

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии

Научно-исследовательский институт антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России

#### Учредитель

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии

#### Издатель

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии  
[www.iacmac.ru](http://www.iacmac.ru)

Журнал зарегистрирован Комитетом РФ по печати 30.09.1999 г. (№019273) Тираж 3000 экз.

Подписка на сайте издателя  
<https://service.iacmac.ru>

Адрес для корреспонденции  
214019, г. Смоленск, а/я 5.  
Тел./факс: (4812)45 06 02

Электронная почта:  
[cmac@antibiotic.ru](mailto:cmac@antibiotic.ru)

Электронная версия журнала:  
<https://cmac-journal.ru>

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук

Присланные в редакцию статьи проходят рецензирование

Мнение редакции может не совпадать с точкой зрения авторов публикуемых материалов

Ответственность за достоверность рекламных публикаций несут рекламодатели

При перепечатке ссылка на журнал обязательна

© Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2021.

## Содержание

### Болезни и возбудители

- Баранцевич Н.Е., Леванова В.В., Баранцевич Е.П.  
**117** Региональные особенности распространения *Candida auris*
- Козлов Р.С., Муравьев А.А., Чагарян А.Н., Иванчик Н.В., Куркова А.А., Кузьменков А.Ю., Трушин И.В., Сухорукова М.В. и исследовательская группа «SPECTRUM»  
**127** Эпидемиология и антибиотикорезистентность серотипов *S. pneumoniae*, циркулирующих во взрослой популяции на территории Российской Федерации (исследование «SPECTRUM»)
- Демин М.В., Тихомиров Д.С., Бидерман Б.В., Глинщикова О.А., Дроков М.Ю., Судариков А.Б., Туполева Т.А., Паровичникова Е.Н., Филатов Ф.П.  
**138** Цитомегаловирус после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток: реактивация или реинфекция новым штаммом?
- Гавриленко Д.И., Силивончик Н.Н.  
**147** Транслокация кишечной микрофлоры при циррозе печени: механизм, клиническое значение, маркеры
- 161** Резолюция по итогам совещания экспертов Российской Федерации по вопросам вакцинопрофилактики пневмококковых инфекций у взрослых

### Антимикробные препараты

- Петровская Т.А., Тапальский Д.В.  
**166** Влияние антибиотиков разных групп на возникновение мутационной устойчивости к колистину у *Klebsiella pneumoniae*
- Стецюк О.У., Андреева И.В., Лекманов А.У., Хайкина Е.В.  
**173** Цефтазидим-авибактам в педиатрии – «портрет» пациента: кому и когда?
- Зигангирова Н.А., Лубенец Н.Л., Зайцев А.В., Пушкарь Д.Ю.  
**184** Антибактериальные препараты, снижающие риск развития резистентности
- 195** Резолюция совета экспертов по вопросу использования тиамфеникола глицинат ацетилцистеината в лечении внебольничных респираторных инфекций

### Антибиотикорезистентность

- Кузьменков А.Ю., Виноградова А.Г., Трушин И.В., Эйдельштейн М.В., Авраменко А.А., Дехнич А.В., Козлов Р.С.  
**198** AMRmap – система мониторинга антибиотикорезистентности в России

### Опыт работы

- Ваганова А.Н., Борисенко С.В., Нестерова Е.В., Трофимова Н.Н., Литвиненко И.В., Петунова Я.Г., Рока В.В., Вербов В.Н.  
**205** Инокулюм-эффект к цефазолину среди чувствительных к метициллину изолятов *Staphylococcus aureus*, выделенных от пациентов с заболеваниями кожи
- Швыдкая М.Г., Затевалов А.М., Митрохин С.Д., Джандарова Д.Т.  
**212** Сравнительная характеристика методов культивирования штаммов *Clostridioides difficile* и другой анаэробной флоры из образцов кала в рутинной практике бактериологической лаборатории

## Цитомегаловирус после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток: реактивация или реинфекция новым штаммом?

Демин М.В.<sup>1</sup>, Тихомиров Д.С.<sup>1</sup>, Бидерман Б.В.<sup>1</sup>, Глинщикова О.А.<sup>1</sup>, Дроков М.Ю.<sup>1</sup>, Судариков А.Б.<sup>1</sup>, Туполева Т.А.<sup>1</sup>, Паровичникова Е.Н.<sup>1</sup>, Филатов Ф.П.<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России, Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия

<sup>3</sup> ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

Контактный адрес:

Михаил Валерьевич Демин  
Эл. почта: memindisha@gmail.com

Ключевые слова: цитомегаловирус человека, аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, реактивация, реинфекция.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Внешнее финансирование: исследование проведено без внешнего финансирования.

**Цель.** Определить тип цитомегаловирусной инфекции (реактивация эндогенного штамма, регистрируемого до трансплантации и вносящего основной вклад в инфекцию, или реинфекция другим штаммом) у реципиентов аллогенных гемопоэтических стволовых клеток методом секвенирования.

**Материалы и методы.** В исследование были включены 190 реципиентов аллогенных гемопоэтических стволовых клеток за 2014–2018 гг. Оценивали наличие ДНК цитомегаловируса (ЦМВ) в клиническом материале до и после трансплантации. При наличии ДНК ЦМВ в образцах до и после трансплантации проводили амплификацию методом nested ПЦР. Для 14 пациентов были успешно амплифицированы пары образцов (до и после трансплантации; всего 28 образцов). Для генотипирования вируса был выбран ген UL139, предположительно кодирующий гликопротеин. Для получения нуклеотидной последовательности, соответствующей консервативному участку этого гена, был использован метод nested ПЦР. Секвенирование полученного участка проводили по методу Сэнгера. Полученную последовательность ДНК анализировали с помощью программного обеспечения nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) и Genome compiler (<https://designer.genomcompiler.com>). Тип инфекции у пациента определяли путем сравнения нуклеотидных последовательностей участка вирусного гена до и после трансплантации. Для поиска возможного источника другого вирусного штамма у пациента был оценен объем трансфузионной терапии компонентами донорской крови; кроме того, анализировали доступные клинические данные пациентов, чтобы найти возможную корреляцию между типом реинфекции и состоянием пациента.

**Результаты.** У 8 из 14 пациентов наблюдался высокий процент совпадения последовательностей консервативного участка гена UL139 (~100%) до и после трансплантации, что было расценено как реактивация эндогенного штамма вируса. У 6 из 14 пациентов зафиксированы расхождения в последовательности вирусной ДНК, позволяющие говорить о различии штаммов, что может свидетельствовать о реинфекции другим экзогенным (или эндогенным) штаммом. Статистически значимого различия в сроках детекции вирусной ДНК после трансплантации у пациентов с предполагаемой реинфекцией (медиана – 70 дней) и реактивацией (медиана – 27 дней) получено не было ( $p > 0,05$ ).

**Выводы.** Реактивация штамма ЦМВ, который вносил основной вклад в вирусную нагрузку до трансплантации, или смена штамма после трансплантации носят практически равновероятностный характер (8 против 6). Также не было установлено связи между основным диагнозом и типом инфекции (реактивация/реинфекция), возможно, в связи с малым размером изучаемой выборки. Связи между трансфузионной нагрузкой и типом ЦМВ-инфекции (реактивация/реинфекция) обнаружено не было, что, скорее всего, свидетельствует о том, что источником реинфекции не является донорская кровь. Также не было обнаружено связи между типом ЦМВ-инфекции и ранними результатами трансплантации.

Original Article

## Cytomegalovirus after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: reactivation or re-infection?

Demin M.V.<sup>1</sup>, Tikhomirov D.C.<sup>1</sup>, Biderman B.V.<sup>1</sup>, Glinschikova O.A.<sup>1</sup>, Drovkov M.Yu.<sup>1</sup>, Sudarikov A.B.<sup>1</sup>, Tupoleva T.A.<sup>1</sup>, Parovitchnikova E.N.<sup>1</sup>, Filatov F.P.<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> National Medical Research Center of Hematology, Moscow, Russia

<sup>2</sup> N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

<sup>3</sup> I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Демин М.В. и соавт.

Contacts:  
Mikhail V. Demin  
E-mail: memindisha@gmail.com

Key words: human cytomegalovirus, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, reactivation, re-infection.

Conflicts of interest: all authors report no conflicts of interest relevant to this article.

External funding source: no external funding received.

**Objective.** To determine type of cytomegalovirus (CMV) infection (reactivation of a virus strain that was present before transplantation or re-infection with another virus strain) in allogeneic hematopoietic stem cell recipients by sequencing.

**Materials and methods.** Clinical and laboratory data of 179 recipients of allogeneic hematopoietic stem cells collected from 2014 to 2018 were analyzed for CMV DNA in clinical specimens before and after transplantation. A total of 14 patients (28 samples) were included in the study. The CMV UL139 gene encoding viral glycoprotein was chosen for virus genotyping and sequence alignment. The primers complementary to its conservative sites were used. The resulting DNA sequence was analyzed using nucleotide BLAST software (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and Genome compiler (<https://designer.genomecompiler.com>). The type of infection was determined by comparing DNA sequences before and after transplantation.

**Results.** All enrolled patients were anti-CMV-positive prior to transplantation, which indicates the presence of CMV infection. Therefore, none of the patients had a primary infection as a result of transplantation. Of 14 patients, high percentage of sequence alignment (~100%) was observed in 8 patients. For the other 6 patients, substantial differences in sequences which indicate the different genotypes and the different type of infection were found. However, there was no statistically significant difference in the time to viral DNA appearance after transplantation in patients with re-infection and reactivation ( $p > 0.05$ ), nor was there a statistically significant correlation between the type of infection (reactivation/re-infection) and the main diagnosis or transfusion load.

**Conclusions.** Reactivation of the previously registered viral strain and re-infection with another viral strain were equally probable (8 vs. 6 cases). There were no associations between the main diagnosis and the type of infection (reactivation/re-infection) possibly due to a small sample size. Time to post-transplantation CMV DNA detection in blood was longer for re-infection (median of 69.5 days) compared to reactivation (median of 27 days), but this difference was also non-statistically significant. In addition, there was no significant contribution of blood transfusion burden to the type of CMV infection, which may suggest the donor blood is not a source of the different strains.

## Введение

Развитие оппортунистических инфекций является частым осложнением у реципиентов аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ГСК) в посттрансплантационном периоде. Вторичный иммунодефицит у этих пациентов обусловлен множеством факторов, среди которых применение массивной иммуносупрессивной терапии, медленное восстановление Т- и В-клеточных звеньев иммунной системы, развитие реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) и ее терапия.

Цитомегаловирус (ЦМВ) может вызывать у реципиентов алло-ГСК тяжелые трудно купируемые инфекционные осложнения, представляющие угрозу для жизни больного. Особенностью ЦМВ, как и других герпесвирусов, является пожизненная персистенция в организме после первичной инфекции (как правило, в раннем возрасте). Подавляющее большинство людей являются носителями ЦМВ в латентном состоянии. Следовательно, развитие инфекции у серопозитивных реципиентов после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) может быть результатом реактивации эндогенного вируса или реинфекции другим вирусным штаммом, попавшим в организм извне. Определить тип инфекции (реактивация штамма, выявленного до трансплантации, или смена одного штамма другим) можно, сравнив штамм вируса до и после алло-ТГСК. Неизвестно, отличается ли в первом и втором случае характер течения инфекции, оказывает ли влияние на исход инфекционного эпизода и/или на ранние результаты трансплантации.

Для генотипирования ЦМВ и определения штаммовой принадлежности используются различные методы, наиболее распространенными из которых являются определение последовательности вирусной ДНК по Сэнгеру [1], определение полиморфизма длин рестрикционных фрагментов продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР) [2] и ПЦР с праймерами, комплементарными к определенным генотипам вируса [3]. В последнее время разработаны методы генотипирования по гликопротеинам вируса gB и gN, основанные на использовании ПЦР в реальном времени, которые помогают идентифицировать наличие сразу нескольких вирусных штаммов. Кроме того, был описан метод сверхглубокого пиросеквенирования для генотипирования трех наиболее вариабельных вирусных генов (gN, gO, UL139) [4].

Для ЦМВ характерно одновременное существование в организме сразу нескольких вирусных штаммов или генотипов, которые могут локализоваться в разных органах и тканях (компартаментах), что, в свою очередь, оказывает влияние на вирусную нагрузку и определение вируса в том или ином материале. При обследовании пациентов после трансплантации солидных органов была найдена положительная корреляция между наличием нескольких генотипов вируса и вирусной нагрузкой [5–7]. Согласно данным литературы, противовирусная терапия была менее эффективна у пациентов после алло-ТГСК, у которых выявлено более одного генотипа [7]. Таким образом, основной вклад в вирусную нагрузку вносит мажорный штамм. Это означает, что смена ос-

новного генотипа вируса в результате алло-ТГСК может быть вызвана как экзогенной реинфекцией, так и смешанной основной (мажорного) штамма внутри одного пациента.

Генотипирование ЦМВ можно проводить по различным генам. Одним из наиболее вариабельных генов, и, следовательно, наиболее предпочтительным для исследования является UL139. Данный ген предположительно кодирует гликопротеин первого типа. Как и в случае с другими гипервариабельными генами, разнообразие наблюдается в основном на 5' конце гена, который кодирует эктодомен [8].

Генотипирование ЦМВ по гену UL139 было описано ранее [1, 8]. Выделены 8 генотипов, которые сопоставляли с лабораторными штаммами (Таблица 1).

Генотипирование вируса и сравнение нуклеотидных последовательностей может быть использовано для определения типа инфекции (реактивация/реинфекция) у реципиентов алло-ТГСК.

**Цель** данного исследования – определить тип ЦМВ-инфекции (реактивация мажорного штамма вируса, регистрируемого до трансплантации, или реинфекция другим штаммом) у реципиентов алло-ГСК.

## Материалы и методы

В исследование были включены 190 реципиентов алло-ГСК в 2014–2018 гг. в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России. Оценивали наличие ДНК ЦМВ до и после алло-ТГСК в клиническом материале пациентов. В исследование включали образцы ДНК, выделенной из периферической крови больных до и после трансплантации (34 пациента), в которых была обнаружена

вирусная ДНК (68 образцов). Из включенных пациентов, у которых ДНК ЦМВ в материале регистрировалась до и после алло-ТГСК, успешно амплифицированы и секвенированы 28 образцов от 14 пациентов (мужчины – 7, женщины – 7), медиана возраста – 39,5 лет. Невозможность амплифицировать ДНК ЦМВ из оставшихся образцов, вероятно, связана с низкой концентрацией ДНК (< 500 копий геном-эквивалент/10<sup>5</sup> ядросодержащих клеток) в образцах.

В 2014–2018 гг. в клиниках Центра наблюдались 48 реципиентов алло-ГСК, у которых ДНК ЦМВ была выявлена в материале до трансплантации, 142 – после и 34 – как до, так и после.

Для генотипирования вируса был выбран ген UL139 [1]. Для получения нуклеотидной последовательности, соответствующей консервативному участку этого гена, были использованы праймеры, представленные в Таблице 2.

В результате первого раунда nested ПЦР с праймерами АВ1 и АВ2 получали продукт длиной 800 п.о., в результате второго раунда с использованием праймеров UL140-3А и UL140-11А – продукт длиной 500 п.о., который в дальнейшем секвенировали по методу Сэнгера.

### Первый раунд ПЦР

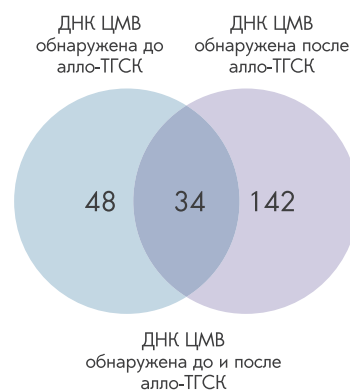
Состав реакционной смеси на одну реакцию: деионизированная вода – 27 мкл, 10× буфер для ПЦР («Синтол», Россия) – 5 мкл, смесь нуклеотидов dNTP («Синтол», Россия) – 5 мкл, раствор MgCl<sub>2</sub> («Синтол», Россия) – 5 мкл, праймеры АВ1 и АВ2 (10 мкМ) – по 1 мкл, полимеразы SynTaq («Синтол», Россия) – 1 мкл, образец ДНК, выделенной из клинического материала, – 5 мкл. Амплификацию проводили по следующей про-

**Таблица 1.** Лабораторные штаммы, соответствующие генотипам UL139

Генотип UL139	Лабораторный штамм
G1	Merlin
G2	JP
G3	NT
G4	Toledo
G5	Towne
G6	3157
G7	W
G8	–

**Таблица 2.** Праймеры, использованные для ПЦР и секвенирования

Ген	Праймер	Последовательность (5'-3')	Положение
UL139	AB1	GTCATTGTGAAAGTGACGTCTCAG	186389–186412
UL139	AB2	ATCTACTGTAACCCTCTGCTCTG	187148–187125
UL139	UL140-3A	GCGGCATTGGTGTACGCGTG	187058–187078
UL139	UL140-11A	GTGGAAATTTTACGTCATT	186572–186553



**Рисунок 1.** Отбор образцов для секвенирования участка ДНК ЦМВ

грамме: предварительный нагрев крышки прибора для амплификации («горячий старт» ПЦР), 2 мин. изначального плавления при 95°C; после этого 35 циклов по программе: 95°C 2 мин., 60°C 30 секунд, 68°C 1 мин.

#### Второй раунд ПЦР

Состав реакционной смеси на одну реакцию: стерильная деионизированная вода – 31 мкл, 10× буфер для ПЦР («Синтол», Россия) – 5 мкл, dNTP – 5 мкл, MgCl<sub>2</sub> – 5 мкл, праймеры UL140-3A и UL140-11A (10 мкМ) – 1 мкл, Taq-полимераза Синтол – 1 мкл, образец продукта первого раунда ПЦР – 1 мкл. Программа амплификации была аналогична таковой в первом раунде.

Для секвенирования гена UL139 использовали праймеры UL140-3A и UL140-11A. Полученную последовательность ДНК анализировали с помощью программного обеспечения nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) и Genome compiler (<https://designer.genomcompiler.com>). В случае совпадения нуклеотидной последовательности на ~100% считали, что наблюдаем реактивацию, при отличии более чем на 5% считали, что наблюдаем реинфекцию.

### Результаты

Характеристика пациентов, включенных в исследование по секвенированию, и результаты определения генотипа представлены в Таблице 3.

У 8 пациентов зафиксировано совпадение последовательностей участка вирусной ДНК почти на 100% до и после алло-ТГСК, что может быть расценено как реактивация эндогенного штамма вируса. У 6 зафиксированы различия, позволяющие говорить о смене генотипа (штамма).

Было оценено время появления ДНК ЦМВ в крови у реципиентов алло-ТГСК в зависимости от типа инфекции (см. Таблица 4).

У пациентов со сменой штамма время появления вирусной ДНК в крови варьировало от 28 до 177 дней (медиана – 70 дней), у пациентов с реактивацией эндогенного вируса – от 2 до 150 (медиана – 27 дней). Несмотря на существенное различие медиан, оно оказалось статистически незначимым ( $p > 0,05$ ).

В ходе исследования была выдвинута гипотеза, согласно которой смена штамма вируса во время трансплантации может произойти в результате инфицирования компонентами донорской крови, которые реципиенты получают в достаточно большом объеме в посттрансплантационном периоде на фоне цитопении и приживления трансплантата. Поскольку компоненты не проверяются на какие-либо маркеры ЦМВ, то оценить вероятность передачи вируса достаточно сложно. Одним из критериев оценки может быть более высокая трансфузионная нагрузка у пациентов со сменой штамма. Для проверки этой гипотезы было проанализировано количество трансфузий компонентов, прове-

**Таблица 3.** Характеристика пациентов, образцы которых были использованы в исследовании гена UL139, результаты выравнивания последовательностей и определения типа инфекции

Пациент	Пол	Возраст	Диагноз	Время до детекции ДНК ЦМВ после алло-ТГСК, дней	Генотип ЦМВ до алло-ТГСК	Генотип ЦМВ после алло-ТГСК	Перекрытие последовательностей вирусной ДНК	Тип инфекции
ГС	М	43	ОЛЛ	28	1	2	88%	Реинфекция
МХ	Ж	27	ОЛЛ	177	5	5	88%	Реинфекция
ТГ	М	48	ОЛЛ	105	5	2	80%	Реинфекция
УИ	М	29	ОЛЛ	117	5	2	79%	Реинфекция
МЛ	М	54	ОМЛ	18	ND	4	84%	Реинфекция
ЧР	Ж	25	ОМЛ	34	2	ND	94%	Реинфекция
СР	Ж	29	ОМЛ	29	2	2	99%	Реактивация
СТ	Ж	42	ОМЛ	27	2	2	98%	Реактивация
БР	М	24	ОМЛ	20	2	2	99%	Реактивация
ЛЖ	Ж	43	ОМЛ	27	2	2	99%	Реактивация
ДК	М	56	ММ	34	2	2	99%	Реактивация
БС	Ж	57	ОЛЛ	34	4	4	99%	Реактивация
ТЛ	М	40	ОЛЛ	20	1	1	99%	Реактивация
РБ	Ж	39	ОМЛ	2	1	1	99%	Реактивация

ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз; ОМЛ – острый миелоидный лейкоз; ММ – множественная миелома; ТГСК – трансплантация гемопоэтических стволовых клеток.

денных пациентам в период от ТГСК до появления ДНК ЦМВ в крови (см. Таблица 5).

Потребность в заместительных трансфузиях компонентов донорской крови сильно варьировала как по количеству, так и по типу трансфузионных сред у пациентов со сменой вирусного штамма – от 3 до 69 (медиана – 11 трансфузий). У пациентов с реактивацией медиана количества трансфузий составила 4. При анализе данных статистически значимых различий в количестве трансфузий также получено не было.

Также в ходе исследования была выдвинута гипотеза, что смена штамма вируса может влиять на ранние результаты трансплантации, такие как приживление трансплантата, отсроченное восстановление кроветворной функции трансплантата, развитие РТПХ и летальность в первый год после трансплантации. Однако анализ клинических данных по указанным выше критериям, представленный в Таблице 6, не показал статистически значимых различий в изучаемых группах пациентов.

Все пациенты, включенные в исследование, находились в пределах одного отделения, что позволило предположить в качестве источника нового штамма (в случае его смены после ТГСК) внутрибольничное инфицирование. Однако сравнение между собой последовательностей, полученных у разных пациентов, исключило такую вероятность из-за полного несовпадения последовательностей.

## Обсуждение

Полученные результаты показывают, что появление у серопозитивного реципиента алло-ГСК в крови маркеров активной ЦМВ инфекции, а именно вирусной ДНК, может быть результатом как реактивации эндогенного мажорного штамма, вносящего основной вклад в вирусную нагрузку до трансплантации, так и смены одного штамма другим. Выявление одного и того же генотипа ЦМВ и почти полное совпадение нуклеотидных последовательностей варибельного гена при выравнивании ДНК ЦМВ, полученной до и после трансплантации, указывает именно на реактивацию. Тем не менее всегда существует вероятность экзогенной реинфекции другим штаммом, но того же генотипа. Выравнивание нуклеотидных последовательностей позволяет выявить различие штаммов вируса (при совпадении нуклеотидных последовательностей < 95%) даже при совпадении генотипов (что наблюдалось в случае с пациентом МХ из представленной выборки). Также следует иметь в виду, что в одном организме, как правило, одновременно присутствует несколько генотипов вируса, один из которых вносит основной вклад в вирусную нагрузку. Смена генотипа может являться как результатом замещения одного эндогенного штамма другим эндогенным штаммом, так и попадания в организм в ходе проведения трансплантации нового вирусного штамма извне (реинфекция). В первом случае технически, несмотря на смену генотипа, ситуация может быть расценена как реактивация эндогенного вируса, в то время как второй сценарий является истинной экзогенной реинфекцией.

**Таблица 4.** Время появления ДНК ЦМВ в крови пациентов после ТГСК в зависимости от типа инфекции

№	Пациент	Тип инфекции	Время появления ДНК ЦМВ после трансплантации, дней	Медиана, дней	
1	ГС	Смена штамма (реинфекция)	28	70	t-критерий Стьюдента = 1,24 Различия незначимы (p = 0,241)
2	МХ		177		
3	ТГ		105		
4	УИ		117		
5	МЛ		18		
6	ЧР		34		
7	СР	Реактивация эндогенного штамма	20	27	
8	СТ		29		
9	БР		27		
10	ЛЖ		27		
11	ДК		150		
12	БС		34		
13	ТЛ		20		
14	РБ		2		

**Таблица 5.** Данные о трансфузионной нагрузке у пациентов после регистрации ДНК ЦМВ в крови до трансплантации и первичной регистрации ДНК вируса в крови после трансплантации

№	Пациент	Тип инфекции	Количество трансфузий компонентов донорской крови после ТГСК до момента выявления ДНК ЦМВ				Медиана
			ТК	Эр	Плазма	ВСЕГО	
1	ГС	Реинфекция	4	0	0	4	11
2	МХ		3	0	0	3	
3	ТГ		39	24	6	69	
4	УИ		3	7	8	18	
5	МЛ		4	0	0	4	
6	ЧР		24	15	28	67	
7	СР	Реактивация	3	1	0	4	4
8	СТ		4	1	0	5	
9	БР		2	0	0	2	
10	ЛЖ		4	0	0	4	
11	ДК		7	0	0	7	
12	БС		3	0	0	3	
13	ТЛ		3	2	0	5	
14	РБ		0	0	0	0	

ТК – концентрат донорских тромбоцитов; Эр – эритроцит-содержащие трансфузионные среды.

**Таблица 6.** Данные о приживлении трансплантата, наличии и типе РТПХ и летальности среди пациентов, включенных в исследование

№	Пациент	Тип инфекции	Приживление трансплантата (да/нет)	Отложенное восстановление показателей крови после трансплантации (да/нет)	Наличие РТПХ	Тип РТПХ (острая/хроническая)	Летальность в первый год после трансплантации (да/нет)
1	ГС	Реинфекция	Да	Нет, + 19 день	Да	острая	Да
2	МХ		Да	–	Да	острая, хроническая	Нет, жива
3	ТГ		Да	Да, + 29 день	Нет	–	Да
4	УИ		Да	Нет, + 19 день	Да	острая, хроническая	Нет, на 3-й год
5	МЛ		Да	Нет, + 17 день	Да	острая	Нет, жив
6	ЧР		Да	Да, + 41 день	Нет	–	Да
7	СР	Реактивация	Да	Нет, + 18 день	Да	острая	Да
8	СТ		Да	Нет, + 25 день	Нет	–	Нет, жива
9	БР		Да	Нет, + 14 день	Нет	–	Да
10	ЛЖ		Да	Нет, + 25 день	Да	хроническая	Нет, жива
11	ДК		Да	Нет, + 3 день	Да	хроническая	Нет, жив
12	БС		Да	Нет, + 11 день	Да	острая, хроническая	Нет, жива
13	ТЛ		Да	Да, + 29 день	Да	острая, хроническая	Нет, жив
14	РБ		Нет	Нет, + 13 день	Нет	–	Нет, жива

Выбранный метод секвенирования (по Сэнгеру) имеет ряд технических ограничений, что не позволяет выявить наличие генотипов, вклад которых в вирусную нагрузку составляет менее 10%. Для того чтобы провести однозначное различие между реинфекцией и реактивацией минорного штамма, требуется применение других методов, например, секвенирование нового поколения или мультиплексная ПЦР в реальном времени.

Метод секвенирования по Сэнгеру тем не менее обладает рядом достоинств, в том числе позволяет регистрировать однонуклеотидные замены, инсерции или делеции и обладает относительно невысокой стоимостью проведения исследования. Чувствительность использованного метода позволяет фиксировать отсутствие различий в последовательности выбранного участка гена, что, в свою очередь, дает достаточные основания с высокой степенью вероятности утверждать наличие у пациента именно реактивации в случае полного совпадения последовательностей.

Соотношение реактивации и смены мажорного вирусного штамма у реципиентов алло-ГСК, включенных в исследование, составило 8 к 6 (всего 14 пациентов), что несколько отличается от результатов другого сходного исследования [7], в котором показано преобла-

дание реинфекции над реактивацией. Малый размер проанализированной выборки не позволил получить достоверных различий в соотношении частоты реактивации и смены вирусного штамма, а также в сроках появления вирусной ДНК в крови пациентов после ТГСК и трансфузионной нагрузке у пациентов. Тем не менее наблюдалась тенденция к более позднему срокам появления ДНК вируса именно в случае реинфекции. Можно предположить, что у пациентов со значительно более длительным сроком (более 100 дней), вероятно, наблюдается реинфекция экзогенным штаммом, которая могла произойти на более поздних сроках после трансплантации и может быть связана с инкубационным периодом вирусной инфекции и формированием новой вирусной генерации. При этом у пациентов со сменой штаммов, у которых наблюдаются более короткие сроки до появления вирусной ДНК после трансплантации (сравнимые со сроками, наблюдаемыми у пациентов с реактивацией – около 30 дней), вероятно, происходит реактивация минорного штамма. Это связано с тем, что смена иммунной системы реципиента на донорскую в результате алло-ТГСК, а также иммуносупрессивная (и возможная противовирусная) терапия создают условия, в которых преимущество может

получить другой эндогенный штамм с несколько иными свойствами. Таким образом, определение количества различных штаммов у одного пациента до ТГСК может быть актуальной задачей для оценки вероятности возникновения ЦМВ-инфекции после трансплантации.

Еще одним источником другого вирусного штамма может быть донорская кровь, потребность в которой возникает у всех пациентов в посттрансплантационном периоде. Основным депо ЦМВ являются клетки эндотелия сосудов, клетки моноцитарно-макрофагального ряда, а также дендритные клетки [9]. Все компоненты донорской крови подвергаются лейкоредукции, что снижает вероятность передачи ЦМВ с донорскими компонентами, но даже лейкоредуцированные компоненты содержат до 1 млн остаточных лейкоцитов, что не позволяет считать риск передачи ЦМВ нулевым. Тем не менее данные, полученные в ходе исследования, не показали достоверного различия в общем количестве трансфузий у пациентов с реактивацией и сменой штамма (реинфекцией). Также не было выявлено достоверных различий при оценке количества трансфузий по отдельным компонентам донорской крови.

Повышенная восприимчивость к инфекции у реципиентов алло-ГСК позволяет рассматривать в качестве источника нового штамма ЦМВ внутрибольничное инфицирование, поскольку вирус может распространяться контактным путем. Анализ последовательностей вирусной ДНК показал низкую вероятность внутрибольничной передачи инфекции, так как пациенты, чьи образцы были включены в исследование, находились в пределах одного отделения, однако нуклеотидные последовательности исследованных образцов вирусной ДНК от разных пациентов не совпадали. Исследование трансплантата стволовых клеток чувствительными молекулярными методами на наличие ЦМВ не проводится. Однако доноры стволовых клеток обследуются на маркеры ЦМВ перед заготовкой трансплантата. Таким образом, трансплантат может являться источником экзогенного штамма, хотя такая ситуация маловероятна.

Следует отметить, что проведенный анализ клинических данных пациентов, который включал оценку таких показателей, как приживление трансплантата, отложенное восстановление показателей кроветворения, наличие и тип РТПХ, летальность в первый год после трансплантации, не показал наличия влияния типа регистрируемой ЦМВ-инфекции на состояние пациента и исход трансплантации. Как для пациентов с реактивацией, так и для пациентов со сменой штамма с равной частотой наблюдались РТПХ и летальный исход. Данный факт может свидетельствовать об отсутствии какого-либо значимого влияния самого факта смены штамма вируса

как на течение инфекционного эпизода, так и на результаты трансплантации, что может объясняться отсутствием ярко выраженных различий в патогенезе у разных штаммов вируса. С другой стороны, малый размер выборки не позволяет нам строго постулировать отсутствие такого влияния.

Суммируя вышесказанное, можно предположить, что при смене генотипа источником инфекции, скорее всего, являются минорные штаммы, которые начинают вносить основной вклад в вирусную нагрузку на фоне проведения трансплантации и/или специфической противовирусной терапии. Однако чтобы строго доказать этот факт, необходимо использовать методы, позволяющие детектировать ДНК минорных штаммов, такие как секвенирование нового поколения или пиросеквенирование. Подробный механизм смены штамма в литературе не описан и требует дальнейших исследований.

## Заключение

Были проанализированы образцы ДНК ЦМВ, выделенной из крови реципиентов алло-ГСК: методом секвенирования определен тип ЦМВ-инфекции (реактивация штамма вируса, выявляемого до трансплантации и вносящего основной вклад в вирусную нагрузку, или смена вирусного штамма), оценен срок появления вирусной ДНК в крови пациентов после ТГСК, оценена трансфузионная нагрузка в период после трансплантации до появления вирусной ДНК в крови. Показано, что вероятность реактивации и смены вирусного штамма практически одинакова (8 против 6). При смене штамма ДНК ЦМВ появляется в крови в среднем на более поздних сроках после трансплантации (медиана – 70 дней), чем при реактивации (медиана – 27 дней), и среднее количество трансфузий компонентов донорской крови несколько выше при смене штамма, чем при реактивации эндогенного вируса (11 против 4). Однако анализ показал отсутствие статистически значимой связи между типом инфекции и такими факторами, как основной диагноз и объем трансфузионной терапии. Возможно, это связано с малым размером изученной выборки. Тем не менее внутрибольничное распространение вируса было исключено. Наиболее вероятным сценарием в случае смены вирусного штамма после ТГСК является выход в мажор ранее минорного штамма.

Однако вопрос об источнике инфекции при смене генотипа и вирусного штамма остается открытым. Также до конца не определено влияние типа инфекции на характер течения инфекционного эпизода, что требует дальнейшего изучения и обязательного накопления статистически значимых данных.



## Литература

1. Bradley A.J., Kovács I.J., Gatherer D., Dargan D.J., Alkharsah K.R., Chan P., et al. Genotypic analysis of two hypervariable human cytomegalovirus genes. *J Med Virol.* 2008;80(9):1615-1623. DOI: 10.1002/jmv.2124
2. Novak Z., Ross S.A., Patro R.K., Pati S.K., Kumbha R.A., Brice S., Boppana S.B. Cytomegalovirus strain diversity in seropositive women. *J Clin Microbiol.* 2008;46(3):882-886. DOI: 10.1128/JCM.01079-07
3. Mattick C., Dewin D., Polley S., Sevilla-Reyes E., Pignatelli S., Rawlinson W., et al. Linkage of human cytomegalovirus glycoprotein gO variant groups identified from worldwide clinical isolates with gN genotypes, implications for disease associations and evidence for N-terminal sites of positive selection. *Virology.* 2004;318(2):582-597. DOI: 10.1016/j.virol.2003.09.036
4. Görzer I., Guelly C., Trajanoski S., Puchhammer-Stöckl E. Deep sequencing reveals highly complex dynamics of human cytomegalovirus genotypes in transplant patients over time. *J Virol.* 2010;84(14):7195-7203. DOI: 10.1128/JVI.00475-10
5. Coaquette A., Bourgeois A., Dirand C., Varin A., Chen W., Herbein G. Mixed cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis.* 2004;39(2):155-161. DOI: 10.1086/421496
6. Puchhammer-Stöckl E., Görzer I., Zoufaly A., Jaksch P., Bauer C.C., Klepetko W., Popow-Kraupp T. Emergence of multiple cytomegalovirus strains in blood and lung of lung transplant recipients. *Transplantation.* 2006;81(2):187-194. DOI: 10.1097/01.tp.0000194858.50812.cb
7. Zawilinska B., Szostek S., Kopec J., Piatkowska-Jakubas B., Kosz-Vnenchak M. Multiplex real-time PCR to identify a possible reinfection with different strains of human cytomegalovirus in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Acta Biochim Pol.* 2016;63(1):161-166. DOI: 10.18388/abp.2015\_1162
8. Dolan A., Cunningham C., Hector R.D., Hassan-Walker A.F., Lee L., Addison C., et al. Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *J Gen Virol.* 2004;85(5):1301-1312. DOI: 10.1099/vir.0.79888-0
9. Mocarski E.S., Courcelle C.T., Pass R.F. Cytomegaloviruses. In: *Fields Virology.* Bernard N. Fields, David Mahan Knipe, Peter M. Howley, Diane E. Griffin. Lippincott Williams & Wilkins, 2001. 3087 pages.