

МАРКЕРЫ КРАСНУХИ У НОВОРОЖДЕННЫХ ДЕТЕЙ В РАННЕМ НЕОНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ И ИХ МАТЕРЕЙ

Малкова Е.М., Егошина Н.М., Петрова И.Д., Терещенко И.П., Минакова Ю.В.,
Голубина Е.А., Тюнников Г.И., Яшина Л.Н., Хохлова З.А., Помогаева А.П., Петров В.С.
E-mail: malkova@vector.nsc.ru

Зональный перинатальный центр, родильный дом №1, Новокузнецк;

ГОУ ДПО Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей;

ГОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет, Томск;

ФГУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»

Интерес к изучению краснушной инфекции связан в первую очередь с тератогенным воздействием вируса на плод в случае инфицирования беременных. Известно, что инфекционный процесс при повышении заболеваемости краснухой вовлекается большое количество населения, часть из которого составляют беременные женщины. Широкому распространению заболевания способствуют относительно легкое клиническое течение краснухи, наличие стертых и бессимптомных форм, высокая контагиозность заболевания, длительное выделение вируса больными [1, 2, 3]. В России к краснухе остаются чувствительными около 20 % женщин репродуктивного возраста [4, 5].

Вирус способен проникать через плаценту и реплицироваться в развивающемся плоде, вызывая врожденные пороки развития [6]. Возникающие аномалии развития, встречаются в различных сочетаниях, и тем самым обуславливают индивидуальные особенности течения врожденной краснухи у каждого конкретного больного [2, 7]. Большинство детей выделяют вирус, который может быть изолирован из мочи и носоглоточных смывов в течение первого года жизни, несмотря на присутствие материнских иммуноглобулинов класса G (IgG) и выработку иммуноглобулинов класса M (IgM) самим ребенком [4].

Целью данной работы было обнаружение маркеров краснушной инфекции и оценка их значимости в состоянии здоровья матерей и новорожденных детей, находившихся в родильном доме в период эпидемического подъема заболеваемостью краснухой.

Материалы и методы исследования

Проведено комплексное изучение краснухи в родильном доме №1 Зонального перинатального центра Новокузнецка с использованием клинического, иммунологического и молекулярно-биологического методов. При поддержке гранта МНТЦ «Молекулярная идентификация изолятов вируса краснухи, циркулирующего в Западной Сибири» (2924р) обследовано 42 женщины и 42 новорожденных ребенка с различными аномалиями развития и клиническими признаками внутриутробной инфекции. Исследования проводились в 2004-2006 годах, когда отмечалось эпидемическое увеличение заболеваемости краснухой в Западно-Сибирском регионе, и не проводилась вакцинация против краснухи. Обследование выполнялось с разрешения Этического комитета, были получены письменные согласия матерей.

В лаборатории вирусологии ФГУН Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» проводилась детекция вирусного генетического материала в биологических жидкостях (кровь, моча) методом обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с использованием двух наборов специфических праймеров: описанного ранее в литературе [8] и разработанного в ГНЦ ВБ «Вектор» [9]. Методом иммуноферментного анализа (ИФА) выявляли специфические иммуноглобулины класса М (IgM) и иммуноглобулины класса G (IgG) с использованием тест-систем «ВектоРубелла-IgG» и «ВектоРубелла-IgM» (Вектор-Бест, Кольцово) (ФСП 42-0117-4696 и 42-0117-4694-03), индекс avidности определяли с использованием тест-системы «ВектоРубелла-IgG-avidность» (Вектор-Бест, Кольцово) (ФСП 42-0117-4695-03). Индекс avidности более 70 % в данной тест-системе выявляет реконвалесцентов краснушной инфекции.

Для статистической обработки полученного материала при оценке количественных признаков использовали альтернативный анализ, метод вариационной статистики: вычисление средней арифметической (M) и ее ошибки (m), метод оценки достоверности отличий показателей между группами по критериям Стьюдента-Фишера с определением показателя статистической достоверности ($p < 0,05$).

Результаты и их обсуждение

В России после 2000 года (в условиях отсутствия производства отечественной противокраснушной вакцины) заболеваемость краснухой увеличивалась почти в два раза,

однако в последние два года (2006-2007 гг.) отмечается снижение данного показателя [10, 11, 12, 13, 14] (табл.1). Высокий уровень заболеваемости указывал на то, что вакцинопрофилактика краснухи осуществлялась недостаточно, и это не позволяло взять под контроль данную инфекцию. Существующая в настоящее время в России система эпидемиологического надзора за краснухой оказалась малоэффективной, так как слежение за ходом эпидемиологического процесса ориентировано на регистрируемую заболеваемость, то есть на манифестные формы инфекции. В то же время у взрослых пациентов от 30 до 70 % заболеваний краснухой протекает в бессимптомной форме.

Таблица 1

Заболеваемость краснухой в России [10, 11, 12, 13, 14]

Год	Заболеваемость на 100000 населения	Заболеваемость детей до 14 лет
2000	310,2	1471,4
2001	393,7	1801,9
2002	236,7	1158,8
2003	89,33	411,7
2004	101,8	432,8
2005	100,1	416,1
2006	92,62	386,5
2007	21,61	97,95

В Кемеровской области в 2003 году зарегистрировано 1430 случаев заболеваний краснухой (49,3 на 100 000 населения), в 2004 г. – 991 случай (34,8 на 100 000 населения). В 2005 г. в области отмечался резкий подъём заболеваемости краснухой, только за 9 месяцев было зарегистрировано 13 300 случаев, в том числе при этом в возрасте 18 - 25 лет было 35 % заболевших, рост заболеваемости превысил заболеваемость в 2004 году в 29 раз [15]. В Новокузнецке в 2005 году заболеваемость составила 618,5 на 100 000 населения, в 2006 году – 90,3 на 100 000 населения, что, в целом, соответствовало показателям представленным по Российской Федерации. Именно в период наибольшего подъема заболеваемости краснухой было проведено настоящее исследование.

Все обследованные 42 женщины при поступлении в родильный дом не имели клинических признаков краснухи и в большинстве отрицали контакты с больными краснухой. Только одна женщина болела перед родами краснухой и одна женщина контактировала во время беременности с больным.

Средний возраст матерей составил $25,31 \pm 6, 21$ лет. Старше 40 лет была только

одна женщина в обследованной группе рожениц. Большинство женщин представлялись в родильном доме как домохозяйки (70,7 %). Занимались профессиональной деятельностью, связанной с общением с большим количеством людей (учителя, медицинские работники), и были студентками 12 женщин (29,3 %). Соматические заболевания отмечали у 9 женщин (21,4 %), анемию во время беременности у 14 (33,3 %).

Течение беременности сопровождалось развитием токсикоза 1 половины беременности у 7 женщин (16,7 %), гестоза у 6 женщин (14,3 %), угрозы прерывания беременности у 13 женщин (30,9 %). Три женщины указывали на заболевание острой респираторной инфекцией во время беременности. У одной женщины диагностирован гепатит С. Во время беременности у 7 плодов была выявлена гипоксия (16,7 %). В 11 случаях (26,2 %) диагностировалась хроническая фетоплацентарная недостаточность.

Самопроизвольные срочные роды отмечались у 38 женщин. Преждевременными роды были только в двух случаях. У одной женщины отмечено перенашивание беременности. В состоянии асфиксии родилось 7 детей (16,7 %). Признаки задержки внутриутробного развития выявлены у 13 новорожденных (30,9 %).

В связи с возможным тератогенным воздействием вируса краснухи на плод исследование проводилось преимущественно в группе матерей, родивших детей с аномалиями развития. Среди обследованных детей не имели пороков развития 5 человек (11,9 %). Врожденные пороки сердца были у 10 новорожденных (23,8 %), пороки развития скелета – у 7 детей (16,7 %), гидроцефалия у 7 детей (16,7 %), множественные пороки развития – у 6 новорожденных (14,3 %), синдром Дауна – у 7 детей (16,7 %). Следует отметить, что ранее проведенные нами исследования показали наличие маркеров краснухи и течение инфекционного процесса у детей с синдромом Дауна [16, 17].

При рождении состояние детей оценивалось как тяжелое в случаях преждевременных родов, асфиксии новорожденных и множественных пороков развития (у 15 новорожденных). Один ребенок родился в состоянии крайней степени тяжести и умер через 40 минут после рождения. В остальных наблюдениях состояние ребенка определялось локализацией порока развития, признаки которого доминировали в клинической картине.

В группу детей, не имевших пороков развития (5 человек), были отобраны новорожденные с малым весом (чаще всего синдромом задержки развития плода) и выраженными признаками интоксикации. Обследование матерей, родивших детей без

пороков развития, в условиях акушерского стационара с использованием ОТ-ПЦР дало отрицательные результаты. Однако у одной женщины были выделены IgM, что предполагало наличие начальной стадии инфекции. В анамнезе есть указание, что за две недели до родов беременная женщина заболела острой респираторной инфекцией. Именно в данном клиническом случае недоношенный ребенок не имел пороков развития, но прожил менее часа и умер при развитии тяжелого дистресс-синдрома, дыхательной и сердечно-сосудистой недостаточности. При патологоанатомическом исследовании выявлены отечно-геморрагический синдром в легких, гидроторакс, асцит. В другом случае обнаружены IgG с низким индексом avidности, свидетельствующие о недавно перенесенном заболевании. У детей, не имевших пороков развития, РНК вируса краснухи не была выделена, отсутствовали IgM и низкоавидные IgG.

В 37 случаях роды закончились рождением детей с врожденными пороками развития. У 7 (20,0 %) матерей детей данной группы была выделена РНК вируса краснухи. Среди матерей детей с врожденными пороками сердца положительные результаты ОТ-ПЦР получены в 20,0 %, с синдромом Дауна – в 28,6 %, с пороками развития скелета – в 16,7 %, с гидроцефалией – в 16,7 % и с множественными пороками развития в 16,7 % (процент подсчитан внутри группы с указанным пороком развития) ($p < 0,05$).

Положительные IgM определили у трех женщин (у их детей в одном случае был врожденный порок сердца, в другом – порок развития скелета и в последнем случае – гидроцефалия). IgG с низким индексом avidности были у 9 женщин. При этом только у двух женщин выделение РНК вируса краснухи сочеталось с выявлением низкоавидных IgG. В 7 наблюдениях IgG с низким индексом avidности у женщин были обнаружены при отрицательных результатах ПЦР. При выявленной сероконверсии матерей отмечены: у трех детей синдром Дауна, у 4 новорожденных врожденный порок сердца, у двух детей пороки развития скелета, у 4 новорожденных гидроцефалия и у трех детей множественные пороки развития.

У детей с врожденными пороками развития РНК вируса краснухи выделена в 8 наблюдениях (21,6 %): у двух детей с врожденными пороками сердца, у двух – с синдромом Дауна, у двух – с пороками развития скелета, у одного ребенка с гидроцефалией и одного с множественными пороками развития. IgG с низким индексом avidности были обнаружены у 11 новорожденных (2 ребенка с синдромом Дауна, 3 – с врожденными пороками сердца, 3 – с пороками развития скелета, 2 – с гидроцефалией и 1

– с множественными пороками развития). У двух детей с положительными результатами ПЦР отмечалось наличие низкоavidных IgG.

Особо следует остановиться на случаях заболевания краснухой перед родами и контакта с больными краснухой. В первом случае беременная женщина имела клинические признаки краснухи за несколько дней до родов. Через сутки после родов методом ОТ-ПЦР была выделена РНК вируса краснухи, IgM не определялись, титр IgG составил 1:800. Аналогичные серологические показатели выявлены у ребенка. Состояние ребенка было тяжелым, отмечалась задержка внутриутробного развития и гидроцефалия, симптомы интоксикации, выявлены проявления острого инфекционного процесса в виде конъюнктивита, энтероколита. В случае зафиксированного контакта с больным краснухой в первой половине беременности результаты молекулярно-биологического исследования были отрицательными, Ig класса M не определялись, Ig класса G и у матери, и у ребенка обнаружены в титре 1:800. Общее состояние ребенка при рождении не было тяжелым, выявлен порок развития скелета.

Следует отметить, что женщины, у которых впоследствии были выявлены лабораторные признаки острой краснушной инфекции, поступали в родильный дом в разные дни и в разные отделения. Ни женщины, ни их дети не находились одновременно в одной палате или в одном отделении, что исключает их внутрибольничное инфицирование.

Варианты соответствия серологического и молекулярно-биологического исследования клиническим периодам постнатальной краснушной инфекции были опубликованы нами ранее [16] и представлены в таблице 2.

Таблица 2

Сопоставление периодов заболевания краснухой с результатами серологического и молекулярного биологического исследования

Клиническая характеристика	Возможные варианты результатов ИФА и ОТ-ПЦР
Продромальный период Начало заболевания	IgM(-), IgG(-), PCR(+)
	IgM(+), IgG(-), PCR(+)
	IgM(+), IgG(-), PCR(-)
Течение заболевания	IgM(+), IgG(+), ИА <70, PCR(+)
	IgM(-), IgG(+), ИА <70, PCR(+)
	IgM(+), IgG(+), ИА <70, PCR(-)
	IgM(-), IgG(+), ИА <70, PCR(-)

Поздняя стадия заболевания Персистенция?	IgM(-), IgG(+), PCR(+)
Другое инфекционное заболевание с синдромом экзантемы	IgM(-), IgG(+), PCR(-) IgM(-), IgG(-), PCR(-)

Примечание: ИА <70 – индекс avidности меньше 70

Таким образом, при анализе полученных результатов лабораторного исследования выделены следующие группы результатов, которые можно расценить как случаи инфицирования вирусом краснухи или развития заболевания:

- 1) матери и дети с положительными результатами ОТ-ПЦР (3 пары): отсутствие сероконверсии при выявлении РНК вируса краснухи, характерно для конца инкубационного периода и первых трех дней манифестации заболевания;
- 2) матери с положительными результатами ОТ-ПЦР и дети с отрицательными результатами ОТ-ПЦР (5 пар): в данной ситуации представлено наличие продромального периода или начальной стадии заболевания у матери, ребенку вирус краснухи или не передан трансплацентарно, или нет высокой степени вирусемии и вирурии;
- 3) матери с отрицательными результатами ОТ-ПЦР и дети с положительными результатами ОТ-ПЦР (5 пар): присутствие РНК вируса краснухи у ребенка может отражать длительную персистенцию вируса в организме плода, поскольку одновременно были обнаружены IgG. Именно в этих случаях можно однозначно связать развитие врожденного порока развития с краснушной инфекцией. Но при этом не исключено, что отсутствие РНК вируса краснухи у матери может быть связано с нарушением хранения и транспортировки биологического материала, ошибками лабораторной диагностики;
- 4) матери с положительными IgM и дети с отрицательными IgM (4 пары): характерно для начальной стадии заболевания у матери и отражает начало сероконверсии при невыраженной вирусемии;
- 5) матери с низким индексом avidности IgG и дети с низким уровнем avidности IgG (3 пары): даже при отрицательных результатах ОТ-ПЦР отражает течение заболевания у матери;
- 6) дети, у которых индекс avidности IgG ниже материнского: в этих случаях возможно или развитие заболевания у плода, или ошибка лабораторной

диагностики.

Критерием определения острого течения краснушной инфекции являлось наличие IgM, сероконверсия IgG и выделение РНК вируса краснухи, поэтому определение субклинической формы данного заболевания у женщин при комплексной лабораторной диагностике не вызывало сомнений. Обнаружение специфических IgM в крови новорожденного ребенка в первые три недели жизни является одним из основных методов диагностики врожденной краснухи. Однако отсутствие положительных результатов при определении иммуноглобулинов класса М у новорожденных детей в наших наблюдениях может объясняться как отсутствием иммунного ответа у плода, так и недостаточной чувствительностью использованных тест-систем, а также не исключены возможные нарушения правил взятия, хранения и транспортировки биологического материала.

Наряду с явными достоинствами серологических методов диагностики следует отметить ряд обстоятельств, ограничивающих сферу их применения. Возможно получение ложноположительных результатов за счет существования антигенных перекрестов между белками различных вирусов, и между белками вирусов и клеток организма. Кроме того, сила иммунного ответа на определенные вирусные антигены и время его регистрации могут варьировать в зависимости от иммуногенетического статуса человека, его возраста, свойств вируса и других причин. У лиц с иммунодефицитом, новорожденных и детей раннего возраста продукция антител к определенным антигенам может отсутствовать или носить необычный характер. Чувствительность используемых методов иногда оказывается недостаточной для обнаружения антигенов с низким уровнем продукции. Специфичность ИФА при исследовании клинических образцов часто снижается из-за присутствия различных контаминантов и используемых лекарственных препаратов [19].

Критерии постановки диагноза синдрома врожденной краснухи в настоящее время не однозначны [1, 2, 6, 8, 20, 21]. Вследствие внутриутробного инфицирования вирусом краснухи возможны следующие исходы беременности: самопроизвольный выкидыш; мертворождение; поражение только плаценты; поражение плода и плаценты (рубеолярная эмбриофетопатия); рождение здорового ребенка; рождение ребенка с клиническими формами заболевания. Как любая внутриутробная инфекция врожденная краснуха может протекать остро, субклинически с неспецифической симптоматикой, а также латентно, что вызывает трудности в ее диагностике. Комплекс современных методов диагностики краснухи включает количественное определение специфических иммуноглобулинов

класса М (IgM) и иммуноглобулинов класса G (IgG) к вирусу краснухи, определение индекса авидности специфических IgG, выявление РНК вируса краснухи [22]. Данный комплекс исследований является наиболее оптимальным для постановки диагноза и контроля за течением заболевания.

Таким образом, проведенное исследование показало, что в период повышения заболеваемости краснухой в родильные дома могут поступать инфицированные или больные краснухой беременные женщины. Следует учитывать возможность отсутствия типичных проявлений инфекционного заболевания у женщин и развитие субклинического или бессимптомного течения заболевания. Однако выявленное выделение этими женщинами РНК вируса краснухи указывает на опасность инфицирования других пациентов родовспомогательного учреждения. Безусловно, актуально проведение комплексной лабораторной диагностики и для новорожденных детей, поскольку это позволяет выявить соответствие обнаруженных пороков развития синдрому врожденной краснухи.

Работа выполнена при поддержке гранта МНТЦ «Молекулярная идентификация изолятов вируса краснухи, циркулирующего в Западной Сибири» (2924р).

Список литературы:

1. Esterly J.R., Oppenheimer E.H. Intrauterine rubella infection. *Perspect. Pediatr. Pathol.* 1973, 1: 313-338.
2. Казанцев А.П., Попова Н.И. Внутриутробные инфекционные заболевания детей и их профилактика. *Медицина*, 1980.
3. Frey T.K. Molecular biology of rubella virus. *Advances in virus research* 1994, 44:69-160.
4. Скрипченко Н.В., Скоромец А.П., Сорокина М.Н. Поражение нервной системы при врожденных инфекциях. СПб, 2003.
5. Учайкин В.Ф. Научные и организационные приоритеты инфекционной патологии у детей. *Педиатрия* 2003, 3:6-10.
6. Atreya C.D., Mohan S. Kulkarni K.V.K. Rubella virus and birth defects: molecular insights into the viral teratogenesis at the cellular level. *Birth Defects Research (Part A): Clinical and Molecular Teratology* 2004, 70:431-437.
7. Czeizel E.A. Birth defects are preventable. *Int. J. Sci.* 2005, 2:91-92.

8. Bosma T.J. et al. Use of PCR for prenatal and postnatal diagnosis of congenital rubella. *J Clin Microbiol.* 1995, 33:2881–2887.
9. Петрова И.Д. и др. Разработка метода диагностики заболеваний краснухой на ранних стадиях беременности. *Аллергия, астма и клиническая иммунология* 1999, 9:131-136.
10. Семериков В.В., Висницкий Н.Н., Сергевнин В.И. и др. Эпидемиологические закономерности краснухи и пути совершенствования эпидемического надзора. *Журнал микробиол.* 1994, 1:36-39.
11. Семериков В.В., Попов В.Ф., Седельникова Т.А. и др. Краснуха в России: выявление врожденной краснухи, стратегия и тактика вакцинации. *Журн. микробиол.* 1998, 1:46-49.
12. Фисенко Ю.Ю., Фисенко В.А., Тихонова Н.Т. Краснуха: клиничко-иммунологический аспект. *Педиатрия* 2000, 6:91-94.
13. Шарапова О.В., Корсунский А.А. XXI век – инфекционные заболевания у детей отстают, но не сдаются. *Педиатрия* 2003, 3:4-6.
14. Ясинский А.А., Михеева И.В., Лыткина И.Н., Жукова Г.А. Проблемы профилактики краснухи в России. *Детские инфекции* 2004, 2:11- 13.
15. Воронина Е.Н., Кожевина Г.И., Краснов А.В. Клиничко-эпидемиологические особенности краснушной инфекции у взрослых и детей. Сборник научных трудов «Медико-биологические проблемы», выпуск 14. Кемерово – Москва, 2005.
16. Малкова Е.М., Терещенко И.П., Гришаева О.Н. и др. Врожденная краснуха у ребенка с болезнью Дауна. *Детские инфекции* 2006, 3:74-76.
17. Малкова Е.М., Терещенко И.П., Петрова И.Д. и др. Обнаружение маркеров внутриутробных инфекций у детей с синдромом Дауна. *Детские инфекции* 2007, 1:42-45.
18. Малкова Е.М., Петрова И.Д., Смердова И.А. и др. Клиничко-иммунологическая характеристика краснухи в Западно-Сибирском регионе. *Журн. Микробиол.* 2007, 2:44-48.
19. Чаплыгина Н.М., Кицак В.Я. Современные методы диагностики врожденной вирусной инфекции. *Росс. вестн. перинатол.* 1996, 1:31-34.

20. Малкова Е.М., Терещенко И.П., Гришаева О.Н. и др. Изучение роли вируса краснухи в формировании врожденных пороков развития методом РТ-ПЦР. *Детские инфекции* 2004, 3:5-8.
21. Banatvala J.E., Brown D.W.G. Rubella. *Lancet* 2004, 363:1127-1137.
22. Tubbs H. Acute childhood exanthemata. *Medicine* 2005, 33:135-139.