины. Парвовирус В19 относится к возбудителям, которые могут передаваться трансплацентарно и приводить к развитию неиммунной водянки плода [10].

Острая парвовирусная инфекция в период беременности может протекать в виде типичной инфекционной эритемы с макуло-папулезной сыпью, либо проявляться артропатиями с вовлечением мелких суставов рук и ног. Около 50% случаев первичного инфицирования парвовирусом В19 протекают субклинически или сопровождаются лишь неспецифическими симптомами острого респираторного заболевания [4]. Вероятность трансплацентарной передачи возбудителя не зависит от наличия, вида и степени выраженности симптомов у женщины.

В большинстве случаев от момента инфицирования женщины до заболевания плода проходит от 4 до 6 недель, однако риск внутриутробной передачи инфекции может сохраняться до 12–15 недель и более [5]. Максимальный риск развития водянки наблюдается при инфицировании женщины во втором триместре беременности, в период печеночной стадии кроветворения, когда клетки плода наиболее подвержены действию вируса. Основным патогенетическим механизмом парвовирусной водянки плода является развитие тяжелой анемии и сердечной недостаточности вследствие поражения возбудителем клеток предшественников эритроцитов.

До недавнего времени лабораторная диагностика парвовирусной инфекции в случаях водянки плода в Республике Беларусь не проводилась, и сведения о частоте выявления данной патологии отсутствуют. Целью настоящего исследования явилась оценка значимости серологических и молекулярно-генетических методов в установлении парвовирусной этиологии неиммунной водянки плода.

Материалы и методы

В 2013–2014 гг. для подтверждения парвовирусной инфекции были обследованы 23 женщины с диагнозом водянка плода, а также 20 их новорожденных или плодов. Во всех случаях признаки водянки плода были выявлены при скрининговом ультразвуковом исследовании в период беременности. У всех пациентов изоиммунизация по резус-антигенам (иммунная водянка) была исключена. На момент лабораторного обследования срок гестации составлял от 20 до 33 недель. Материалом для исследования служили сыворотка крови, пуповинная кровь, экссудат серозных полостей новорожденного или плода.

IgM и IgG антитела к парвовирусу В19 в сыворотке крови выявляли методом ИФА с использованием коммерческих наборов производства Virion/Serion, Германия. ДНК выделяли из 200 мкл биологического материала с помощью набора QIAamp DNA Blood Mini Kit (Нидерланды). Выявление диагностического фрагмента генома парвовируса проводили методом ПЦР в режиме реального времени [1], а также методом двухраундовой гнездовой ПЦР с использованием описанных в литературе праймеров и детекцией продуктов амплификации методом электрофореза в агарозном геле [8].

Результаты и обсуждение

Из 23 случаев неиммунной водянки плода лабораторные критерии парвовирусной инфекции были выявлены в 7 (30,4%). Этиологическая роль парвовируса В19 была установлена на основании результатов обследования как женщин, так и новорожденных/плодов. Из 7 лабораторно подтвержденных случаев парвовирусной водянки плода в шести были обследованы женщина и ребенок, в одном – только женщина (таблица).

IgM антитела к парвовирусу В19, являющиеся критерием острой инфекции, были обнаружены у 2 (28,6%) из 7 женщин. Специфические IgG антитела к парвовирусу В19 имели все женщины, что подтверждает перенесенную ими

Таблица. Выявление серологических и вирусологических маркеров парвовирусной инфекции при водянке плода

№ случая	Срок гестации при обследовании	Женщина			Новорожденный/плод		
		Антитела к парвовирусу В19*		ДНК парвовируса В19*	Антитела к парвовирусу В19*		ДНК парвовируса В19*
		IgM	IgG**		IgM	IgG**	
1	31	–	+	+	–	–	+
2	34	–	+	+	–	–	***
3	27	–	+	+	–	–	***
4	26	+	+	+	–	–	+
5	32	–	+	+	–	–	–
6	33	+	+	+	–	–	+
7	20	–	+	+	н. о.	–	н. о.

* Результаты исследования сыворотки крови.

** Концентрацию IgG антител < 3 МЕ/мл считали отрицательной, >5 МЕ/мл – положительной.

*** Результат исследования экссудата брюшной полости.

инфекцию, однако не позволяет определить сроки заболевания. У всех семи женщин в сыворотке крови была выявлена ДНК парвовируса В19, что считается наиболее надежным критерием инфицирования и явилось основанием для подтверждения парвовирусной инфекции.

При серологическом обследовании шести новорожденных и плодов IgM антитела к парвовирусу В19 не были выявлены ни в одном случае, независимо от срока гестации при заборе материала (таблица). Положительный уровень специфических IgG антител имели лишь трое новорожденных, срок гестации которых составлял 32–34 недели. При вирусологическом обследовании ДНК парвовируса В19 была выявлена у 5 из 6 новорожденных/плодов, в том числе у двух – в сыворотке крови, у одного – в пуповинной крови и у двух – в экссудате брюшной полости. Еще в одном случае, при исследовании сыворотки крови плода с резко выраженной водянкой в сроке гестации 33 недели, вирусная ДНК обнаружена не была. Никакой другой клинический материал этого плода в антенатальном и постнатальном периоде исследован не был, и диагноз парвовирусной инфекции был поставлен только на основании результатов обследования женщины.

Для двух случаев лабораторно верифицированной парвовирусной водянки плода было проведено повторное вирусологическое обследование женщины и ребенка (случай 1) или только женщины (случай 4) через 6 и 5 недель после родов, соответственно. Во всех случаях во вторых образцах сыворотки крови вирусная ДНК более не выявлялась ни у женщины, ни у ребенка.

Из семи случаев водянки плода парвовирусной этиологии четыре закончились антенатальной гибелью плода, еще три – рождением детей в сроке гестации 30–34 недели, один из которых умер на 2 сутки жизни.

Из семи женщин с верифицированной парвовирусной инфекцией в период беременности только одна ретроспективно указала на наличие заболевания с кратковременной макуло-папулезной сыпью приблизительно за три месяца до установления диагноза водянка плода. В остальных случаях заболевание с сыпью или контакт с заболевшими с сыпью в период беременности женщины отрицали. Две из них указывали на перенесенное в легкой форме острое респираторное заболевание, одна – на беспокоившую ее в течение нескольких дней артралгию за 8–12 недель до выявления водянки плода. Ни в одном случае в период появления указанных симптомов обследование женщины на парвовирусную инфекцию не проводилось.

Представленные результаты установления парвовирусной этиологии при неиммунной водянке плода являются первым опытом подобного исследования в нашей стране. Проведение комплексного серологического и вирусологического обследования позволило подтвердить парвовирусную инфекцию в 30% обследованных случаев. Как правило, с парвовирусом В19 связывают 10–20% неиммунной водянки плода [4]. Более высокая доля положительных результатов, полученная в настоящем исследовании, вероятнее всего, обусловлена тем, что на обследование направлялись преимущественно те пациенты, у которых клиницисты подозревали инфекционную природу заболевания.

Сложность постановки диагноза парвовирусной инфекции во время беременности определяется несколькими факторами. Во многих случаях у взрослых лиц, в том числе и у беременных женщин, такие характерные проявления, как экзантема и артралгия отсутствуют [7, 8], что не позволяет своевременно заподозрить заболевание и провести лабораторное обследование. Позднее обследование является причиной получения ложно отрицательных

результатов, поскольку при острой инфекции специфические IgM антитела и вирусная ДНК выявляются в течение ограниченного времени, как правило, в течение 1–3 месяцев, а обследование женщины нередко проводится позднее, уже после выявления патологии плода. Кроме того, для подтверждения внутриутробного инфицирования необходимо исследование разных видов клинического материала плода и новорожденного, получение которого также может представлять определенные трудности [6].

Проведенное исследование подтверждает преобладание неспецифических проявлений или субклиническое течение парвовирусной инфекции в период беременности. Только две из семи женщин ретроспективно указали на наличие симптомов, позволяющих заподозрить парвовирусную инфекцию – кратковременную макуло-папулезную сыпь и артралгии. Однако даже в этих случаях лабораторное обследование для верификации диагноза не проводилось, что свидетельствует о недостаточной осведомленности как медицинских работников, так и самих женщин об опасности инфицирования парвовирусом В19 в период беременности. В то же время известно, что около 40% населения Беларуси детородного возраста все еще остаются восприимчивыми к парвовирусу В19 [2], и, соответственно, риск инфицирования женщины в период беременности является достаточно высоким.

Выявление специфических IgM антител широко используется для диагностики парвовирусной инфекции у иммунокомпетентных лиц, однако значимость этого показателя при обследовании случаев водянки плода снижается. В нашем наблюдении IgM антитела имели менее 30% женщин с лабораторно подтвержденной парвовирусной водянкой плода. Аналогичные данные приводят и другие авторы [3, 9]. Поскольку от момента инфицирования женщины до заболевания плода проходит от 4 до 12 и более недель, то на момент проведения обследования у большинства женщин IgM антитела уже исчезают.

IgM антитела не передаются трансплацентарно, их наличие у новорожденного отражает его собственный иммунный ответ и служит показателем внутриутробного инфицирования. В нашем исследовании у новорожденных и плодов IgM антитела к парвовирусу В19 не были выявлены ни в одном случае. Исследования, проведенные в двух регионах Италии, также свидетельствуют о редком обнаружении IgM антител к парвовирусу В19 у новорожденных [3, 7]. При других внутриутробных инфекциях, например, врожденной краснухе, наличие специфических IgM у новорожденного и у плода после 25 недель гестации является важным и надежным диагностическим критерием. Для парвовирусной инфекции серологическое обследование в большинстве случаев водянки плода оказывается мало эффективным.

Специфические IgG антитела поступают к плоду от матери, а также формируются его иммунной системой при контакте с возбудителем. Однако в настоящем исследовании положительный уровень IgG антител к парвовирусу В19 был обнаружен лишь у половины новорожденных и плодов. Впервые подобные данные о редком выявлении IgG антител были получены J. Weiffenbach с соавторами [9]. Из 22 случаев парвовирусной водянки плода, выявленных в Германии, положительный уровень IgG имели лишь 25% плодов, при этом никакой корреляции уровня IgG антител женщины и плода не наблюдалось. Более того, при внутриутробном инфицировании парвовирусом В19 статистически чаще водянка и анемия развивалась у плодов, не имевших специфических IgG антител. Одним из возможных объяснений этого факта может являться повреждение плаценты, характерное для острой стадии парвовирусной инфекции,

□ Оригинальные научные публикации

хотя дальнейшее изучение вопроса формирования специфических IgG антител плода представляет несомненный интерес. Таким образом, при заболевании женщины в период беременности отсутствие у плода и новорожденного парвовирусных IgG еще не свидетельствует об отсутствии его инфицирования, и, более того, может являться неблагоприятным прогностическим признаком развития водянки.

Как и в ряде аналогичных работ [6], в настоящем исследовании наиболее информативным методом, позволившим подтвердить парвовирусную этиологию водянки плода, явилось выявление вирусной ДНК в образцах крови женщины, а также в различных биологических жидкостях ее новорожденного/плода с использованием полимеразной цепной реакции.

Несмотря на длительный период времени от момента инфицирования до обследования, наличие вируса в крови было обнаружено у всех семи женщин. У новорожденных и плодов, в отличие от женщин, из пяти ПЦР-положительных образцов только три были сыворотками крови. В двух случаях подтверждение инфицирования получено при исследовании экссудата серозных полостей, что свидетельствует о важности отбора нескольких видов биологического материала новорожденного или плода. Согласно данным литературы, наиболее высокая вероятность выявления ДНК парвовируса В19 существует при исследовании околоплодных вод [3], однако этот материал ни в одном из выявленных в Беларуси случаев водянки плода не был доставлен в лабораторию.

В целом, во всех пяти случаях адекватного вирусологического обследования наблюдалась полная корреляция положительных результатов выявления вируса у женщины и новорожденного или плода. Исходя из этого, с высокой вероятностью можно полагать, что те случаи водянки плода, в которых парвовирусная инфекция была подтверждена только у женщины, а плод не был обследован или отрицательный результат был получен только при исследовании его сыворотки крови, также были вызваны парвовирусом В19. В то же время, несомненно, что в каждом случае следует как можно более полно обследовать женщину и плод для получения убедительных данных внутриутробного инфицирования.

Таким образом, анализ результатов лабораторного обследования случаев неиммунной водянки плода позволил сделать следующие выводы. Парвовирусная инфекция играет существенную роль в этиологии неиммунной водянки плода в Беларуси, в 2013–2014 гг. она была подтверждена в 30% обследованных случаев. Преобладание неспецифических клинических проявлений парвовирусной инфекции у взрослых создает значительные трудности для своевременной диагностики заболевания. С учетом этого,

необходимо проводить лабораторное обследование беременных женщин при любом подозрении на возможное заболевание или при контакте с пациентами с сыпью и лихорадкой. При выявлении неиммунной водянки плода важно обследовать как женщину, так и новорожденного/плода с использованием вирусологических и серологических методов. Наиболее надежным методом, позволяющим подтвердить этиологическую роль парвовируса В19, является выявление вирусной ДНК в сыворотке крови женщины, а также в сыворотке крови и других биологических жидкостях плода.

Литература

1. Ермолович, М. А. Разработка отечественной тест-системы для выявления ДНК парвовируса В19 в клинических образцах / М. А. Ермолович, А. С. Бабенко, Е. О. Самойлович // Сборник республиканской научно-практической конференции «Актуальные проблемы медицины». – Гомель, 16–17 февраля 2012 г. – С. 8–10.
2. Ермолович, М. А. Распространенность IgG антител к парвовирусу В19 у жителей Беларуси / М. А. Ермолович, А. М. Дронина, Е. О. Самойлович // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2014. – № 1. – С. 9–13.
3. Gestational and fetal outcomes in B19 maternal infection: a problem of diagnosis / F. Bonvicini [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2011. – Vol. 49. – P. 3514–3518.
4. Heegaard, E. D. Human parvovirus B19 / E. D. Heegaard // Clin. Microbiol. Rev. – 2002. – Vol. 15. – P. 485–450.
5. Human parvovirus B19 infection during pregnancy – value of modern molecular and serological diagnostics / M. Enders [et al.] // J. Clin. Virol. – 2006. – Vol. 35. – P. 400–406.
6. Improved diagnosis of gestational parvovirus B19 infection at the time of nonimmune fetal hydrops / M. Enders [et al.] // J. Inf. Dis. – 2008. – Vol. 197. – P. 58–62.
7. Parvovirus B19 in pregnancy: possible consequences of vertical transmission / C. Puccetti [et al.] // Prenat. Diagn. – 2012. – Vol. 32. – P. 897–902.
8. Phylogenetic analysis of human parvovirus b19 sequences from eleven different countries confirms the predominance of genotype 1 and suggests the spread of genotype 3b / J. M. Hübschen [et al.] // J. Clin Microbiol. – 2009 Nov; 47(11):3735–8.
9. Serological and virological analysis of maternal and fetal blood samples in prenatal human parvovirus B19 infection / J. Weiffenbach [et al.] // J. Infect Dis. 2012. 205(5):782–8.
10. Speer, M. E. Immune and non-immune hydrops fetalis / M. E. Speer // Neonatology today. – 2006. – Vol. 1. – P. 1–6.