

Ocena związku poziomu wirerii HCMV u matki z przebiegiem ciąży i stanem urodzeniowym noworodków

Evaluation of the association between maternal HCMV viremia and the course of pregnancy and neonatal outcome

Magdalena Rycel¹, Zuzanna Gaj¹, Jan Wilczyński^{1,3}, Edyta Paradowska², Mirosława Studzińska², Patrycja Suski², Dorota Nowakowska^{1,3}

¹ Klinika Medycyny Matczyno-Płodowej i Ginekologii, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki, Łódź, Polska

² Pracownia Wirusologii Molekularnej i Chemii Biologicznej, Instytut Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk, Łódź, Polska

³ Klinika Medycyny Matczyno-Płodowej i Ginekologii, III Katedra Położnictwa i Ginekologii, Uniwersytet Medyczny, Łódź, Polska

Streszczenie

Wrodzona cytomegalia wywołana transmisją wirusa cytomegalii (HCMV) od matki do płodu, jest najczęstszym zakażeniem wertykalnym.

Cel pracy: Celem pracy była ocena poziomu wirerii u kobiet ciężarnych i jej wpływu na przebieg i czas trwania ciąży oraz stan urodzeniowy noworodków.

Materiał i metody: Materiałem do badań była krew pobrana od 117 ciężarnych z serologicznymi cechami zakażenia HCMV oraz 29 noworodków hospitalizowanych w Klinice Medycyny Matczyno-Płodowej i Ginekologii Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w latach 1999-2009. Liczba kopii DNA HCMV we krwi matek i dzieci oznaczana była metodą PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR).

Wyniki: Stwierdzono, że występowanie wirerii HCMV u matki zwiększa ryzyko występowania wirerii u noworodków w porównaniu z ryzykiem u dzieci matek bez wirerii, jednakże brak DNA HCMV we krwi matki nie wyklucza zakażenia płodu in utero. Stan urodzeniowy noworodków oceniany w skali Apgar był istotnie niższy w grupie noworodków urodzonych przez matki z serologicznymi cechami ostrej cytomegalii ($p < 0,05$).

Wnioski: Ocena poziomu wirerii we krwi kobiet ciężarnych może być pomocna w ocenie ryzyka wewnątrzmacicznego zarażenia płodu, a także w prognozowaniu stanu urodzeniowego.

Słowa kluczowe: ludzki wirus cytomegalii / ciąża / wrodzone zakażenie CMV /

Adres do korespondencji:

Dorota Nowakowska
Klinika Medycyny Matczyno-Płodowej i Ginekologii
III Katedra Położnictwa i Ginekologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi
ul. Rzgowska 281/289, 93-338 Łódź, Polska
tel.: +48 42 271 10 77, fax: +48 42 271 10 70
e-mail: dnowakowska@yahoo.com

Otrzymano: 23.05.2013
Zaakceptowano do druku: 30.09.2013

Magdalena Rycel et al. Ocena związku poziomu wirerii HCMV u matki z przebiegiem ciąży i stanem urodzeniowym noworodków.

Abstract

Congenital cytomegaly is caused by intrauterine mother-to-fetus HCMV transmission and constitutes the most common vertical infection.

Objectives: *The aim of the study was to analyze the viremia level in maternal blood and its influence on the course and duration of pregnancy, as well as newborn condition.*

Material and methods: *The material included blood samples collected from 117 pregnant women with serological features of HCMV infection and from 29 neonates hospitalized at DFMMG in Lodz between 1999 and 2009. The presence of HCMV DNA in the maternal and fetal blood was tested using real-time PCR.*

Results: *Prevalence of maternal viremia was observed to increase the risk of viremia in neonates, as compared to children born to mothers with no viremia. However, lack of HCMV DNA in maternal blood does not exclude fetal infection in utero. Newborn condition assessed by Apgar scores was significantly lower in the group of infants born to mothers with serological features of acute cytomegaly ($p < 0.05$).*

Conclusion: *The assessment of viremia level in maternal blood can be helpful in assessing the risk of intrauterine infection in the fetus as well as in predicting the neonatal outcome of newborn.*

Key words: **human cytomegalovirus / pregnancy / congenital infection CMV /**

Wstęp

Cytomegalia wywoływana przez ludzki wirus cytomegalii HCMV (z ang. Human Cytomegalovirus), należy do chorób szeroko rozpowszechnionych na całym świecie. Ocenia się, że u 60-80% populacji Europy Centralnej występują swoiste przeciwciała anty-HCMV [1, 2]. W populacji polskiej, w grupie 2000 zdrowych kobiet w wieku rozrodczym, obecność przeciwciał anty-HCMV stwierdzono przed ciążą u ponad 50% badanych kobiet [3]. W badaniach własnych prowadzonych w latach 1999-2009 stwierdzono, że prevalencja immunoglobulin IgG anty-HCMV u ciężarnych wynosiła 76,7% [4]. Zakażenie pierwotne w grupie kobiet w ciąży pojawia się z częstością od 0,7-4,4% przypadków. Nawrotowe zakażenie ma miejsce u około 13% ciężarnych. Do transmisji wirusa do płodu dochodzi w 30-40% przypadków podczas zakażeń pierwotnych oraz w 0,5-1,4% przypadków reaktywacji zakażenia u kobiet ciężarnych [5, 6]. Cytomegalia wrodzona jest najczęstszym z zakażeń występujących w okresie prenatalnym. Zakażenie HCMV wywołuje ciężkie objawy u niewielkiej liczby płodów, ale u większości zakażonych dzieci może być przyczyną powikłań w kolejnych latach życia.

Ze względu na szerokie rozpowszechnienie wirusa i istniejące ryzyko zakażenia w trakcie ciąży, niezmiernie ważne jest stosowanie wiarygodnych metod pozwalających na potwierdzenie jego obecności w organizmie ciężarnej i płodu. Zastosowanie odpowiednich metod diagnostycznych w rozpoznawaniu zakażeń HCMV ma na celu udzielenie odpowiedzi na dwa kluczowe pytania, tzn. czy płód jest zakażony oraz czy ma objawy kliniczne zakażenia *in utero*. Oceny takiej dokonuje się m.in. na podstawie oznaczeń liczby kopii DNA wirusa w próbkach płynu owodniowego, krwi pełnej płodu i noworodka oraz krwi matki. Według niektórych autorów poziom wirerii we krwi płodu oraz liczba wirionów w płynie owodniowym i komórkach łożyska może być ważnym czynnikiem prognostycznym dla zakażonego płodu [7, 8].

Cel pracy

Celem prezentowanej pracy była ocena wpływu poziomu wirerii u matki na przebieg i czas trwania ciąży, a także na stan urodzeniowy noworodków.

Materiał i metody

Grupę badaną stanowiły kobiety ciężarne hospitalizowane w Klinice Medycyny Matczyno-Płodowej i Ginekologii Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki, gdzie w latach 1999-2009 objęto badaniami serologicznymi w kierunku zakażenia wirusem cytomegalii 1332 kobiety.

Z tej grupy wyłoniono 117 ciężarnych z serologicznymi cechami ostrej cytomegalii, u których przeprowadzono dalsze badania mające na celu ilościową ocenę poziomu wirerii. Obecność DNA HCMV zbadano także u 29 noworodków matek, u których stwierdzono obecność przeciwciał IgM i/lub IgA HCMV. Grupę kontrolną stanowiło 51 ciężarnych, u których nie stwierdzono w surowicy obecności przeciwciał skierowanych przeciwko HCMV, a także parwowirusowi B19 i pierwotniakowi *Toxoplasma gondii*. Materiał biologiczny wykorzystany do badań stanowiła krew pełna matki, krew pełna pobrana od noworodków bezpośrednio po porodzie oraz krew pępowinowa.

Badania serologiczne i ultrasonograficzne

Do badań kwalifikowano ciężarne, u których we wcześniejszych wykonanych oznaczeniach serologicznych stwierdzono obecność przeciwciał anty-HCMV w klasie IgM lub/i IgA oraz niską lub graniczną awidność przeciwciał klasy IgG, a także kobiety, u których w badaniu ultrasonograficznym stwierdzono cechy mogące wskazywać na zakażenie płodu *in utero* (opóźnienie wzrostu, poszerzenie komór bocznych mózgu, wodogłowie, wodobrzusze oraz zaburzenia objętości płynu owodniowego).

Do przeprowadzenia badań serologicznych matek i noworodków wykorzystano trzy testy immunoenzymatyczne: w latach 1999 – 2001: test Etl-Cytok G-Plus (DiaSorin Biomedica, Saluggia, Włochy), 2001 – 2006: test VIDAS IgG i IgM (bioMerieux, Marcy-l'Etoile, Francja) oraz 2006 – 2009: test anty-CMV IgG i IgM (DiaSorin Biomedica, Saluggia, Włochy).

Izolacja DNA

DNA genomowe z krwi pełnej kobiet ciężarnych, noworodków i krwi pępowinowej izolowano przy użyciu komercyjnego zestawu kolumnowego QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Niemcy).

Magdalena Rycel et al. Ocena związku poziomu wirerii HCMV u matki z przebiegiem ciąży i stanem urodzeniowym noworodków.

Amplifikacja DNA HCMV metodą PCR

Wyizolowane DNA HCMV było następnie amplifikowane z wykorzystaniem łańcuchowej reakcji polimerazy (ang. *polymerase chain reaction* – PCR) w następujących wariantach: *nested-PCR* (nPCR) do amplifikacji fragmentu genu UL55 i genu UL144, *heminested-PCR* (hnPCR) do amplifikacji fragmentu genu US28. Zastosowano następujące profile reakcji: 94°C – 2 min, następnie 30 cykli termicznych wg schematu: 94°C – 30s, 55°C – 30s, 72°C – 30s; chłodzenie 4°C. Produkty amplifikacji poddawano elektroforezie w 1,2% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydy i wizualizowano w świetle UV za pomocą FluorChem 8800. Długość uzyskanych produktów amplifikacji porównywano z wzorcem wielkości mas 100-1500 pz DNA (Promega, Madison, USA) [9].

Oznaczanie liczby kopii DNA HCMV metodą PCR w czasie rzeczywistym

Do ilościowej oceny poziomu wirerii zastosowano metodę *real-time-PCR* umożliwiającą monitorowanie ilości produktu w każdym cyklu reakcji. Zastosowany zestaw starterów i sondy TaqMan wyznakowanej 6-karboksyfluoresceiną (FAM) na końcu 5' i 6-karboksytetrametylorodaminą (TAMRA) na końcu 3', umożliwiał amplifikację fragmentu genu UL55 wirusa o długości 150 pz [9-10]. Gen ten koduje glikoproteinę B osłonki HCMV. Reakcje RT-PCR przeprowadzono zgodnie z profilem termicznym: 10 min. w 95°C, 60 cykli: 95°C – 15s, 60°C – 1min. Badane materiały, kontrole pozytywne (standardowe rozcieńczenia plazmidu: 1, 5, 10, 100, 1000, i 10000 i 100000 kopii/5µl) oraz kontrole czystości (H₂O) badano w trzech powtórzeniach. Reakcje wykonywano w aparacie 7900HT Fast Real-Time PCR System lub ABI Prism™ 7000 (PE Applied Biosystems, Foster City, USA).

Izolacja DNA i oznaczanie liczby kopii DNA HCMV w materiałach klinicznych pochodzących od kobiet ciężarnych i noworodków wykonane zostało w Pracowni Wirusologii Molekularnej i Chemii Biologicznej Instytutu Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk w Łodzi.

Metody statystyczne

Zastosowano następujące metody statystyczne: test chi-kwadrat niezależności lub dokładny test Fishera (w zależności od liczebności oczekiwanych w komórkach tablicy kontyngencji) dla porównywania częstości albo rozkładów częstości, jednoczynnikową analizę wariancji z testami porównań wielokrotnych dla porównywania średnich w grupach, model regresji logistycznej dla określenia ryzyka względnego występowania wad płodów. Dla wszystkich stosowanych testów statystycznych przyjęto poziom istotności $p < 0,05$. Obliczenia wykonano w pakiecie SPSS ver. 14.0.

Wyniki**Charakterystyka grupy badanej**

Badaniem retrospektywnym objęte zostały kobiety ciężarne pomiędzy 17 a 42 rokiem życia. Średni wiek kobiet z serologicznymi cechami ostrej cytomegalii bez wirerii lub z nieoznaczoną wirerią (n=89) wynosił 27,3 (SD=5,7) lat, a kobiet z wirerią (n=28) – 28,3 (SD=5,4) lat. Różnica między porównywanymi średnimi nie była statystycznie istotna ($p=0,408$).

Ostre zakażenie HCMV w grupie badanych kobiet najczęściej stwierdzano w pierwiastek – 55,6% (n=65), u kobiet w ciąży drugiej przeciwiała HCMV wykryto u 23,9% (n=28) badanych, w ciąży trzeciej u 12,8% (n=15). Objawy zakażenia stwierdzane były najrzadziej u kobiet będących w czwartej i kolejnych ciążach 7,7% (n=9). W grupie kontrolnej (kobiety, u których nie wykryto obecności przeciwciał IgG, IgM lub/i IgA anty-HCMV) pierwiastki stanowiły 60,7% (n=31) przypadków, kobiety w ciąży drugiej 25,4% (n=13), w ciąży trzeciej 9,8% (n=5), wieloródki w czwartej i kolejnych ciążach odnotowano z częstością 3,9% (n=2). Analiza nie wykazała statystycznie istotnych różnic między obiema grupami ciężarnych.

Analiza występowania wirerii u kobiet ciężarnych i ich noworodków oraz ocena częstości wirerii u dziecka w zależności od występowania wirerii u matki

Wśród 117 kobiet z grupy badanej, poziom wirerii oznaczono u 89 ciężarnych. Wykazano, że była ona obecna u 28 zakażonych kobiet (31,5%), podczas gdy nie stwierdzono jej u 61 ciężarnych (68,5%). U 28 pacjentek nie było możliwości wykonania badań wirerii metodą RT-PCR. Najniższy oznaczony poziom wirerii wynosił $4,7 \times 10^2$ kopii DNA HCMV/ml, najwyższy natomiast $3,9 \times 10^6$ kopii DNA wirusa/ml. W grupie 29 noworodków obecność DNA HCMV stwierdzono u 27 dzieci, a u 17 z nich określono ilościowy poziom wirerii we krwi.

Najniższy zaobserwowany poziom wirerii u noworodków wynosił $4,8 \times 10^2$, najwyższy zaś $5,2 \times 10^6$ kopii DNA HCMV/ml. Jednoczesne występowanie wirerii u matki i dziecka zaobserwowano w 23 przypadkach. Natomiast obecność DNA wirusa we krwi stwierdzono także u 4 noworodków, u których matek wirerii nie była wykryta.

Średni poziom wirerii u matek w zależności od obecności wirerii u dzieci i trymestru ciąży

W grupie kobiet z serologicznymi cechami ostrej cytomegalii, średni poziom wirerii u matek dzieci, u których wykryto DNA HCMV wynosił $4,0 \times 10^4$ kopii DNA HCMV w 1 ml krwi (n=12). U matek dzieci bez wirerii, stwierdzono wyższy jej poziom – $9,5 \times 10^4$ kopii DNA HCMV/ml (n=6). (Tabela I).

W następnym etapie badań przeprowadzono analizę poziomu wirerii u matek w kolejnych trymestrach ciąży. Stwierdzono, że najwyższy poziom wirerii HCMV występował u ciężarnych w drugim trymestrze ciąży i wynosił $1,5 \times 10^5$ kopii DNA HCMV/ml krwi. (Tabela II).

Ocena średniego poziomu wirerii u dzieci w zależności od czasu stwierdzenia obecności DNA HCMV u ciężarnych

Kolejna analiza dotyczyła oceny poziomów wirerii u dzieci, w zależności od trymestru ciąży, w którym wykryto wirerię u ich matek. Najwyższy jej poziom występował w przypadkach wirerii u matki stwierdzonej w trzecim trymestrze ciąży ($4,8 \times 10^5$ kopii DNA HCMV/ml). Pomimo, że poziom wirerii wykryty w drugim trymestrze ciąży był średnio ponad siedmiokrotnie niższy ($6,6 \times 10^4$ kopii DNA HCMV/ml) w porównaniu z trzecim trymestrem to stwierdzona różnica nie była jednak istotna statystycznie ($p=0,937$). (Tabela III). Wydaje się zatem, że okres ciąży, w którym wykryto wirerię u matki nie wpływa w istotny sposób na poziom wirerii u noworodka.

Magdalena Rycel et al. Ocena związku poziomu wirerii HCMV u matek z przebiegiem ciąży i stanem urodzeniowym noworodków.

Tabela I. Średni poziom wirerii u matek w zależności od obecności DNA HCMV we krwi noworodków.

Wirermia u noworodków	Liczba kobiet	Wirermia u matki (liczba kopii DNA HCMV/ml)		p w teście porównania średnich
		średnia	odchylenie standardowe	
brak DNA HCMV	6	9,5 x 10 ⁴	227 370	0,486
obecne DNA HCMV	12	4,0 x 10 ⁴	107 824	

Tabela II. Średnie poziomy wirerii u matek w zależności od trymestru ciąży.

Trymestr ciąży	N	Wirermia u matki (średnia liczba kopii DNA HCMV/ml)	Odchylenie standardowe (scalenie)	95% przedział ufności dla średniej	
				dolna granica	górną granicą
I	2	7,7 x 10 ³	10196,480	83821,74	99401,74
II	4	1,5 x 10 ⁵	272236,956	280389,75	585989,75
III	10	4,3 x 10 ⁴	118746,453	41868,09	128024,09
ogółem	16	6,6 x 10 ⁴	161558,478	19990,94	152185,94

p=0,477

Tabela III. Ocena średniego poziomu wirerii u dzieci w zależności od trymestru, w którym stwierdzono obecność DNA HCMV u ciężarnych.

Trymestr ciąży	N	Wirermia u dziecka (średnia liczba kopii DNA HCMV/ml)	Odchylenie Standardowe	95% przedział ufności dla średniej	
				dolna granica	górną granicą
I	1	1,7 x 10 ⁵	–	–	–
II	7	6,6 x 10 ⁴	1641313,70	-848326,28	2187597,71
III	9	4,8 x 10 ⁵	1320580,30	-531098,99	1499076,77
ogółem	17	5,4 x 10 ⁵	1378351,15	-166721,00	1250644,53

p=0,937

Tabela IV. Ocena częstości występowania porodu przedwczesnego w grupie kobiet z ostrą cytomegaliją i kobiet seronegatywnych.

Badana grupa ciężarnych	Poród				p w teście porównania częstości
	przedwczesny		o czasie		
	N	%	N	%	
obecne IgM lub/i IgA anty-HCMV	37	52,1	34	47,9	0,668
brak IgG, IgM oraz IgA anty-HCMV	18	58,1	13	41,9	

Magdalena Rycel et al. Ocena związku poziomu wirerii HCMV u matki z przebiegiem ciąży i stanem urodzeniowym noworodków.

Tabela V. Ocena częstości występowania porodu przedwczesnego w grupie kobiet z ostrą cytomegalią w zależności od obecności DNA HCMV we krwi.

Grupa kobiet z IgM lub/i IgA anty-HCMV	Poród				p w teście porównania częstości
	przedwczesny		o czasie		
	N	%	N	%	
z wirerią	15	62,5	9	37,5	0,315
bez wirerii	22	46,8	25	53,2	

Tabela VI. Ocena stanu urodzeniowego noworodków urodzonych przez matki z ostrą cytomegalią i kobiety seronegatywne.

Grupa badana	N	Skala wg V. Apgar		p w teście porównania średnich
		średnia	odchylenie standardowe	
obecne IgM lub/i IgA anty-HCMV	71	6,45	3,16	0,024
brak IgG, IgM oraz IgA anty-HCMV	30	7,70	2,15	

Tabela VII. Ocena stanu urodzeniowego noworodków urodzonych przez matki z ostrą cytomegalią z wirerią i bez wirerii.

Wireria HCMV u matki	Liczba noworodków	Skala wg V. Apgar		p w teście porównania średnich
		średnia	odchylenie standardowe	
obecna	25	7,28	2,85	0,103
brak	46	6,00	3,25	

Ocena częstości występowania porodu przedwczesnego w zależności od występowania wirerii u ciężarnych

Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w częstości występowania porodu przedwczesnego u kobiet, u których występowały przeciwciała IgM i/lub IgA (n=37), a grupą ciężarnych seronegatywnych (n=18). (Tabela IV). Porównując grupę kobiet z ostrą cytomegalią, u których nie wykryto DNA HCMV, z grupą kobiet z potwierdzoną wirerią wykazano, że w pierwszej grupie poród przedwczesny miał miejsce w 46,8% (n=22) przypadków, w grupie drugiej natomiast w 62,5% (n=15) przypadków. (Tabela V). Uzyskana różnica nie była jednak istotna statystycznie (p=0,315).

Ocena stanu urodzeniowego noworodków

Na podstawie oceny stanu urodzeniowego noworodków, w oparciu o średnią punktację w skali Apgar w pierwszej minucie życia stwierdzono, że stan urodzeniowy noworodków kobiet zakażonych HCMV był istotnie gorszy (średnio 6,45 punktów w skali Apgar), niż dzieci kobiet z grupy kontrolnej (7,7 punktów). (Tabela VI).

Różnica w stanie urodzeniowym noworodków kobiet z cechami serologicznymi ostrej cytomegalii oraz kobiet niezakażonych była istotna statystycznie (p=0,024). Podobną analizę przeprowadzono w grupie kobiet, u których w trakcie ciąży wykryto DNA HCMV we krwi. W tej grupie badanych, średnia punktacja noworodków w skali Apgar w pierwszej minucie życia wynosiła 7,28 punktów. U noworodków kobiet, u których nie stwierdzono wirerii średnia punktacja Apgar wynosiła 6 punktów. (Tabela VII).

Dyskusja

Zakażenie HCMV u płodów i noworodków przyciąga uwagę klinicystów ze względu na częstość wywoływanych nieprawidłowości w okresie ciąży i wad wrodzonych u dzieci. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że około 10% noworodków pochodzących od matek z cechami ostrej cytomegalii prezentuje objawy kliniczne w okresie prenatalnym, noworodkowym lub wczesnego dzieciństwa.

Na szczególną uwagę zasługują zmiany takie jak: poszerzenie komór bocznych mózgu, wodogłowie, małogłowie czy opóźnie-

Magdalena Rycel et al. Ocena związku poziomu wirerii HCMV u matki z przebiegiem ciąży i stanem urodzeniowym noworodków.

nie wzrostu wewnątrzmacicznego [11]. W diagnostyce pourodzeniowej nie należy jednak zapominać o bardzo dużej grupie dzieci (85-90%), które mimo potwierzonego zakażenia wewnątrzmacicznego nie wykazują symptomów choroby tuż po porodzie. U około 80% z nich w pierwszych miesiącach i latach życia pojawiają się objawy kliniczne pod postacią opóźnienia rozwoju psychoruchowego, utraty słuchu bądź zaburzeń widzenia [12].

Ze względu na fakt, że badania serologiczne w ramach profilaktyki pierwotnej, pozwalają jedynie na wyodrębnienie grupy ciężarnych z ostrą cytomegalią oraz wysnucie wstępnych wniosków, co do prognozowania ryzyka zakażenia *in utero*, techniki diagnostyczne zostały poszerzone i wzbogacone o metody biologii molekularnej. Dostępne obecnie techniki pozwalają na genotypowanie HCMV, ocenę poziomu wirerii czyli określenie liczby kopii DNA wirusa we krwi i surowicy matki, płodu i noworodka, a także w płynie owodniowym, umożliwiając potwierdzenie zakażenia HCMV u płodów. Badanie płynu owodniowego i/lub krwi pępowinowej w celu oceny poziomu wirerii przy użyciu metody PCR w czasie rzeczywistym jest efektywną metodą umożliwiającą wykrycie DNA HCMV u płodów i noworodków. Stwierdzono, że określenie poziomu wirerii w płynie owodniowym pozwala na postawienie prenatalnej diagnozy o możliwym zakażeniu płodu z 72% czułością i 97% swoistością [13].

W prowadzonych przez nas badaniach występowanie wirerii zarówno u matki i dziecka stwierdzono w 23 przypadkach. Dodatkowo DNA HCMV wykryto u 4 noworodków, których matki nie wykazywały wirerii. Uzyskane wyniki pozwalają na sformułowanie wniosku, że obecność DNA HCMV we krwi matki zwiększa częstość wystąpienia wirerii u płodu, ale nie oznacza 100% transmisji wirusa do płodu. Podobnie, brak potwierdzenia wirerii u matki zmniejsza częstość wystąpienia wirusa we krwi płodu, jednakże nie wyklucza jednoznacznie możliwości jego wcześniejszego zakażenia. Należy podkreślić, że poziom wirerii zmienia się w czasie ciąży, a jedynie część ciężarnych była badana w tym kierunku wielokrotnie.

Chociaż w świetle dostępnego piśmiennictwa poziom wirerii u ciężarnych może być traktowany jako wskaźnik prognostyczny możliwości wystąpienia objawów u płodu i ich nasilenia, nadal jest on czynnikiem dyskusyjnym. Część autorów uważa, iż wysoka wirerii we krwi noworodka lub płynie owodniowym jest związana z podwyższonym ryzykiem wystąpienia nieprawidłowości [10, 14-16], podczas gdy inni nie potwierdzają takiego związku [9, 17]. W badaniach Romanelli i wsp. (2008), nie stwierdzono także zależności pomiędzy poziomem wirerii u matki, a obecnością powikłań u jej dziecka [18]. Jednak w badaniach przeprowadzonych przez Guerra i wsp., autorzy stwierdzili, że obecność powyżej 1000 kopii genu UL55 HCMV w 1 ml płynu owodniowego daje 100% pewność transmisji dopłodowej wirusa, natomiast wykrycie powyżej 100000 kopii/ml stanowi czynnik prognostyczny objawowej postaci zakażenia u płodu [19]. Podobnie, według Lanari i wsp., poziom wirerii we krwi był istotnie wyższy u noworodków z objawami cytomegalii wrodzonej w stosunku do noworodków bezobjawowych. Zaobserwowali oni, że u 70% noworodków stwierdzenie powyżej 10000 kopii DNA HCMV/ml krwi wiązało się z występowaniem powikłań, podczas gdy obecność poniżej 1000 kopii/ml pozwalała wykluczyć powikłania z 95% pewnością [8].

Nie można także wykluczyć wpływu na poziom wirerii także innych czynników, takich jak: czas pobrania próbki do

badania oraz czas, jaki upłynął od momentu zakażenia u matki [20]. Wynika to między innymi z faktu, iż pobranie próbki płynu owodniowego przed 22. tygodniem ciąży może dawać wyniki fałszywie ujemne. Ma to związek z efektywnością diurezy płodowej, która ulega zwiększeniu w 21. tygodniu życia płodowego. Podobnie, wyniki fałszywie ujemne można uzyskać, gdy do zakażenia u matki doszło niedawno, a DNA HCMV nie jest jeszcze wykrywalne w płynie owodniowym, ponieważ wirusy nie przekroczyły jeszcze bariery łożyskowej. Z tak wczesnymi zakażeniami mieliśmy najprawdopodobniej do czynienia w wykonanych przez nas badaniach. Stwierdziliśmy bowiem, że średni poziom wirerii u matek dzieci bez potwierdzonej wirerii DNA HCMV był ponad dwukrotnie wyższy ($9,5 \times 10^4$ kopii DNA HCMV/ml) niż u matek (4×10^4 kopii DNA HCMV/ml), u których dzieci potwierdzono wirerię. (Tabela I).

Dostępne piśmiennictwo wskazuje, że poziom wirerii w płynie owodniowym wzrasta wraz z upływem kolejnych tygodni ciąży od momentu zakażenia pierwotnego [20-21]. Autorzy sugerują, że związane jest to z kumulacją wirusa w płynie owodniowym.

Uzyskane w prezentowanej pracy wyniki, ze względu na brak analiz płynu owodniowego, jedynie częściowo potwierdzają tą tezę. W grupie badanych pacjentek, najniższą wirerię ($7,7 \times 10^3$ /ml kopii DNA HCMV/ml) obserwowaliśmy u ciężarnych w pierwszym trymestrze ciąży, wyższą w trzecim trymestrze ($4,3 \times 10^4$ /ml kopii DNA HCMV/ml), najwyższą natomiast w trymestrze drugim ($1,5 \times 10^5$ /ml kopii DNA HCMV/ml). (Tabela II). Wynik ten związany jest najprawdopodobniej z małą liczebnością badanych grup pacjentek. Nie można jednak wykluczyć, iż stosunkowo niski poziom wirerii w trzecim trymestrze ciąży związany jest z niedawnym zakażeniem u matki.

Wiek kobiet ciężarnych wymieniany jest jako jeden z czynników wpływających na ryzyko zakażenia HCMV [22-23]. W prezentowanej pracy nie stwierdzono jednak jego wpływu na obecność wirerii u zakażonych kobiet. Związku częstości występowania ostrych zakażeń HCMV poszukiwano również w odniesieniu do rodności badanych kobiet. Stwierdzono, iż wieloródki w mniejszym stopniu narażone są na ostre zakażenie HCMV w okresie ciąży, gdyż większość z nich przechodzi zakażenie w okresie przed lub po pierwszym porodzie. Taber i wsp. udowodnili, iż średnio około 53% seronegatywnych matek ulega zakażeniu w ciągu pierwszych dwóch lat życia swojego pierwszego dziecka [24]. Otrzymane przez nas wyniki potwierdzają tą obserwację. Serologiczne wykładniki ostrego zakażenia HCMV odnotowano najczęściej u pierwiastek (55,6%), prawie dwukrotnie rzadziej (23,9%) u kobiet w ciąży drugiej, z najmniejszą częstością zaś u kobiet w czwartej i kolejnych ciążach (7,7%).

W dostępnym piśmiennictwie nie znaleźliśmy informacji dotyczących wpływu zakażenia HCMV u matki, na czas trwania ciąży i stan urodzeniowy noworodka określany według skali Apgar. W oparciu o wyniki badań przedstawione w pracy, stwierdziliśmy krótszy czas trwania ciąży w grupie kobiet z serologicznymi cechami ostrej cytomegalii. Poród przedwczesny wśród kobiet z potwierdzoną wirerią miał miejsce w 62,5% przypadków, czyli częściej niż w grupie kobiet bez wirerii (46,8%). (Tabela V).

Różnice te nie były jednak istotne statystycznie, podobnie jak różnice między długością ciąży u kobiet z dodatnimi wynikami badań serologicznych, a ciężarnymi seronegatywnymi. (Tabela IV).

Magdalena Rycel et al. Ocena związku poziomu wirerii HCMV u matki z przebiegiem ciąży i stanem urodzeniowym noworodków.

Na podstawie danych klinicznych i przeprowadzonych analiz w prezentowanej pracy podjęto się także oceny związku pomiędzy możliwym zakażeniem *in utero*, a punktacją noworodka w pierwszej minucie po porodzie z wykorzystaniem skali Apgar. Analiza wykazała, że średnia punktacja wśród noworodków kobiet z serologicznymi wykładnikami ostrej cytomegalii była niższa w stosunku do dzieci kobiet zdrowych. (Tabela VI).

Potwierdza to opinię, iż dzieci kobiet zakażonych HCMV są obciążone większym ryzykiem powikłań. Analiza przeprowadzona w grupie kobiet, u których w trakcie ciąży wykryto DNA HCMV we krwi, wykazała, że średnia punktacja w skali Apgar w pierwszej minucie życia wynosiła 7,28 punktów. Natomiast u noworodków kobiet z serologicznymi objawami zakażenia, u których nie stwierdzono DNA HCMV we krwi, średnia punktacja Apgar wynosiła 6 punktów. (Tabela VII).

Uzyskane wyniki mogą wskazywać, że u kobiet z cechami ostrej cytomegalii stwierdzanej najczęściej w badanym materiale w trzecim trymestrze ciąży, w czasie badania nie wykryto już DNA HCMV we krwi matki, a do transmisji przezłożyskowej doszło we wcześniejszym etapie ciąży i rozwoju płodu. Konsekwencją tego może być gorszy stan urodzeniowy noworodków.

Wnioski

Pomimo, że bezpośrednia zależność pomiędzy poziomem wirerii u matki i dziecka a nasileniem objawów klinicznych zakażenia *in utero* wymaga dalszych badań, monitorowanie wirerii u płodów nabiera znaczenia w świetle prób terapii wewnątrzmacicznej lekami przeciwwirusowymi takimi jak walacyklowir czy gancyklowir. Uzyskane wyniki oraz dane literaturowe dotyczące wpływu poziomu wirerii na wystąpienie objawów klinicznych u płodów i noworodków, potwierdzają konieczność prowadzenia dalszych badań i poszukiwania nowych, doskonalszych metod diagnostycznych.

Oświadczenie autorów:

1. Magdalena Rycel – współautor tekstu pracy, zbieranie materiału, przygotowanie manuskryptu i piśmiennictwa.
2. Zuzanna Gaj – współautor tekstu, przygotowanie manuskryptu i piśmiennictwa, korekta i aktualizacja literatury.
3. Jan Wilczyński – organizacja zespołu badawczego i koordynacja badań, uzyskanie funduszy na realizację badań laboratoryjnych, korekta i akceptacja ostatecznego kształtu manuskryptu.
4. Edyta Paradowska – współautor protokołu, opracowanie/optimalizacja metod wykrywania DNA CMV, uzyskanie funduszy na realizację badań wirusologicznych, analiza i interpretacja wyników, wykonanie badań wirusologicznych, korekta i akceptacja ostatecznego kształtu manuskryptu.
5. Mirosława Studzińska – opracowanie/optimalizacja metod wykrywania DNA CMV, wykonanie badań wirusologicznych, opracowanie wyników badań, korekta i akceptacja ostatecznego kształtu manuskryptu.
6. Patrycja Suski – wykonanie badań wirusologicznych, korekta i akceptacja ostatecznego kształtu manuskryptu.
7. Dorota Nowakowska – autor koncepcji i założeń pracy, uzyskanie funduszy na realizację badań laboratoryjnych, ostateczna weryfikacja i akceptacja manuskryptu – autor zgłaszający i odpowiedzialny za manuskrypt.

Źródło finansowania:

Wyniki badań prezentowane w pracy były częściowo finansowane dzięki wsparciu udzielonemu przez Islandię, Liechtenstein i Norwegię ze środków Mechanizmu Finansowego Europejskiego Obszaru Gospodarczego oraz częściowo ze środków budżetu państwa na naukę. Projekt PL0270 pt.: „Zakażenia prenatalne i perinatalne ludzkim wirusem cytomegalii”.

Konflikt interesów:

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów oraz nie otrzymali żadnego wynagrodzenia związanego z powstawaniem pracy.

Piśmiennictwo

1. Humar A, Asberg A, Kumar D, [et al.]. An assessment of herpesvirus co-infections in patients with CMV disease: correlation with clinical and virologic outcomes. *Am J Transplant.* 2009, 9, 374-381.
2. Murph JR, Souza IE, Dawson JD, [et al.]. Epidemiology of congenital cytomegalovirus infection: maternal risk factors and molecular analysis of cytomegalovirus strains. *Am J Epidemiol.* 1998, 147 (10), 940-947.
3. Pawłowska M, Halota W. Zakażenia CMV. *Przeegl Epidemiol.* 2004, 58, Supl.1, 17-21.
4. Gaj Z, Rycel M, Wilczyński J, Nowakowska D. Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the population of Polish pregnant women. *Ginekol Pol.* 2012, 83, 337-341.
5. Bodús M, Kabamba-Mukadi B, Zech F, [et al.]. Human cytomegalovirus in utero transmission: follow-up of 524 maternal seroconversions. *J Clin Virol.* 2010, 47 (2), 201-202.
6. Kenneson A, Cannon MJ. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev Med Virol.* 2007, 17 (4), 253-276.
7. Arav-Boger R, Battaglia CA, Lazzarotto T, [et al.]. Cytomegalovirus (CMV)-encoded UL144 (truncated tumor necrosis factor receptor) and outcome of congenital CMV infection. *J Infect Dis.* 2006, 194, 464-473.
8. Lanari M, Lazzarotto T, Venturi V, [et al.]. Neonatal cytomegalovirus blood load and risk of sequelae in symptomatic and asymptomatic congenitally infected newborns. *Pediatrics.* 2006, 117 (1), 76-83.
9. Paradowska E, Studzińska M, Nowakowska D, [et al.]. Distribution of UL144, US28 and UL55 genotypes in Polish newborns with congenital cytomegalovirus infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2011, 31 (7), 1335-1345.
10. Paradowska E, Przepiórkiewicz M, Nowakowska D, [et al.]. Detection of cytomegalovirus in human placental cells by polymerase chain reaction. *APMIS.* 2006, 114 (11), 764-771.
11. Cheeran MC, Lokensgard JR, Schleiss MR. Neuropathogenesis of congenital cytomegalovirus infection: disease mechanisms and prospects for intervention. *Clin Microbiol Rev.* 2009, 22 (1), 99-126.
12. Britt W. Cytomegalovirus. Infectious diseases of the fetus and newborn infant. Ed. Remington JS, Klein J, Wilson CB, [et al.]. Elsevier Saunders: Philadelphia. 2011, 706-755.
13. Gouarin S, Palmer P, Cointe D, [et al.]. Congenital HCMV infection: a collaborative and comparative study of virus detection in amniotic fluid by culture and by PCR. *J Clin Virol.* 2001, 21 (1), 47-55.
14. Gouarin S, Gault E, Vabret A, [et al.]. Real-time PCR quantification of human cytomegalovirus DNA in amniotic fluid samples from mothers with primary infection. *J Clin Microbiol.* 2002, 40 (5), 1767-1772.
15. Lazaretto T, Varani S, Guerra B, [et al.]. Prenatal indicators of congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr.* 2000, 137 (1), 90-95.
16. Lazzarotto T, Gabrielli L, Foschini MP, [et al.]. Congenital cytomegalovirus infection in twin pregnancies: viral load in the amniotic fluid and pregnancy outcome. *Pediatrics.* 2003, 112 (2), Supl 3, 581-587.
17. Halwachs-Baumann G, Genser B, Pailer S, [et al.]. Human cytomegalovirus load in various body fluids of congenitally infected newborns. *J Clin Virol.* 2002, 25, 81-87.
18. Romanelli RM, Magny JF, Jacquemard F. Prognostic markers of symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Braz J Infect Dis.* 2008, 12 (1), 38-43.
19. Guerra B, Lazzarotto T, Quarta S, [et al.]. Prenatal diagnosis of symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Am J Obstet Gynecol.* 2000, 183 (2), 476-482.
20. Gouarin S, Gault E, Vabret A, [et al.]. Real-time PCR quantification of human cytomegalovirus DNA in amniotic fluid samples from mothers with primary infection. *J Clin Microbiol.* 2002, 40 (5), 1767-1772.
21. Picone O, Costa JM, Chaix ML, [et al.]. Comments on: "Cytomegalovirus (CMV)-encoded UL144 (truncated tumor necrosis factor receptor) and outcome of congenital CMV infection". *J Infect Dis.* 2007, 196 (1), 1719-1720.
22. Mustakangas P, Sarna S, Ammälä P, [et al.]. Human cytomegalovirus seroprevalence in three socioeconomically different Urban areas during the first trimester: a population-based cohort study. *Int J Epidemiol.* 2000, 29 (3), 587-591.
23. Ludwig A, Hengel H. Epidemiological impact and disease burden of congenital cytomegalovirus infection in Europe. *Euro Surveill.* 2009, 14 (9), 26-32.
24. Taber LH, Frank AL, Yow MD, Bagley A. Acquisition of cytomegalovirus infections in families with young children: a serological study. *J Infect Dis.* 1985, 151 (5), 948-952.