

VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETO
BIOMEDICINOS MOKSLŲ INSTITUTO
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS, MIKROBIOLOGIJOS IR
LABORATORINĖS MEDICINOS KATEDRA

MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS

**RETROSPEKTYVI SAUSO KRAUJO LAŠŲ PGR ANALIZĖ, ĮTARIANT
ĮGIMTĄ CITOMEGALOVIRUSINĘ INFEKCIJĄ VAIKAMS SU
NEUROSENSORINIU KLAUSOS SUTRIKIMU**

Magistrantė MARGARITA GROMOVA _____
(parašas)

Darbo vadovas
SILVIJA KIVERYTĖ

(parašas)

VU MF Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir
laboratorinės medicinos katedros vedėja
Doc. dr., D. Karčiauskaitė leidžiama ginti

(parašas)

Darbo įteikimo data _____

Registracijos Nr. _____

2018 m., Vilnius

TURINYS

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS	4
IVADAS	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA	8
1.1 Klausos sutrikimo apibūdinimas.....	8
1.1.1 Klausos sutrikimų klasifikacija.....	8
1.1.2 Vidinės ausies anatomija ir garso suvokimas	8
1.2 Vaikų ikikalbinio neurosensorinio klausos sutrikimo etiologija.....	9
1.2.1 Genetiniai veiksniai vaikų NKS etiologijoje	10
1.2.2 Negenetiniai veiksniai vaikų NKS etiologijoje.....	10
1.2.3 Klausos sutrikimo nustatymas naujagimiams	11
1.3 Citomegalo viruso (CMV) charakteristika.....	11
1.3.1 Viruso struktūra ir genomai	11
1.3.2 Patekimas į ląsteles ir viruso genų ekspresija	12
1.4 CMV infekcija.....	13
1.4.1 Prenatalinis CMV infekcijos perdavimas ir nėščiųjų imunitetas	14
1.5 Įgimta CMV infekcija	15
1.5.1 Įgimtos CMV infekcijos formos	15
1.6 Įgimta CMV infekcija ir neurosensorinis klausos sutrikimas.....	16
1.6.1 CMV klausos pažeidimo mechanizmai.....	17
1.7 CMV infekcijos nustatymas ir prevencija.....	17
1.7.1 Nėščiųjų CMV infekcijos diagnostika	17
1.7.2 Vaisiaus infekcijos prognostiniai žymenys.....	19
1.7.3 Postnatalinis įgimtos CMV infekcijos nustatymas	20
1.7.4 Prevencija.....	20
2. TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI	21
2.1 Tyrimo medžiaga	21
2.2 Metodai	21
2.2.1 Mėginio paruošimas	21
2.2.2 DNR gryninimas silicio membranų kolonėlių metodu	21
2.2.3 Tikro laiko polimerazės grandininė reakcija CMV aptikimui mėginyje	24
2.2.4 Papildomi tyrime naudoti duomenys ir statistinė analizė	27
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	29
3.1 Rezultatai	29
3.1.1 Įgimtos CMV infekcijos ir ikikalbinio NKS priežasčių dažnis tirtoje imtyje.....	29
3.1.2 Tiriamųjų grupės, kuriai įgimta/prenatalinė CMV infekcija yra tikėtina ikikalbinio NKS priežastis, charakteristika.....	32

3.1.3	Tiriamųjų grupių su skirtinga NKS etiologija amžiaus – kada nustatyta kurtumo diagnozė ir atlikta KI, palyginimas.....	34
3.1.4	Tiriamųjų grupių su skirtinga NKS etiologija, KI efektyvumo palyginimas.....	37
3.2	Aptarimas	39
	IŠVADOS.....	44
	SUMMARY	45
	LITERATŪROS SĄRAŠAS	46
	1 PRIEDAS	53
	PADĖKA.....	54

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

Ag – antigenas

ALT – alaninaminotransferazė

AST – aspartataminotransferazė

CMV – citomegalo virusas

CNS – centrinė nervų sistema

dB – decibelas

dH₂O – dejonizuotas vanduo

DIK – diseminuota intravaskulinė koaguliacija

DNR – deoksiribonukleorūgštis

EBV – Epšteino-Baro virusas

GJB2 – plyšinių tarpląstelių jungčių β-2 baltymas (angl., *Gap junction β-2 protein*)

HSV – Herpes simplex virusas

IC – vidinė kontrolė (angl., *Internal control*)

IFITM – interferono indukuojami transmembraniniai baltymai (angl., *Interferon-inducible transmembrane proteins*)

Ig – imunoglobulinas

JAV – Jungtinės Amerikos Valstijos

KAK – klausymo apibūdinimo kategorija (angl., *Category of auditory performance, CAP*)

kb – kilobazė

kDNR – kopijinė DNR

KI – kochlearinė implantacija

KS – klausos sutrikimas

KSS SIR – kalbos suprantamumo skalė (angl., *Speech intelligibility rating, SIR*)

KSSKP - klausos sukeltų smegenų kamieno potencialų registravimas (angl., *Brainstem evoked response audiometry, BERA*)

LMC – Laboratorinės medicinos centras

MIP-1α – makrofagų uždegiminis baltymas 1α

MRT – magnetinio rezonanso tyrimas

NKS – neurosensorinis klausos sutrikimas

NPC – branduolio porų kompleksas (angl., *Nuclear pore complex*)

NPV – neigiama prognostinė vertė

OAE – otoakustinė emisija

PDGF-R – trombocitų kilmės augimo faktoriaus receptoriais (angl., *Platelet-derived growth factor receptor*)

PMAL – paveldimos medžiagų apykaitos ligos

pp – fosfoproteinas (angl., *Phosphoprotein*)

PSO – Pasaulio sveikatos organizacija

TL-PGR – tikro laiko polimerazės grandininė reakcija

TPV – teigiama prognostinė vertė

ULAC - užkrečiamųjų ligų ir AIDS centras

VNKP – visuotinė naujagimių klausos patikra

VNP – visuotinė naujagimių patikra

VšĮ VUL SK – VšĮ Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikos

VZV – *Varicella zoster* virusas

ŽIV – žmogaus imunodeficito virusas

IVADAS

Pirmasis straipsnis, aprašantis įgimtos citomegalo virusinės (CMV) infekcijos nulemtą klausos sutrikimą, išleistas 1964 metais, *D. N. Medearis et al.* Per paskutinius 54 metus atlikta eilė tyrimų, kurių tikslas buvo nustatyti ryšį tarp CMV ir neurosensorinio klausos sutrikimo (NKS). Šiandien įgimta CMV infekcija pripažinta kaip viena iš svarbiausių negenetinių priežasčių, lemiančių ikikalbinę vaikų klausos negalią visame pasaulyje [1].

Prenataliniu laikotarpiu iš motinos vaisiui perduotos įgimtus vaisiaus pažeidimus sukeliančios infekcijos priskiriamos TORCH infekcijų grupei (toksoplazmozė, raudonukė, CMV ir kt.) [2]. Įvairių autorių duomenimis, iš kiekvieno 1000-čio stebimų nėštumų, su įgimta CMV infekcija gimsta iki 7 naujagimių [3-5]. CMV virusas plinta į daugelį organizmo ląstelių, todėl prenataliniame laikotarpyje užkrėstiems vaikams galimi įvairaus sunkumo bei eigos centrinės nervų sistemos (CNS), klausos, regos bei kiti sisteminiai pažeidimai [6]. Svarbu tai, jog prenatalinės infekcijos riziką lemia ne tik pirminis, bet ir kartotinis motinos užsikrėtimas CMV, kas nebūdinga toksoplazmozei ir raudonukei [7, 8]. Laiku nustatyta infekcija vis dar išlieka *terra incognita* – dažniausiai motinos užsikrėtimo bei vaisiaus įgimtos CMV infekcijos atvejai yra kliniškai tylūs. Nepaisant to, kad 85-90% naujagimių neturi infekcijai būdingos simptomatikos, 10–15% išsivysto ilgalaikiai neurologiniai sutrikimai ir tai yra dažniausia negenetinė vaikų ikikalbinio NKS priežastis [9, 10].

Bet kokio laipsnio ikikalbinis klausos sutrikimas (KS), turi neigiamą poveikį vaiko raidai, formuojantis socialiniams bei sklandžios kalbos įgūdžiams [11]. Per pirmus trejus vaiko gyvenimo metus kalba įsisavinama sparčiausiai, todėl garsų analizavimas yra būtinas kalbos raidoje [12]. Norint pagerinti vaikų su įvairios kilmės klausos pažeidimais gyvenimo kokybę ir socialinę integraciją, daugumoje šalių sukurtos naujagimių klausos patikros programos (VNKP), o Lietuvoje visuotinė patikra įsigaliojo nuo 2014 m. sausio 1 d. [13]. Tačiau VNKP nejautri visiems KS atvejams. Įgimta CMV infekcija sukelia neurosensorinio pobūdžio sutrikimus, kuriems būdingas progresuojančios eigos, dažniausiai naujagimystėje nepasireiškiantis klausos blogėjimas. CMV viruso sukelti vidinės ausies ar klausos nervo pažeidimai gali išsivystyti po 1-4 metų, bei progresuoti link sunkesnio neprisigirdėjimo laipsnio. Besimptomė įgimta CMV infekcija kelia diagnostinę problemą: simptomų nebuvimas neduoda pagrindo infekcijos įtarimui. Dažniausiai apie prenataliu laikotarpiu įvykusios infekcijos tikimybę pagalvojama tada, kai VNKP metu arba vėliau, nustatomas pažengusio laipsnio KS arba kiti neurologiniai sutrikimai [4, 5].

Darbe nagrinėjamos temos aktualumą įrodo ne tik problemos paplitimo mastas, bet ir eilė tyrimų, kuriais pagrįstos rekomendacijos taikyti visuotinį tikrinimą dėl CMV

naujagimystėje. Patvirtinus įgimtą CMV infekciją, rizikos grupei būtų rekomenduojama dažnesnė klausos patikra bei gydytojų priežiūra. Ankstyvas NKS bei jo priežasties nustatymas, leistų laiku pradėti taikyti klausos reabilitaciją kochleariniais implantais, taip pagerinant tiek sutrikimo prognozę, tiek ir sergančio vaiko kalbos įgūdžių formavimąsi, priartinant juos prie bendraamžių lygio [5, 12-14].

Darbo tikslas:

Panaudoti naujagimystės laikotarpiu ant *Guthrie* kortelių paimtus kraujo mėginius retrospektyviam CMV DNR nustatymui ir įvertinti įgimtos CMV infekcijos paplitimą į VUL SK filialo Vaikų ligonę besikrepusių kurčių vaikų kochlearinių implantų naudotojų tarpe.

Uždaviniai:

1. Ištirti sauso kraujo mėginius nustatant juose CMV DNR bei palyginti gautus rezultatus su Užkrečiamų ligų ir AIDS centro (ULAC) sergamumo įgimta CMV infekcija nuo 2003 iki 2016 m. laikotarpio metinių ataskaitų duomenimis
2. Įvertinti tiriamosios grupės, kurios tikėtina pirminė ikikalbinio NKS priežastis yra įgimta CMV infekcija, vaikų amžiaus, kai buvo diagnozuotas kurtumas bei atlikta kochlearinė implantacija, atitikimą rekomendacijoms ir palyginti su kitų NKS etiologinių grupių rezultatais.
3. Palyginti tiriamosios grupės, kurios tikėtina pirminė ikikalbinio NKS priežastis yra įgimta CMV infekcija, klausos reabilitacijos kochleariniais implantais efektyvumą su efektyvumu kitų NKS etiologinių grupių, remiantis klausymo apibūdinimo (KAK) ir kalbos suprantamumo (KSS) skalių kategorijomis.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Klausos sutrikimo apibūdinimas

Klausos sutrikimu (KS) vadinamas negalėjimas aiškiai išgirsti arba suvokti garsus. Skirtingos etiologijos KS pasireiškia visose žmonių amžiaus grupėse. Remiantis 2018-aisiais metais atnaujintais Pasaulio sveikatos organizacijos (PSO) duomenimis, klausos negalią turi 466 milijonai žmonių visame pasaulyje, tarp kurių 34 milijonai – vaikai [15-17].

1.1.1 Klausos sutrikimų klasifikacija

Normalią klausą užtikrina visų ausies dalių anatomicinis vientisumas ir funkcionalumas, bet koks pažeidimas periferinėje ir centrinėje klausos sistemos dalyje, lems klausos pokyčius. Pažeidimas gali būti vienas arba abipusis; pagal klausos organo pažeidimo vietą, apibūdinami keturi KS tipai:

1. *Kondukcinis* – atsiranda dėl išorinės arba vidurinės ausies patologijų;
2. *Neurosensorinis* – pasireiškia dėl vidinės ausies ir klausos nervo pažeidimų;
3. *Mišrus* – kombinuotas kondukcinio ir neurosensorinio pažeidimo derinys;
4. *Centrinis* – atsiranda dėl pažeidimų VIII-oje galvinių nervų poroje, smegenų žievėje arba smegenų klausos jutimo centruose.

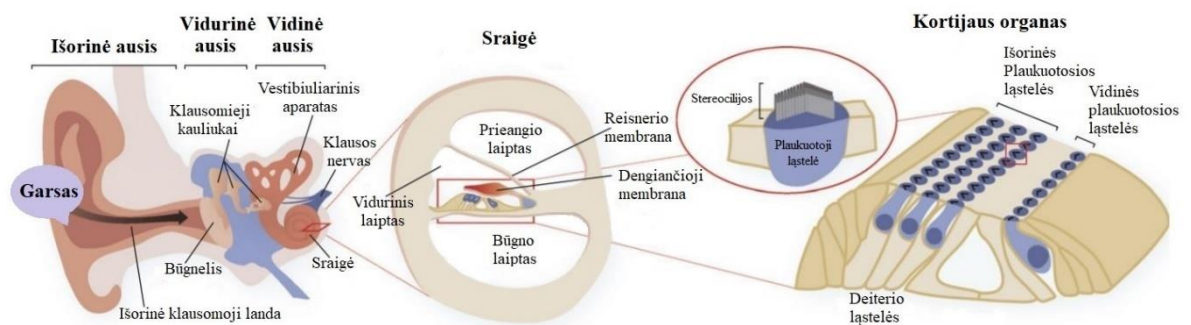
Klausos sutrikimo laipsnis nustatomas pagal geriau girdinčios ausies audiologinio ištyrimo rezultatus. Galimi lengvas (20-40 dB), vidutinio sunkumo (41-70 dB), sunkus (71-90 dB) ir ypač sunkus (kurtumas) (>91 dB) KS laipsniai. Kalbos raidos atžvilgiu, sutrikimas atsiradęs kol kalba dar nesusiformavusi, laikomas ikikalbiniu, pokalbinis KS atsiranda kai kalbos įgūdžiai yra susiformavę [18, 19].

1.1.2 Vidinės ausies anatomija ir garso suvokimas

Periferinę klausos organų sistemą sudaro išorinė, vidurinė, vidinė ausis. Pagrindinė ausies funkcija – garso nukreipimas bei mechaninių virpesių konvertavimas į nervinį impulsą, kuris vyksta vidinėje ausyje. Tai uždara, skysčiu užpildyta sistema, esanti smilkinkaulio uolinėje dalyje. Ją sudaro kaulinis ir plėvinis labirintai, formuojantys sensorinę klausos dalį – sraigę, bei pusiausvyros sistemą – vestibuliarinį aparatą. Sraigė tai spiralinis organas, kurio išilgai einantis kanalas turi tris atskiras dalis: prieangio (lot. *Scala vestibuli*) ir būgno laiptus (lot. *Scala tympani*), pripildytus Na⁺ turtingos perilimfos bei vidurinę laiptą (lot. *Scala media*), užpildytą K⁺ bei Ca²⁺ turinčios endolimfos. Viduriniame laipte ant bazinės membranos, išsidėsto Kortijaus organas,

kitaip dar vadinamas neurosensoriniu klausos epiteliu. Jis sudarytas iš plaukuotųjų, viena eile išsidėsčiusių vidinių ir trimis eilėmis - išorinių ląstelių. Išorinės ląstelės atsakingos už mechaninių virpesių sustiprinimą, tuo tarpu impulsų perdavime daugiausiai dalyvauja vidinės ląstelės. Struktūroje svarbios ir mechaninius virpesius amortizuojančios atraminės (Deiterio) ląstelės (1 pav.) [20-23].

Garso virpinami būgnelis ir ausies kauliukai sukelia perilimfos judesius. Judėti pradeda ir bazinė membrana bei ant jos esančios neurosensorinės ląstelės. Jų plaukeliai (stereocilijos) liečiasi su virš Kortijaus organo esančia dengiančiąja membrana. Tuomet sukiamas jonų kanalų atsidarymas. Endolimfoje esantys K^+ jonai patenka į neurosensorines ląsteles, jų membranos depoliarizuojasi ir neurosiuntikliai išskiriami į sinapsinį plyšį. Įvyksta sinapsinis signalo perdavimas klausos nervo aferentinėmis skaidulomis į viršutiniame smilkininiame vingyje esančią projekcinę klausos žievę. Esant neurosensoriniam klausos sutrikimui (NKS), yra pažeista garsą suvokianti klausos sistema – sraigė arba klausos nervo struktūros [19, 24].



1 pav. Ausies sraigės sandara. Adaptuota iš [23].

1.2 Vaikų ikikalbinio neurosensorinio klausos sutrikimo etiologija

Vaikų ikikalbinis NKS gali būti įgimtas arba anksti įgytas. Sutrikimo išsivystimo etiologijoje žinomi genetiniai ir negenetiniai veiksniai, tačiau klausos pažeidimas gali būti ir idiopatinės kilmės [25]. Net ir lengvo laipsnio ikikalbinis KS, turi neigiamą poveikį vaiko raidai, formuojantis socialiniams bei sklandžios kalbos įgūdžiams [11]. Per pirmuosius trejus vaiko gyvenimo metus kalba įsisavinama sparčiausiai, todėl girdėjimas, garsų analizavimas yra būtini vaiko kalbos raidoje [12]. Norint pagerinti vaikų su klausos pažeidimu gyvenimo kokybę ir socialinę integraciją, daugumoje šalių pradėtos naujagimių klausos patikros programos. Lietuvoje, visuotinė naujagimių klausos patikra (VNKP) įsigaliojo nuo 2014 m. sausio 1 d. [13]. Ankstyvas KS bei jo priežasties nustatymas, leidžia laiku pradėti taikyti klausos rehabilitaciją, taip pagerinant tiek KS prognozę, kiek ir sergančio vaiko kalbos įgūdžių formavimąsi [12, 26, 27].

1.2.1 Genetiniai veiksniai vaikų NKS etiologijoje

Maždaug 50% vaikų įgimtų NKS pasireiškia dėl genų mutacijų, 30% iš jų yra susiję su sindromais, o 70% yra nesindrominiai [18]. Nesindrominis KS yra izoliuotas, nesusijęs su kitų organų struktūros/funkcijos pakitimais. Atvirksčiai, sindrominio KS atveju, kartu stebimi ir kitų organų sistemų struktūros/funkcijos pakitimai [28, 29]. Tarp gerai žinomų sindromų minimi *Usher*, *Waardenburg* ir *Pendred*; dažniausiai pasitaiko *Pendred* ir *Usher* sindromai [29]. KS lemiančios mutacijos pasižymi fenotipine įvairove ir gali būti paveldėtos autosominiu recesyviniu, autosominiu dominantiniu, X recesyviniu bei mitochondrinu paveldėjimo tipais [18, 30]. Nepaisant heterogeniškumo tarp skirtingų populiacijų, pati dažniausia genetinė NKS priežastis – tarpląstelines plyšines jungtis formuojančius baltymus koneksinus 26 koduojančio GJB2 geno mutacija [31, 32]. Koneksinas 26 kartu su koneksinu 30 sudaro koneksoną, kuris formuoja tarpląstelines jungtis. Jomis vyksta neurosensorinių ląstelių K⁺ jonų apykaita. Koneksinų 26 ir 30 koduojančių genų raiška vyksta vienu metu, todėl GJB6 geno mutacijos sutrikdo ir koneksiną 30 koduojančio geno transkripciją. Dėl to abiejų baltymų transliacija nevyksta ir sutrikdoma K⁺ jonų apykaita plaukuotose ląstelėse.[33].

1.2.2 Negenetiniai veiksniai vaikų NKS etiologijoje

Vaikų 25% įgimtų arba anksti įgytų NKS, lemia prenataliniu, perinataliniu arba postnataliniu laikotarpiu atsiradusių rizikos veiksnių spektras (1 lentelė) [18]. Šiame darbe ikikalbinio NKS etiologija apžvelgiama iš naujagimių prenatalinės citomegalo virusinės (CMV) infekcijos pusės.

1 lentelė. Negenetiniai veiksniai vaikų NKS etiologijoje. Pagal [17, 25, 13]

Būklės gimimo metu	<ul style="list-style-type: none">- Nėštumo trukmė mažesnė nei 32 savaitės;- Naujagimio svoris mažesnis nei 1500 gramų;- Sunki perinatalinė hipoksija;- Naujagimių gelta;- Įgimtos kaklo formavimosi ydos;- Galvos arba stuburo kaklinės dalies trauma gimdymo metu.
Motinos ligos	<ul style="list-style-type: none">- Motinos žmogaus imunodeficito virusas (ŽIV) arba sifilis;- Motinos medžiagų apykaitos ligos (cukrinis diabetas, hipotirozė);- Ototoksinių vaistų vartojimas nėštumo metu (aminoglikozidų grupės antibiotikai, vankomicinas, cisplatina, furozemidas ir kt.).
Naujagimio infekcijos	<ul style="list-style-type: none">- Įgimtos TORCH grupės infekcijos prenataliniame periode (toksoplazmozė, raudonukė, citomegalo virusas (CMV), Herpes simplex virusas (HSV) ir kt.);- Kūdikystėje arba ankstyvoje vaikystėje persirgta bakteriniu meningitu (<i>N. meningitidis</i>, <i>H. influenzae</i>, <i>S. pneumoniae</i> ir kt.);- Kūdikystėje arba ankstyvoje vaikystėje persirgta tymais (skiepai sumažino sergamumą); sepsis.

1.2.3 Klausos sutrikimo nustatymas naujagimiams

Naujagimių klausos vertinama remiantis sveikatos apsaugos ministro įsakymu Nr. V-612 „Dėl visuotinio naujagimių klausos tikrinimo tvarkos aprašo patvirtinimo“. VNKP atliekama ne vėliau kaip per 28 dienas nuo gimimo [13]. Pradinis klausos tyrimas – ausies sraigės generuojamų garso bangų (aido) – otoakustinės emisijos (OAE) registravimas. Bangas sukuria išorinės ląstelės, kaip atsaką į garsinį stimulą [34]. Užregistravus OAE signalą, tikrinama, ar naujagimis turėjo KS rizikos veiksnių. Jų nenustačius, klausos ištyrimas yra baigiamas. Pasitvirtinus galimam KS rizikos veiksniui, būtina gydytojo otorinolaringologo konsultacija, kuri atliekama per 6-12 mėnesių po išvykimo iš stacionaro. Jei OAE užregistruoti nepavyko, per 3 mėnesius po išvykimo iš stacionaro, KS tipas bei laipsnis nustatomi atliekant papildomus audiologinius tyrimus (klausos sukeltų smegenų kamieno potencialų registravimas (KSSKP), timpanometrija) [13].

1.3 Citomegalo viruso (CMV) charakteristika

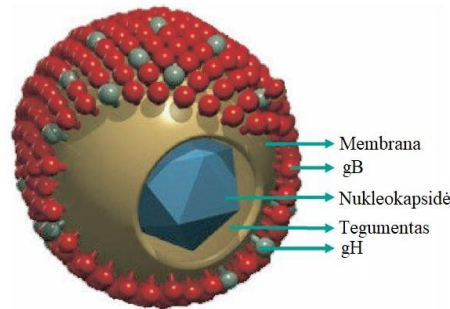
Žmogaus CMV ląstelių lygyje sukelti pokyčiai pirmą kartą aprašyti 1910 metais. Tai buvo branduoliuose esantys pėlėdos akis primenantys intarpai – tipiškiausias audinių biopsijose stebimas CMV infekcijos požymis. *Herpesviridae* šeimai priklausantis žmogaus CMV kitaip dar vadinamas penktuoju herpes šeimos virusu (angl., *Human Herpes Simplex 5*, HHV-5) yra tipinis obligatinis viduląstelinis parazitas [35, 36].

1.3.1 Viruso struktūra ir genomai

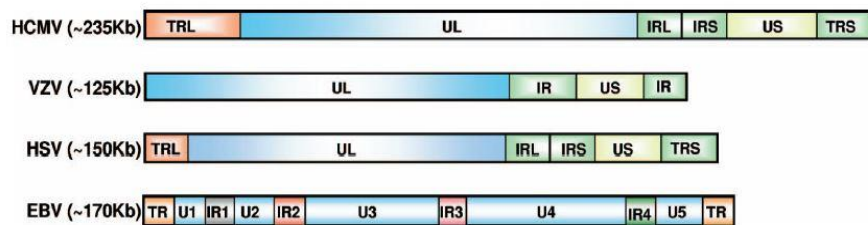
CMV virionai – sferinės formos dalelės, kurias sudaro genomą sauganti nukleokapsidė, tegumentas ir lipidinė membrana (2 pav.). Ikosaedrinės formos kapsidė sudaro integriniai baltymai, organizuoti į 162 kapsomerus [37]. Tegumentas – nukleokapsidę supanti struktūra, kurioje gausu virionų, susirinkime dalyvaujančių fosforilintų reguliacinių baltymų. Svarbiausi yra fosfoproteinai (angl., *phosphoproteins*, pp) 65, pp71, pp150 ir pp28. Infekcijos metu, šie fosfoproteinai T limfocitų atsaką sukelia pirmieji [38]. Lipidinėje membranoje išsikiriami glikoproteinai, formuojantys gB, gM/gN ir gH/gL/gO kompleksus. Šie kompleksai būtini prisijungimui ir patekimui į šeimininko ląsteles, tačiau virusui pirmą kartą patekus į organizmą, prieš juos susiformuoja imuninės atminties ląstelės [37].

Genomą sudaro 235 kilobazių (kb) linijinė dvigrandė deoksiribonukleorūgštis (DNR) ir tai yra didžiausias genomai tarp visų *Herpesviridae* šeimai priklausančių atstovų. Pagrindiniai visiems herpesvirusams būdingi homologiniai genai, koduojantys DNR polimerazę,

glikoproteinus gB ir gH išsidėsto UL (angl., *unique long*, UL) regiono centrinėje dalyje (3 pav.). Likusią genomo dalį sudaro specifiniai žmogaus CMV genai [39].



2 pav. CMV viriono struktūra. Adaptuota iš [37]



3 pav. Žmogaus herpesvirusų genomų organizacijos schema. CMV genome išskiriami unikalūs ilgasis (angl. *unique long*, UL) ir trumpasis (angl. *unique short*, US) regionai, kurių galuose įterptos terminalinės kartotinės sekos (angl., *terminal repeat long*, TRL; *terminal repeat short*, TRS), o tarp regionų – vidinės invertuotos kartotinės sekos (angl., *internal repeat long*, IRL; *internal repeat short*, IRS). Adaptuota iš [37]

1.3.2 Patekimas į ląsteles ir viruso genų ekspresija

Viruso patekime į ląsteles dalyvauja glikoproteinai gB, gH, gL, gO bei UL128, UL130 ir UL131 genų koduojami baltymai. Manoma, gB sąveika su trombocitų kilmės augimo faktoriaus receptoriais (angl., *platelet-derived growth factor receptor*, PDGF-R) ir kitais ląstelių integriniais yra esminė viruso patekimui į ląsteles [37, 40]. Priklausomai nuo ląstelių tipo, CMV būdingi du patekimo būdai:

- A. Patekimas į endotelines ir epitelines ląsteles vyksta *receptorinės endocitozės* būdu, prie ląstelės paviršiaus receptorių prisijungus gH/gL/UL128/UL130/UL131 pentamerui;
- B. Patekimas į fibroblastus vyksta *susiliejančiomis membranoms*, prie ląstelių paviršiaus receptorių prisijungus gB, gH/gL/gO trimerui [37, 41].

Palankesnis patekimo į ląstelę būdas yra receptorinė endocitozė. Tai paaiškinama tuo, kad dalies imunogeniško tegumento baltymų netenkama izoliuotai – endosomoje, veikiant

proteazėms bei pH. Membranų susilieėjimas yra sudėtingas procesas, kurio metu keičiasi membraninių baltymų konformacija, todėl šis procesas savaime gali aktyvinti nuo interferono priklausomus imuniniame atsake dalyvaujančius transmembraninius baltymus (angl., *interferon-inducible transmembrane proteins*, IFITM) [42, 43]. Viruso genomo patekimas į branduolį vyksta per branduolio porų kompleksą (angl., *nuclear pore complex*, NPC). Nukleokapsidės viršūnė atsiveria po sąveikos su NPC baltymais (Nup214, Nup358 ir hCG1), pro viršūnę išėjusi CMV DNR keliauja į ląstelės šeimininkės branduolį [43, 44].

Viruso genų ekspresijos kaskada užsiveda per 2 valandas nuo patekimo į šeimininko ląstelę. Pirmieji tiesioginių ankstyvųjų genų (angl., *immediate early gene*, IE) produktai reguliuoja ląstelės procesų visumą, daugiausiai slopindami įgimto imuninio atsako komponentus. Priklausomai nuo pirmosios pakopos IE baltymų efektyvumo, paros eigoje, skatinamas informacijos nurašymas ir nuo ankstyvųjų genų (angl., *early gene*, E). Šie atsakingi už esminę viruso ciklo etapą – DNR replikaciją. Vėlyvųjų genų (angl., *late gene*, L) transkripcija prasideda po daugiau nei 24 val., jų koduojami baltymai dalyvauja virionų susirinkimo procese [38, 39].

1.4 CMV infekcija

Priklausomai nuo geografinio regiono ir jo ekonominio statuso, CMV sukelta infekcinė liga yra infekuota nuo 40% iki 100% žmonių populiacijos [45]. Atsižvelgiant į užsikrėtimo laikotarpį, infekcija skirstoma į įgytą (pirminę arba kartotinę) arba įgimtą. Esant sveikai imuninei sistemai, įgyta *pirminė* infekcija dažniausiai būna besimptomė. Retais atvejais infekcijos požymiai sutampa su mononukleozės arba gripo simptomatika. Asmenims su imunodeficitu, arba gydomiems imunosupresiniais vaistais, CMV gali sukelti rimtas komplikacijas. Nepaisant persirgtos infekcijos, esant uždegimui, fiziologinei nėštumo imunosupresijai, vartojant kortikosteroidus, imunosupresinius vaistus, galima *kartotinė* infekcija. Susergama esamo įgyto CMV specifinio imuniteto fone, kai reaktyvuojasi latentinė (slapta) forma arba jei užsikečiama kito potipio virusu [46].

Plitimo keliai

Dėl plitimo kelių įvairovės, CMV net ir šią dieną išlieka vienas iš plačiausiai paplitusių virusų žmonių populiacijoje. Pagrindinis *infekcijos šaltinis* yra CMV infekuotas žmogus, infekcijos metu virusą išskiriantis su seilėmis, ašaromis, šlapimu, krauju ir kitais kūno skysčiais bei sekretais. Infekcijos sukėlėjas *plinta* kontaktiniu būdu, per kraują, transplantuojant organus ir lytinių santykių metu. Vertikalus infekcijos perdavimas prenataliniu periodu lemia

vaisiaus įgimtą CMV infekciją, perinataliai naujagimiai užsikrečia gimdymo metu (kontaktas su lytinių takų išskyromis, krauju) ir postnataliai – per motinos pieną [46, 47].

Plitimo ypatumai

Viruso replikacija vyksta patekimo zonoje – epitelinėse ląstelėse. Vėliau hematogeniniu keliu virusas gali išplisti į hepatocitus, fibroblastus, neuronus, lygiųjų raumenų ir endotelio ląsteles [48, 49]. Horizontalią transmisiją lemia CMV tropizmas inkstų bei seilių liaukų epitelui: nesant jokių infekcijos simptomų, virusas gali būti išskiriamas su seilėmis ir šlapimu (angl., *asymptomatic virus shedding*) [49]. Po pirminės infekcijos, virusas išlieka latentinėje formoje šeimininko mieloidinėse ląstelėse (kaulų čiulpų CD34+ pirminėse mieloidinėse ląstelėse, CD14+ monocituose, dendritinėse ląstelėse, megakariocituose) ir tokioje formoje, dėl nutildytos genų ekspresijos, virusologiniais tyrimais nebeaptinkamas [50-52].

1.4.1 Prenatalinis CMV infekcijos perdavimas ir nėščiųjų imunitetas

Nėštumo metu persirgtos, įgimtus vaisiaus pažeidimus lemiančios, infekcijos, priskiriamos TORCH infekcijų grupei. Nėščiosios CMV dažniausiai užsikrečia lytinių santykių metu bei nuo ikimokyklinio amžiaus vaikų [2]. Prenatalinės CMV infekcijos šaltinis yra motinos viremija arba placentinį barjerą pereinančios infekuotos mieloidinės kilmės ląstelės. Negana to, infekcijos rezervuaru gali būti ir pati placenta, per kurią virusas patenka į amniono vandenį [53]. Ar naujagimis gims su įgimta infekcija, priklauso nuo nėščiosios imuniteto. Jau nuo pirmo nėštumo trimestro, atsparumą tam tikriems patogenams vaisius įgija pasyviai, iš motinos gaudamas G klasės imunoglobulinus (Ig). Šie IgG aptinkami 8-10 gestacinio amžiaus vaisiaus virkštelės kraujyje, tačiau, tai 10% visų motinos IgG. Vėliau, 30-tą gestacinio amžiaus savaitę, IgG perdavimas siekia 50%, o 37-40 savaitę – pasiekia maksimumą [54]. Infekcijos perdavimo riziką lemia ne tik *pirminis*, bet ir *kartotinis* motinos užsikrėtimas CMV, kas nebūdinga toksoplazmozei ir raudonukei [7, 8]. Pirmą kartą užsikrėtus CMV nėštumo metu, vaisiaus infekcijos tikimybė yra didžiausia ir siekia 30-40%. Padidėjusią riziką lemia motinos įgyto CMV specifinio imuninteto nebuvimas (anti-CMV IgG-), todėl su virusu kovoja dar nesusiformavusi vaisiaus imuninė sistema. Priklausomai nuo populiacijos, viruso transmisija po kartotinės infekcijos galima nuo 0,5 % iki 2% [55]. Mažesnę vaisiaus infekcijos riziką lemia iki nėštumo susiformavusių, aukšto avidiškumo anti-CMV IgG transplacentinis perdavimas. Naujagimių įgimtos infekcijos sunkumas priklauso nuo gestacinio amžiaus ir nėštumo laikotarpio, kuriame įvyko užsikrėtimas. Nustatyta, kad didžiausia CMV transmisijos rizika yra trečiame nėštumo trimestre, tačiau tikimybė, kad naujagimis gims su įgimta CMV infekcija – žema. Nėščiajai pirmą

kartą užsikrėtus iki 20-os nėštumo savatės, transmisijos rizika žemiausia, bet įgimtos, sunkios infekcijos tikimybė – didžiausia [7, 56, 57].

Fertilus amžiaus moterų anti-CMV IgG⁺ serologinis paplitimas priklauso nuo geografinio regiono bei socialinės-ekonominės padėties. Išskiriamos aukšto (>70%), bei vidutinio (40-70%) serologinio paplitimo šalys. Žemo socialinio-ekonominio lygio šalys pasižymi aukštu CMV bei anti-CMV IgG paplitimu. Daugumoje Europos šalių dominuoja vidutinis serologinis paplitimas, todėl tikėtina, įgimtos CMV infekcijos atvejų po pirminės ar kartotinės infekcijų, šiose šalyse yra apylygiai [58, 59]. Pastebėta, kad aukšto serologinio paplitimo šalyse, dauguma įgimtos infekcijos atvejų nustatoma po kartotinės infekcijos. Tai paaškinama pakartotiniu užsikrėtimu kitais CMV potipiais, plačiai CMV nešiotųjų paplitusioje visuomenėje [3, 58-60].

1.5 Įgimta CMV infekcija

Įvairių autorių duomenimis, iš kiekvieno 1000-čio stebimų nėštumų, su įgimta CMV infekcija gimsta iki 7 naujagimių [3-5]. Virusas plinta į daugelį organizmo ląstelių, todėl prenataliniame laikotarpyje užkrėstiems vaikams, galimi centinės nervų sistemos (CNS), klausos, regos bei kiti sisteminiai pažeidimai [6], pasireiškiantys tiek po pirminės, kiek ir po kartotinės nėščiujų infekcijos [61]. Aprašoma viruso sąsaja ir su autizmo spektro sutrikimais [62]. Problemos aktualumą įrodo paplitimo mastas – įgimtos CMV infekcijos sukeltos ilgalaikės neurologinės pasekmės, yra dažnesnės nei Dauno, naujagimių alkoholinio sindromų bei *spina bifida* atvejai [9, 63-65].

1.5.1 Įgimtos CMV infekcijos formos

Besimptominė forma

Didžioji dalis (85-90%) naujagimių turi kliniškai tylią įgimtos infekcijos formą. Nepaisant to, 10–15% naujagimių gali išsivystyti vėliau pasireiškiantys ilgalaikiai neurologiniai sutrikimai [9, 10]. Atlikti tyrimai rodo, kad tokie naujagimiai turi aukštą NKS išsivystymo riziką. Yra sunku įvertinti, kuriems naujagimiams pasireikš infekcijos pasekmės, todėl tokiems vaikams siūloma atlikti reguliarią patikrą [14]. Šie simptomais nepasižymintys atvejai kelia infekcijos diagnostinę problemą: simptomų nebuvimas neduoda pagrindo infekcijos įtarimui. Dažniausiai, vaikų įgimtą besimptominę CMV infekciją bandoma patvirtinti tik kilus itarimams po VNKP metu arba vėliau nustatyto NKS [5].

Simptominė forma

Su įgimtai infekcijai būdinga simptomatika gimsta 10-15% naujagimių. Iš jų 20-30% miršta dėl sunkių kepenų pažeidimų, bakterinės supeinfekcijos arba diseminuotos intravaskulinės koaguliacijos (DIK). Likusiai daliai pasireiškia sunkūs neurologiniai pažeidimai ir kitos viruso sukeltos organų anomalijos (2 lentelė) [14, 66, 67]. Dar visai neseniai buvo laikomasi nuomonės, kad simptominę formą lemia tik pirminė nėščiųjų infekcija. Stebint aukšto serologinio paplitimo populiacijas, nustatyta, kad kartotinė infekcija taip pat lemia simptominę infekcijos formą [59, 68, 69].

2 lentelė. Dažniausi simptominės įgimtos CMV infekcijos formai būdingi klinikiniai simptomai ir kraujo laboratorinių tyrimų nuokrypiai. Pagal [59]

Klinikiniai simptomai	Laboratoriniai rodikliai
Intrakranijinės kalcifikacijos(71–88%)	Konjuguoto bilirubino padidėjimas (81%)
Petechijos (41–76%)	Trombocitopenija (77–81%)
Gelta (67%)	Aspartataminotransferazės (AST) bei alaninaminotransferazės (ALT) padidėjimas (76%)
Mikrocefalija (30–53%)	
Augimo sulėtėjimas (36–50%)	
KS (26–42%)	
Chorioreinitas (4–20%) ir kt.	

1.6 Įgimta CMV infekcija ir neurosensorinis klausos sutrikimas

Pirmasis straipsnis, aprašantis įgimtos CMV infekcijos nulemtą klausos sutrikimą, išleistas 1964 metais, *D. N. Medearis et al.* Per paskutinius 54 metus atlikta eilė tyrimų, siekiančių nustatyti ryšį tarp CMV ir NKS. Šiandien, įgimta CMV infekcija pripažinta kaip viena iš svarbiausių negenetinių priežasčių, lemiančių vaikų klausos negalią visame pasaulyje [1].

Įgimtos CMV infekcijos sukeltas NKS gali būti vienpusis arba abipusis; sutrikimo laipsnis varijuoja nuo lengvo iki gilaus, gali būti ir kintantis (banguojantis). Besimptomiams naujagimiams neurosensorinio pobūdžio pažeidimai gali pasireikšti ne iš karto, todėl naujagimystėje dažniausiai klausa būna normali. Vėlesnio pasireiškimo KS apibūdinamas kaip dviejų skirtingų klausos įvertinimų nesutapimas [4, 70, 71]. Kaip teigia *K.B. Fowler* ir *S. B. Boppana*, apie 33–50% NKS pasireiškia per kelis pirmuosius gyvenimo metus [4]. Todėl nustačius įgimtą CMV infekciją, būtina atlikti dažnesnę klausos patikrą, nepaisant normalios klausos naujagimystėje [72]. Besimptominės formos atveju, NKS pasireiškimo mediana yra 44 mėnesiai, tačiau naujagimiams su infekcijos simptomatika, klausa dažniausiai blogėja 11 mėnesių anksčiau, arba būna susilpnėjusi jau gimus. Viena svarbiausių įgimtos CMV infekcijos sukulto NKS ypatybė – progresuojanti, laipsniškai blogėjanti klausa. Besimptominės ir simptominės formos naujagimiams, pažeidimų progresavimo greitis yra vienodas. Tuo tarpu,

naujagimiams su ryškia CMV infekcija, pažeidimai progresuoja iki sunkesnio laipsnio [4]. Regionuose su aukštu CMV serologiniu paplitimu, NKS yra pagrindinė naujagimių komplikacija (10/1000), atsiradusi po kartotinės nėščiųjų CMV infekcijos [73].

1.6.1 CMV klausos pažeidimo mechanizmai

Nemažai autorių aprašo eksperimentinius modelius, remiantis kuriais siekiama suprasti CMV sukeltų vidinės ausies pažeidimų patofiziologiją. Tiriant pelių modelį, *R. D. Bradford* et al. aprašė nervinio impulso perdavimo į CNS sutrikimą, išsivysčiusi dėl pėlių spiralio mazgo (lot. *Ganglion spirale cochleae*) neuronų žūtis [74]. Pelių modeliuose taip pat stebima sraigės labirinto (lot. *Labyrinthus cochlearis*) ir plaukuotųjų ląstelių viruso sukelta citolizė, kuo grindžiamas mechaninių virpesių konvertavimo nerviniais impulsais sutrikimas [75]. Pažeidimus gali sukelti ne tik virusas, bet kartu ir šeimininko imunių komponentų atsakas į sukėlėją. Mimikrija pasižymintis CMV, ekspresuoja makrofagų chemokino MIP-1 α homologą, skatinanti bei palaikanti uždegimą vidinės ausies struktūrose [76, 77].

1.7 CMV infekcijos nustatymas ir prevencija

1.7.1 Nėščiųjų CMV infekcijos diagnostika

Nespecifinė CMV infekcijos simptomatika arba jos nebuvimas, dažnai nesukelia pagrindo atlikti tyrimą. Infekciją bandoma patvirtinti ryškėjant į mononukleozę ar gripą panašioms simptomams (prieš tai paneigus EBV, hepatitus A, B ir C), arba ultragarsinio tyrimo metu aptikus vaisiaus vystymosi patologiją. Visuotinė nėščiųjų patikra dėl CMV nėra rekomenduojama, tiriant didelę nėščiųjų populiaciją didėtų klaidingai teigiamų rezultatų santykio su tikrai teigiamais infekcijos atvejais skirtumas, dėl ko nėščiosioms būtų atliekami nereikalingi papildomi tyrimai [78, 79].

Serologiniai nėščiosios tyrimai

Pirminio ir kartotinio nėščiųjų užsikrėtimo diferencijavimas, naudingas galimų pasekmių prognozės įvertinimui. Tiriant humoralinį organizmo atsaką į patogeną, pavienis M klasės Ig tyrimas yra neinformatyvus ir turi būti vertinamas kontekste su IgG, IgG avidiškumo ir kartais su virusologiniais tyrimais. Remiantis IgG ir avidiškumo rezultatais, sprendžiama kaip seniai susidurta su patogenu (matuojamas IgG susijungimo su antigenu (Ag) stiprumas). Aukštas IgG avidiškumas būdingas prieš daugiau nei 3 mėnesius persirgtai infekcijai, tuo tarpu žemas avidiškumas, siejamas su 3 mėnesių laikotarpyje įvykusi užsikrėtimu. Pirmą susidūrimą su

virusu, kai iki nėštumo moteris neturėjo CMV specifinių Ig (IgM-/IgG-), patvirtina serokonversija. Pasigamina specifiniai IgM bei žemo avidiškumo prieš CMV IE baltymus nukreipti IgG, kurių titras pasiekia maksimumą tik po 2-3 mėnesių nuo infekcijos pradžios. Dėl šių žemo avidiškumo IgG, 80% pirminės infekcijos atvejų, kraujyje daugėja cirkuliuojančios laisvos CMV DNR. IgM titro maksimumas pasiekiamas trijų mėnesių laikotapyje nuo infekcijos pradžios, vėliau jis palaipsniui mažėja [48, 80-82]. Serologinis *kartotinės* infekcijos įvertinimas sudėtingesnis ir tikslaus infekcijos diagnostinio algoritmo šiuo metu nėra. Manoma, endogeninis CMV potipis nesukelia imuninės sistemos stimuliacijos, todėl latentinės formos reaktyvacijai, viremija ir IgG ir IgM titrų didėjimas nebūdingi. Imuninės sistemos stimuliaciją sukelia egzogeniniai CMV potipiai, todėl galimas IgG ir IgM titrų padidėjimas, taip pat ir banguojantis IgG avidiškumas, kurį lemia aukšto avidiškumo endogeniniai CMV ir žemo avidiškumo naujam CMV potipiui IgG derinys [83]. Tačiau serologinio tyrimo specifiškumą lemia šie veiksniai:

1. Persirgus pirmine CMV infekcija, maži IgM titrai gali būti aptinkami iki pusės metų po serokonversijos, todėl nevisada IgM+ nusako apie 3 mėnesių laikotarpyje įvykusią infekciją;
2. IgM titrai gali būti aptinkami ir kartotinės infekcijos metu, užsikrėtus kitu CMV potipiu;
3. Klaidingai teigiami rezultatai dėl kitos virusinės infekcijos metu (pvz., HSV, VZV, EBV) atsiradusio kryžminio Ig M ir G reaktyvumo;
4. Klaidingai teigiami rezultatai dėl nespecifinės imuninės sistemos stimuliacijos (polikloninė Ig reaktyvacija);
5. Klaidingai teigiama išvada apie neseniai įvykusią infekciją: žemo avidiškumo IgG gali būti aptinkami iki 18 savaičių;
6. Tyrimo atlikimo laikas gali iškreipti neigiamą prognostinę vertę (NPV): pirmame trimestre nustatyti aukšto avidiškumo IgG įrodo seniai įvykusią infekciją (NPV, 100%), tuo tarpu po 21 nėštumo savaitės nustatyti vidutinio/aukšto avidiškumo IgG nėra tikslūs pirminės infekcijos markeriai (NPV, 90.9%) [78, 84].

Virusologiniai nėščiosios tyrimai

Virusologiniai nėščiosios kraujo ir šlapimo tyrimai silpnai koreliuoja su CMV infekcijos pradžia, tačiau aptikta CMV DNR esant serologiškai patvirtintai pirminei CMV infekcijai sudaro prielaidą viruso transmisijai [78, 79]. *M. Ziemann et al.* nustatė, jog lango periodu, kai M ir G klasių Ig dar neaptinkami (2-3 savaitės) tik ~25% pirmą kartą CMV užsikrėtusių asmenų plazmoje aptinkama žema CMV viremija (<30 IU/mL). Buvo nustatyta, kad maksimalios viremijos vertės gaunamos greitai po serokonversijos [85]. Todėl mėginiuose neaptikta viremija kaip ir virurija nepaneigia pirminės arba kartotinės infekcijos, nes viruso aptikimas priklauso ne tik nuo infekcijos aktyvumo, bet ir nuo ėminio paėmimo laikotarpio [78,

86]. Panašiai infekcijos kinetiką analizavo ir *G. Gerna et al.* Gauti rezultatai parodė, kad viremijos aptikimo kraujyje mediana yra 85 dienos. Viremija tampa nebeaptinkama kai galutinai susiformuoja aukšto avidiškumo prieš membranos glikoproteinus nukreipti IgG (6 mėnesiai nuo infekcijos pradžios) bei visiškai suyra IgM [52].

1.7.2 Vaisiaus infekcijos prognostiniai žymenys

Prenatalinė vaisiaus CMV infekcijos diagnostika galima taikant neinvazinius bei invazinius tyrimus. Siekiant nustatyti, ar vaisius užsikrėtė CMV būdamas motinos iščiose, invazinių tyrimų, ypač kordocentezės pasirinkimas yra kontroversiškas. Nepaisant to, kad tyrimas įrodytas kaip veiksminga priemonė simptominės/besimptomės infekcijos formų prognozavimui, patvirtinus infekciją, prenataliu laikotarpiu gydymo galimybės yra ribotos.

Neinvaziniai tyrimai

Vaisiaus ultragarso ir magnetinio rezonanso (MRT) tyrimai laikomi papildomais tyrimais, leidžiančiais vizualizuoti galimai viruso pakenktas CNS struktūras. Kombinacijoje su CMV DNR aptikimu vaisiaus vandenyse, abu trečiame trimestre atlikti tyrimai turi 95% jautrumą ir patvirtina CNS pažeidimus. Kai organų anomalijos abejais tyrimais neaptinkamos, prognozė yra gera.

Invaziniai tyrimai

- **Amniocentezė.** Vaisiaus CMV infekcijos diagnozės pagrindas yra CMV DNR aptikimas PGR metodu (TPV, 100%) amniono vandenyse. Ar aptiktas viruso kiekis koreliuoja su infekcijos sunkumu, nėra nustatyta. Virusų aptikimas priklauso nuo naujagimio šlapimo ekskrecijos. Todėl amniocentezė rekomenduojama atlikti po 20 gestacijos savaitės, kai šlapimo organų sistema yra susiformavusi. Be to, siekiant išvengti klaidingai neigiamų rezultatų, ėminys turi būti paimtas mažiausiai 6 savaitės po motinos užsikrėtimo CMV.
- **Kordocentezė.** Vaisiaus kraujyje aptinkami specifiniai ir nespecifiniai CMV žymenys. Nustatyta, kad aukšta viremija atspindi didesnę simptominės formos tikimybę, lyginant su žema viremija. Simptominės formos prognozės nespecifiniai CMV žymenys yra β -2-mikroglobulinas ir trombocitopenija; specifiniai markeriai – vaisiaus anti-CMV IgM+ ir viremija [78, 79, 82, 87].

1.7.3 Postnatalinis įgimtos CMV infekcijos nustatymas

Europos Pediatriinių infekcinių ligų draugijos (*Conference of the European Society of Paediatric Infectious Diseases*) 2015-ųjų metų konferencija buvo pirmoji, kada ekspertų grupės pagal tarptautinę GRADE sistemą įvertino tai, kas yra žinoma apie įgimtos CMV infekcijos diagnozavimo bei gydymo galimybes. Pagrindinis tikslas buvo sudaryti infekcijos diagnostinį bei gydymo konsensusą, remiantis tuo, ką nustatė daug tyrėjų visame pasaulyje. Konferencijos metu buvo pasiektas pilnas konsensusas, jog postnatalinė naujagimio įgimtos CMV infekcijos diagnozė turi remtis šlapimo CMV DNR PGR tyrimu, kurio jautrumas siekia 100%, o specifiskumas –99%. Negana to, infekcijos paneigimui užtenka vieno neigiamo tyrimo rezultato. Šlapimo ėminys turi būti surinktas per 21-ą dieną nuo gimimo, idealiau atveju – per 14-ą dieną. Nustačius CMV DNR buvimą mėginyje, surinktame vėliau nei 21-ą dieną – daroma išvada apie perinataliniu arba postnataliniu laikotarpiu įvykusią naujagimio infekciją. Alternatyvus tyrimas yra seilių CMV DNR PGR, tačiau ėminys turi būti paimtas prieš maitinimą motinos pienu bei patvirtintas šlapimo tyrimu, dėl pasitaikančių klaidingai teigiami rezultatų [5].

Dėl plataus *Guthrie* metodo taikymo visuotinėse naujagimių PMAL programose, sausi kraujo lašai kėlė interesą kaip mėginių alternatyvą daug tyrėjų. Tačiau buvo nustatyta, kad sauso kraujo lašų CMV DNR PGR yra žemo jautrumo (apie 84%) tyrimas ir negali būti taikomas plataus masto naujagimių patikroms. Be to, tyrimo jautrumas priklauso ir nuo taikomos metodikos bei naudojamų reagentų, todėl nemažai studijų parodo ir mažesnę nei 84% metodo jautrumą [5, 88]. Pasiektas konsensusas dėl sauso kraujo lašų panaudojimo tyrimui, kai šlapimo ar seilių tyrimai nebuvo atlikti per 21 dienas nuo gimimo. *L. Wang et al.* pasiūlė, kad *Guthrie* metodo alternatyvą gali naudoti ligoninės, kurių laboratorijose nėra tinkamos įrangos bei reagentų aukštinio standarto metodams [89].

1.7.4 Prevencija

Remiantis *A. Willame et al.* ir *S. Binda et al.* 2015-2016 metų duomenimis, dauguma Europoje gyvenančių nėščiųjų, neįtaria apie CMV infekcijos keliamą pavojų vaisiui/naujagimiui, be to, nėra gerai susipažinusios su infekcijos prevencijos priemonėmis. Visi galimi CMV skiepų variantai šiuo metu yra tik klinikinių tyrimų etape. Nėščiųjų CMV infekcijos prevencijos alternatyvos yra elementarios higienos taisyklės bei artimo kontakto su ikimokyklinio amžiaus vaikais vengimas, ir su jomis turi būti supažindintos tiek serologiškai teigiamos, kiek ir serologiškai neigiamos nėščiosios [54, 90].

2. TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI

2.1 Tyrimo medžiaga

Tyrimas buvo atliekamas nuo 2017-ųjų metų rugsėjo mėn. iki 2018-ųjų metų kovo mėn. VšĮ Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų (VšĮ VUL SK) Laboratorinės medicinos centro (VUL SK LMC) Mikrobiologijos laboratorijoje. Tyrimui naudoti VšĮ VUL SK Medicininės genetikos centro archyve saugomi visuotinei naujagimių patikrai (VNP), dėl paveldimų medžiagų apykaitos ligų (PMAL) naujagimystės periode surinkti ir išdžiovinti sauso kraujo skrituliai (*Guthrie* metodas). Pacientų su neurosensoriniu klausos sutrikimu (NKS) atranką į tyrimą atliko gydytojas-otorinologas.

Tiriamąją imtį sudarė nuo 2000-ųjų iki 2016-ųjų metų gimę 113 tiriamųjų su įgimtu ir anksti įgytu abipusiu NKS, kuriems atlikta kochlearinė implantacija (KI). Visiems pacientams atlikta retrospektyvinė sauso kraujo lašų PGR analizė nustatant CMV DNR. Genetinius bei negenetinius NKS sukėlusius veiksnius patvirtino kiti tyrimai, tačiau šie mėginiai papildomai buvo įvertinti dėl galimos įgimtos CMV infekcijos.

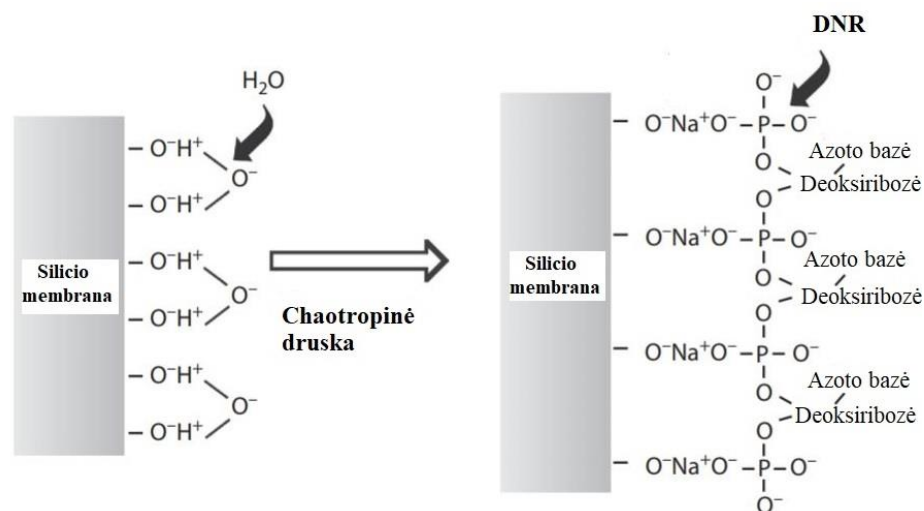
2.2 Metodai

2.2.1 Mėginio paruošimas

Iš *Guthrie* kortelių žirkėmis iškirpti sauso kraujo mėginiai, iki tyrimo laikyti kambario temperatūroje, vienkartinuose steriliuose Eppendorf Safe-Lock 2 ml mėgintuvėliuose. Siekiant išvengti užteršimo tarp skirtingų mėginių iškirpimo naudotos žirkės 30 sek. dezinfekuotos 70°C spiritu.

2.2.2 DNR gryninimas silicio membranų kolonėlių metodu

DNR visuma (genominė, virusinė, mitochondrinė) iš paciento sauso kraujo mėginio buvo gryninama triplikatais, kiekvienam kartui naudojant 5 mm diametro lašo plotą (pilnas lašo skritulio diametras – 10 mm). Gryninimas atliktas naudojant *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (QIAGEN, Vokietija) rinkinį pagal metodiką, pritaikytą sausiems kraujo lašams. Metodas pagrįstas stipria DNR ir hidratuotos silicio membranos saveika, aukštos chaotropinės druskos (suardančios vandenilinius ryšius) koncentracijos sąlygomis (pH<7). Principas pavaizduotas 4-ame paveiksle. Pašalinus ląstelių nuolaužas, baltymus, nukleazes, DNR eliuojama į žemos druskų koncentracijos buferius arba dH₂O (pH>7) [91, 92].



4 pav. DNR ir silicio membranos sąveika chaotropinės druskos tirpalo sąlygomis. Adaptuota iš [92]

1. Ląstelių lizavimas

Atsižvelgiant į mėginio specifiką, reagentų gamintojas rekomenduoja atlikti dvigubą lizės etapą.

- Paruošti sauso kraujo lašai buvo užpilami ląsteles suardančiu lizės buferiu (QIAgen ATL), kuris papildomai ardo ir nukleazes. Mėginiai turėjo tolygiai permirkti, todėl papildomai buvo purtomi purtykle. Inkubuota 10 min. 85 °C temperatūroje;
- Po inkubacijos ant mėgintuvėlių sienelių susidaręs kondensatas nucentrifuguotas;
- Su tikslu iš mėginio pašalinti batymus, buvo įlašinama iš *Tritirachium album* izoliuota proteinazė (QIAgen, Proteinazė K). Mėginys gerai supurtytas ir inkubuotas 1 val., 56 °C temperatūroje;
- Po inkubacijos ant mėgintuvėlių sienelių susidaręs kondensatas nucentrifuguotas;
- Įlašintas sekantis lizės buferis (QIAgen, AL), po kurio buvo pridedama vidinė kontrolė (QIAgen, CMV IC). Ji būtina DNR gryninimo procedūros ir PGR inhibicijos atvejo kontrolei. Mėginys buvo gerai supurtomas ir inkubuojamas 10 min., 70 °C temperatūroje.
- Po inkubacijos ant mėgintuvėlių sienelių susidaręs kondensatas nucentrifuguotas.

2. DNR surišimo sąlygų optimizavimas

- Įlašintas 96-100% etanolis. Mėginys buvo gerai supurtomas, nucentrifuguojant pašalinti ant mėgintuvėlio sienelių esantys lašai.

3. DNR surišimas su silicio membrana

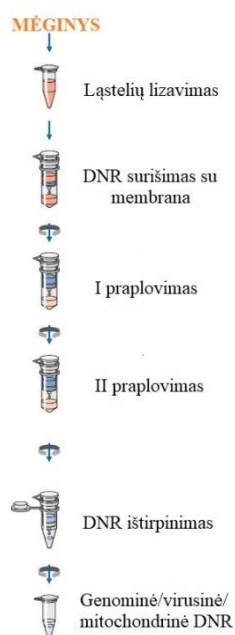
- Kolonėlė su silicio membrana buvo įdedama į centrifugavimo (surenkamąjį) mėgintuvėlį ir į ją supilamas visas mėginys. Centrifuguota 1 min. 8000 aps./min. greičiu;
- Kolonėlė buvo įdedama į naują centrifugavimo mėgintuvėlį.

4. Mėginio praplovimas

- *I praplovimas ir baltymų denatūravimas:* neliečiant kolonėlės kraštų, buvo įlašinamas pirmasis plovimo buferis (QIAgen, AW1). Centrifuguota 1 min. 8000 aps./min. greičiu. Po to kolonėlė buvo įdedama į naują centrifugavimo mėgintuvėlį;
- *II praplovimas ir druskų pašalinimas:* neliečiant kolonėlės kraštų, įlašintas antrasis plovimo buferis (QIAgen, AW2) ir centrifuguota 1 min. 14000 aps./min. greičiu. Kolonėlė buvo įdedama į naują centrifugavimo mėgintuvėlį;
- *Kolonėlės nusausinimas pašalinant reagentų likučius:* tuščia kolonėlė buvo centrifuguojama 1min. 14000 aps./min.

5. Švarios DNR ištirpinimas

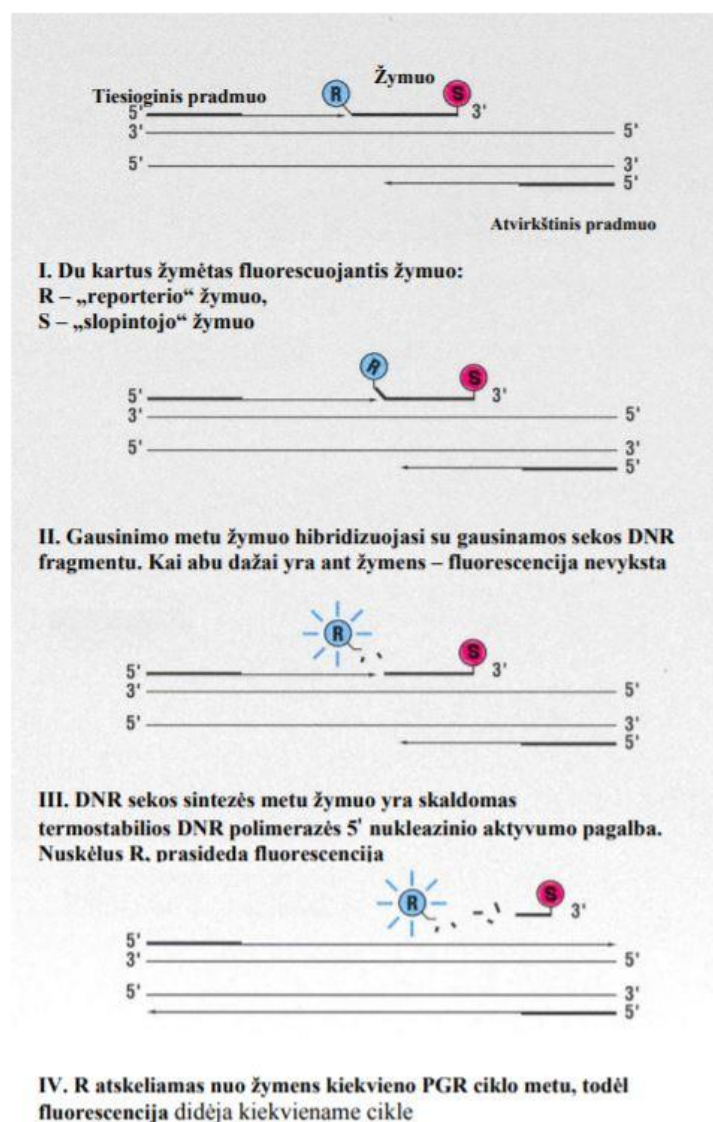
- Kolonėlė buvo įdedama į naują 1,5 ml talpos mėgintuvėlį DNR saugojimui;
- Pipete ant membranos buvo užpilamas eliucijos buferis (QIAgen, AE), inkubuojama 1 min., kambario temperatūroje;
- Membranoje surišta DNR buvo ištirpinta centrifuguojant 1 minutę 8000 aps./min. greičiu. Išgryninta DNR saugota -20 °C temperatūroje.



5 pav. DNR gryninimas silicio membranos (kolonėlių) metodu. Adaptuota iš [93]

2.2.3 Tikro laiko polimerazės grandininė reakcija CMV aptikimui mėginyje

Tikro laiko polimerazės grandininė reakcija (TL-PGR) yra fermentinis, specifinės DNR sekos ir kopijinės DNR (kDNR) fragmentų, realiu laiku stebimas gausinimas *in vitro*. Žmogaus CMV viruso aptikimui mėginyje, naudotas *artus CMV RG PCR Kit* (QIAgen) reagentų rinkinys, kurio specifinis pradmenų taikinytis –105 bp CMV genas, atsakingas už ankstyvąją viruso baltymų raišką (angl., *major immediate early gene*, MIE). CMV MIE geno aptikimui naudota du kartus žymėtų oligonukleotidinių hidrolizės žymenų technologija, pagrįsta termostabilios DNR polimerazės 5'-3' egzozonukleaziniu aktyvumu. Naudotų reagentų hidrolizės žymens tipas nėra atskleidžiamas, tačiau tai gali būti *TaqMAN*, *MGB-TaqMan*, *Snake* ir kitos aptikimo sistemos. Hidrolizės žymenų veikimo principas pavaizduotas 6-ame paveiksle [94, 95].



6 pav. TL- PGR nustatymo sistema, naudojant hidrolizės žymenų technologiją. Pagal [94]

Denatūravus matricinę DNR, prie abiejų atskirtų grandinių komplementarumo principu jungiasi specifinės pradmenų poros (tiesioginis ir atvirkštinis pradmuo) ir

oligonukleotidiniai žymenys. Fluorescencinis žymuo, vadinamas reporteriu (angl., *reporter*, R), prijungtas prie žymens 5' galo, o kitas žymuo, vadinamas slopintoju (angl., *quencher*, Q) ir prijungtas prie žymens 3' galo. Kol reporteris ir slopintojas yra skirtinguose žymens pusėse, arba jei žymuo yra neprisijungęs prie specifinio DNR fragmento, fluorescencija nevyksta. DNR polimerazė grandinės pratęsimą pradeda nuo pradmens 3' galo ir pasiekus žymenį – atskelia greta slopiklio esantį reporterį. Nuo slopiklio atsiskyres reporteris skleidžia fluorescentinį signalą, kurio intensyvumas proporcingas pagausinto fragmento kiekiui. Skleidžiamo fluorescencijos signalo stiprumas didėja proporcingai eksponentiškai didejančiam fragmentų kiekiui [94, 96, 97].

PGR reakcijos inhibicijos kontrolei, reagentų rinkinyje naudojami kontroliniai pradmenys bei žymuo, specifiskai besijungiantys prie DNR gryninimo metu įdėtos vidinės kontrolės (angl., *internal control*, IC). Fluorescencijos signalas patvirtina įvykusią amplifikaciją, tuo tarpu žymenims neprisijungus prie komplementaraus fragmento, signalas nefiksuojamas. Tokiu atveju, įtariama inhibicija arba CMV IC nebuvimas mėginyje, todėl mėginį rekomenduojama kartoti nuo DNR išskirimo etapo.

2.2.3.1 Reakcijos mišinio paruošimas

PGR reakcijos mišinys buvo ruošiamas laminarinėje spintoje, steriliomis sąlygomis. Kadangi tiriamųjų DNR buvo išskirta triplikatais, visi 3 mėginiai TL-PGR reakcijai paruošti atskirai.

- Prieš pradėdant ruošti reakcijos mišinį, visi reagentai bei išskirta DNR buvo atšildyti kambario temperatūroje ir vėliau švelniai supurtyti bei trumpai nucentrifuguoti;
- Mišinys buvo ruošiamas steriliame mėgintuvėlyje. Reikalingi CMV RG Master ir CMV Mg-Sol kiekiai buvo apskaičiuoti pagal planuojamų reakcijų skaičių. Mišinio komponentų kiekiai vienam mėginiui pateikti 3-oje lentelėje:

3 lentelė. TL-PGR mišinio komponentų kiekiai vienam mėginiui

Reagentas	Reagento tūris vienam mėginiui, μ l
CMV RG Master (polimerazė, deoksinukleotidtrifosfatai, oligonukleotidiniai pradmenys, buferis)	25 μ l
CMV Mg-Sol (Mg^{2+} tirpalas)	5 μ l
↓ Matricinė DNR 20 μ l	
↓ Bendras reakcijos tūris 50 μ l	

- Mišinys išpilstytas po 30 µl į 0,1 ml PGR mikromėgintuvėlius. Į kiekvieną mikromėgintuvėlį buvo įdedama po 20 µl DNR. Siekiant pašalinti galimai susidariusius oro burbuliukus bei lašus nuo mėgintuvėlio paviršiaus, mėgintuvėliai buvo lengvai nupurtomi.
- Mėgintuvėliai buvo įdedami į *The Rotor-Gene Q* (QIAgen) TL-PGR termociklerį, kur reakcija buvo vykdoma 4-oje lentelėje nurodytomis sąlygomis.

4 lentelė. TL-PGR vykdymo sąlygos

Tempertūra, °C	Trukmė, s	Ciklų skaičius	Funkcija
95	600	1 ciklas	Karšto starto (<i>angl.</i> hotstart) polimerazės aktyvacija
95	15	„Touchdown“ PGR, 10 ciklų Pradmenų ir zondų prijungimo temperatūra žeminama po 1 °C	DNR denatūravimas
65	30		Pradmenų ir zondų prijungimas
72	20		Pradmenų pratęsimas
95	15	35 ciklai	DNR denatūravimas
56	30		Pradmenų ir zondų prijungimas
74	20		Pradmenų pratęsimas
4		∞	Laikymas

2.2.3.2 Kokybinė duomenų analizė

TL-PGR reakcijos pabaigoje gauti duomenys buvo analizuojami kompiuterine *Rotor-Gene Q Series Software* programa, kuri atvaizduoja amplifikacijos kreives, sudarytas pagal fluorescencijos intensyvumo priklausomybę nuo PGR ciklų skaičiaus. Amplifikacijos kreivė atvaizduoja tris reakcijos fazes:

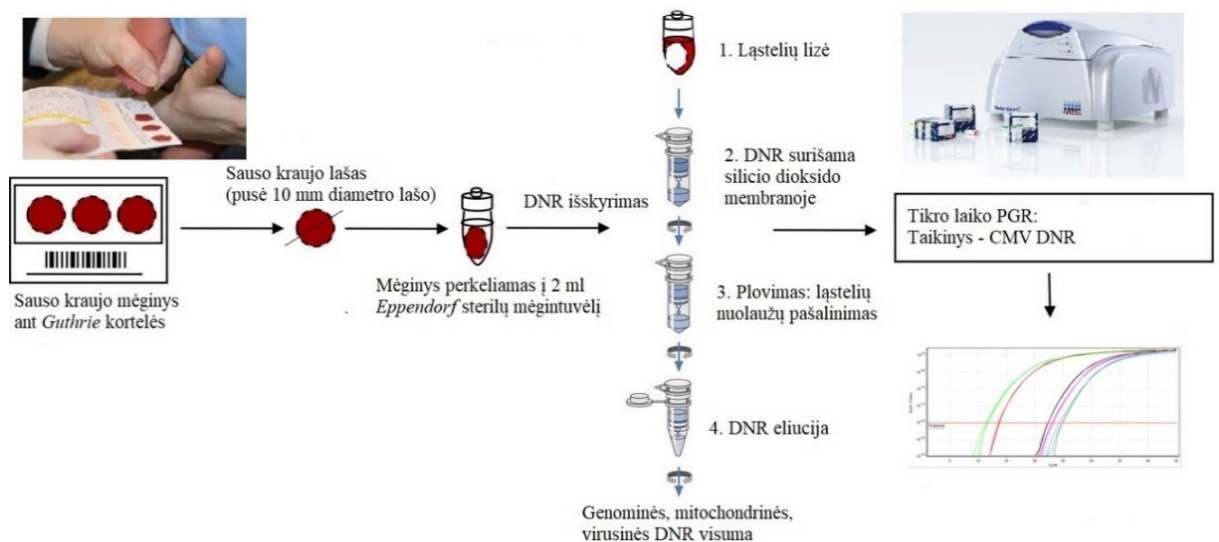
1. Bazinė („Lag“) fazė: fluorescencijos signalas labai silpnas arba nefiksuojamas dėl mažo PGR produkto kiekio;
2. Eksponentinė fazė: eksponentiškai augantis signalo stiprumas, dėl PGR produktų dvigubėjimo kiekviename cikle;
3. „Plato“ fazė: pasiekama, kai reakcijos mišinyje išnaudojami PGR komponentai [96, 97].

CMV MIE ir CMV IC žymenų fluoroforų fluorescencijos signalai registruojami skirtinguose bangos ilgiuose, todėl vertinamas buvo atliekamas atskiruose programos kanaluose, pateiktose 5-oje lentelėje. Kokybinė mėginių analizė (CMV aptikta/neaptikta) atlikta vertinant slenkstinius ciklus (Ct). Mėginiai buvo vertinami teigiamais, kai fluorescencija viršija 0,03

foninį lygį (angl. *threshold cycle*). Reakcija buvo laikoma sėkminga, jei mėginio CMV IC fluorescencijos signalas viršijo foninį lygį $Ct=27\pm 3$ slenkstiniuose cikluose. Mėginį laikėme galutinai teigiamu, jei iš 3 tiriamojo mėginių, viruso DNR aptikta bent 2 atskiruose mėginiuose.

5 lentelė. *artus CMV RG PCR Kit* (QIAGEN) PGR reagentų žymenų fluoroforų charakteristika ir aptikimo kanalai

Fluoroforas	Sužadinimo bangos ilgis	Detekcijos bangos ilgis	Fluorescencijos aptikimo kanalas <i>Rotor-Gene Q Series Software</i> programoje	Fluorescencijos kilmė
A.FAM™	470 nm	510 nm	„Cycling green“	CMV MIE
A.JOE™	530 nm	555 nm	“Cycling yellow”	CMV IC



7 pav. Apibendrinta metodikos schema

2.2.4 Papildomi tyrime naudoti duomenys ir statistinė analizė

Pacientų ligos istorijos duomenų panaudojimas patvirtintas bioetikos leidimu Nr.158200-15-786-298. Vertinant tiriamųjų KS diagnozės amžių buvo remtasi Jungtinių Amerikos Valstijų (JAV) Jungtinio kūdikių klausos komiteto rekomenduojacijomis (diagnozė turi būti alikta iki 3 mėn. amžiaus) [98], bei KI rekomendacijomis (operaciją rekomenduojama atlikti iki 2 metų amžiaus) [99]. Darbe atliktas pacientų klausos gerinimo implantais efektyvumo palyginimas tarp skirtingos NKS etiologinių grupių remiasi KAK ir KSS skalėmis, pateiktomis 1 priede.

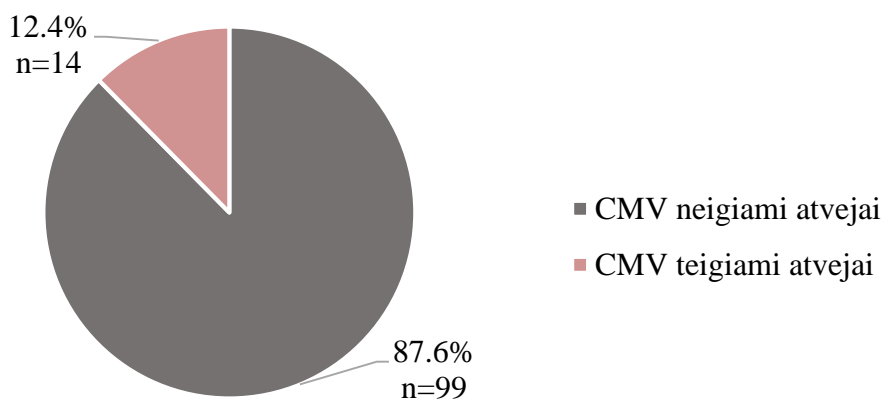
Statistinė analizė atlikta naudojant Excel 2016 programą ir R paketą. Kiekybinių duomenų pasiskirstymas įvertintas naudojantis Šapiro-Vilko testu. Kadangi šių duomenų pasiskirstymas neatitiko normalumo dėsnio, duomenys aprašyti minimalia, maksimalia reikšmėmis bei mediana. Norint nustatyti ne pagal normalumo dėsnius pasiskirsčiusių nepriklausomų grupių medianų skirtumų statistinį reikšmingumą, naudotas Vilkoksono testas. Rezultatai laikyti reikšmingais, jei $p < 0,05$.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

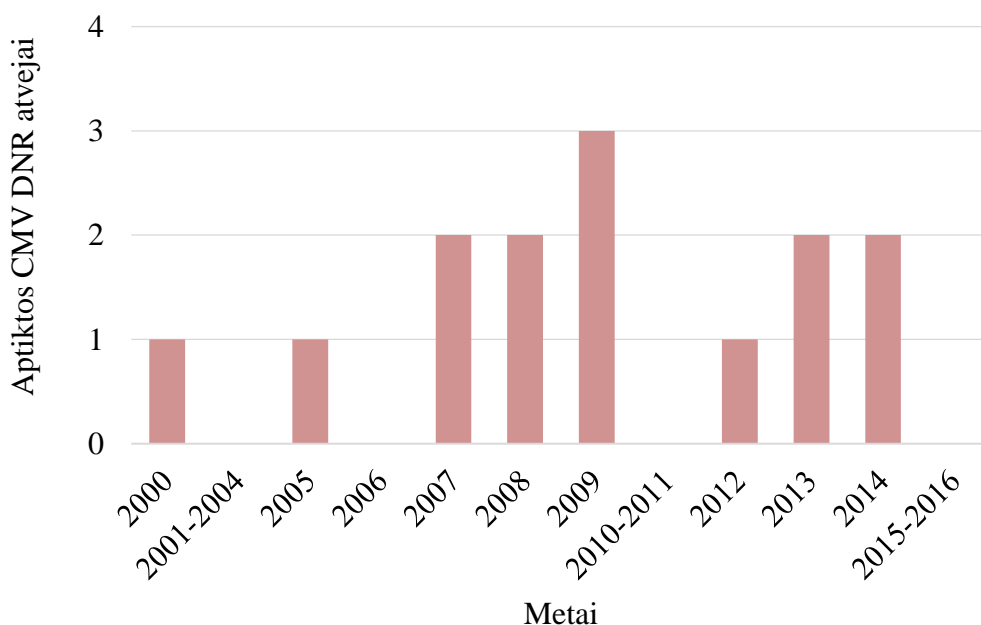
3.1 Rezultatai

3.1.1 Įgimtos CMV infekcijos ir ikikalbinio NKS priežasčių dažnis tirtoje imtyje

Atlikus 113 mėginių TR-PGR tyrimą, CMV DNR nustatyta 14 (12,4%) tiriamųjų, likusiems 99 (87,6%) tiriamiesiems CMV DNR aptikta nebuvo. Daugiausiai CMV DNR nustatyta 2009-aisiais gimusių tiriamųjų tarpe (8 pav., 9 pav.).

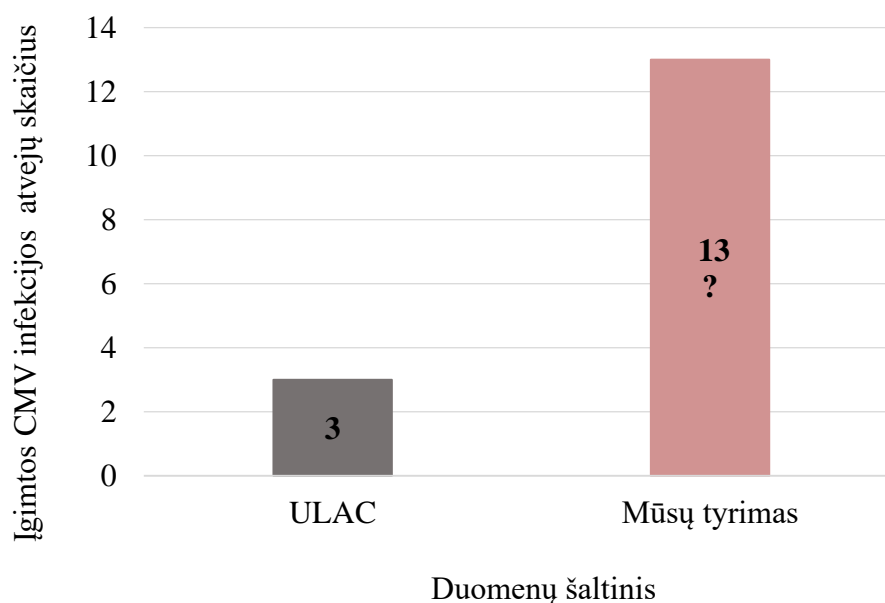


8 pav. CMV teigiamų atvejų dažnis tirtoje imtyje



9 pav. CMV teigiamų atvejų dažnis priklausomai nuo tiriamųjų gimimo metų

Laikotarpiu nuo 2003 iki 20016 metų*, ULAC ataskaitose apie įgimtą infekciją pranešta 3 kartus, tuo tarpu tyrimo metu sauso kraujo mėginiuose CMV DNR nustatyta 13 tiriamųjų.



10 pav. Galimos įgimtos CMV infekcijos atvejų skaičius lyginant su ULAC duomenimis, nustatytas 2003-2016 m.

Pagal NKS sukėlusius veiksnius iki tyrimo tiriamieji buvo suskirstyti į penkias grupes (6 lentelė).

- *Pirmąją grupę* sudarė tiriamieji, kuriems pasireiškė sindrominis arba nesindrominis (GJB2 ir kitos mutacijos) NKS;
- Į *antrąją grupę* buvo įtraukti tiriamieji, iš kurių anamnezės žinoma apie perinatalinę patologiją/ infekciją arba postnatalinę infekciją bei genetinių mutacijų nebuvimą;
- *Trečiosios grupės* tiriamųjų NKS priežastys nebuvo aiškios, jiems paneigtos genetinės mutacijos, perinatalinė patologija/ infekcija arba postnatalinė infekcija;
- *Ketvirtąją grupę* sudarė tiriamieji, kurie naujagimystėje turėjo nustatytą įgimtos CMV infekcijos diagnozę;
- *Penktąją grupę* sudarė tiriamieji, kuriems neatlikta genetinė analizė, o perinatalinė patologija/ infekcija arba postnatalinė infekcija nėra įrodytos.

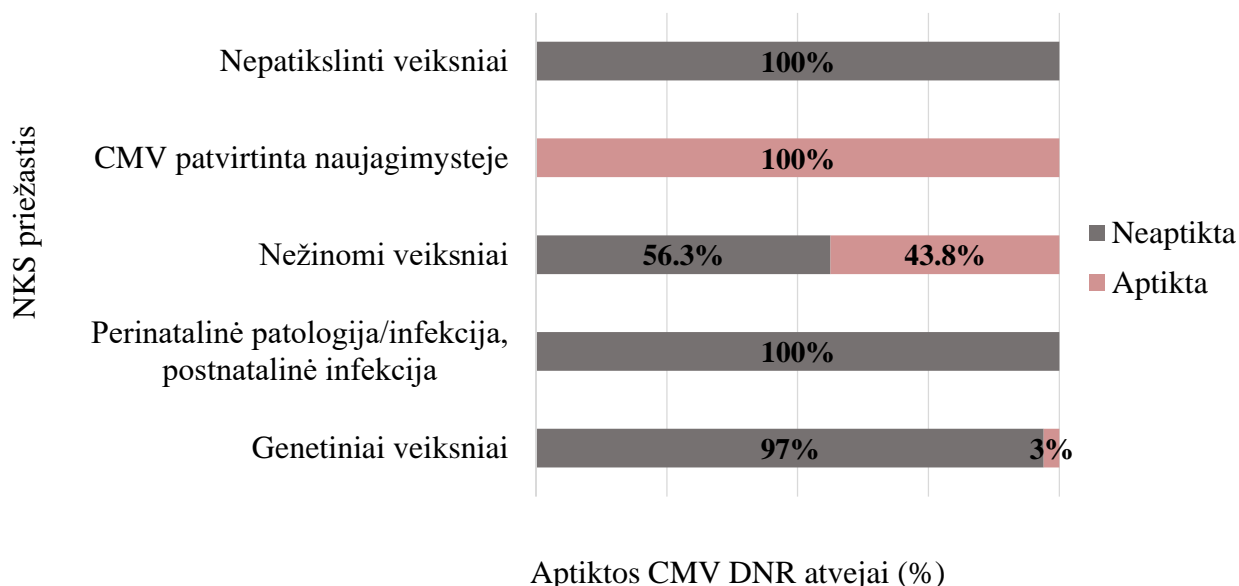
CMV DNR nustatyta 2 tiriamiesiems (3%), kurių kurtumo priežastis yra genetinės mutacijos (n=67). Tiriamiesiems, kuriems klausos pažeidimus lėmė perinatalinė patologija/infekcija arba postnatalinė infekcija (n=16), CMV DNR sauso kraujo lašo mėginiuose

* Palyginimo laikotarpis pasirinktas atsižvelgiant į nuo 2003 m. prieinamas ULAC sergamumo užkrečiamomis ligomis metines ataskaitas, todėl vienas CMV teigiamas atvejis (2000 m.) į palyginimo laikotarpį nepateko

neaptikta. Viruso DNR neaptikta ir 9 tiriamiesiems, kurių sutrikimo etiologija yra nepatikslinkta. Grupėje su nežinoma klausos sutrikimo etiologija (n=16), virusas nustatytas 7 iš 16 (43,8%) atvejų. Tiriamiesiems su naujagimystėje žinoma įgimta/prenataline CMV infekcija, mūsų retrospektyvinio tyrimo metu sauso kraujo lašuose CMV DNR buvo taip pat aptikta (6 lentelė, 11 pav.).

6 lentelė. Aptikta CMV DNR skirtingose NKS etiologinėse grupėse

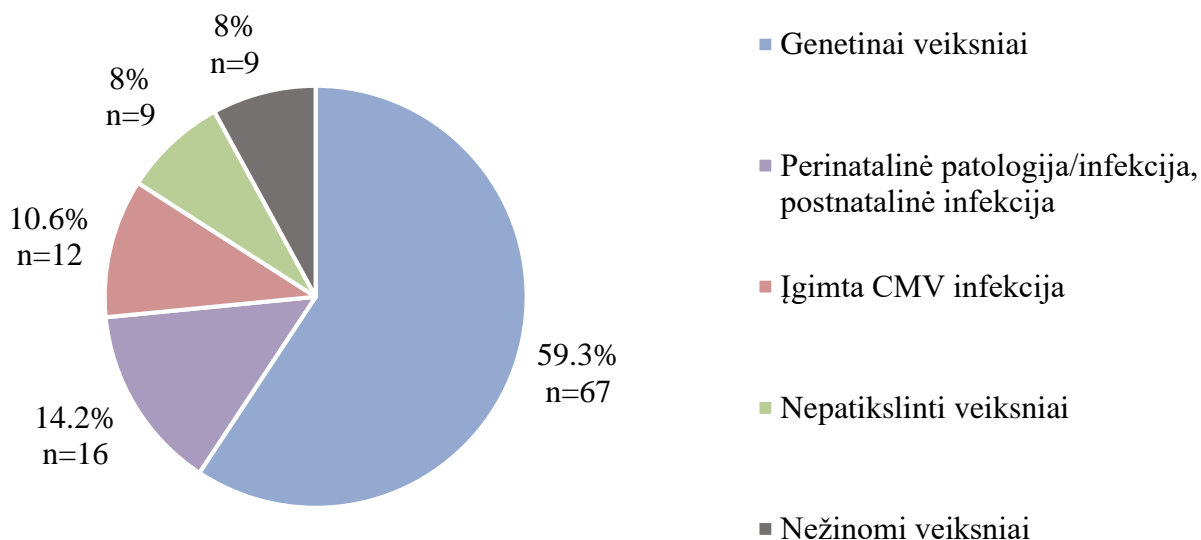
Grupės pagal NKS sukėlusius veiksnius (iki tyrimo)	n, (%)	Genetinė analizė	CMV teigiami atvejai n, (%)
1. Genetiniai veiksniai	67/113 (59,3%)	Atlikta	2/67 (3%)
2. Perinatalinė patologija/infekcija, postnatalinė infekcija	16/113 (14,6%)	Atlikta	-
3. Nežinomi veiksniai	16/113 (14,6%)	Atlikta	7/16 (43,8%)
4. Įgimta CMV infekcija (patvirtinta naujagimystėje)	5/113 (4,4%)	Atlikta	5/5 (100%)
5. Nepatikslinkti veiksniai	9/113 (7,1%)	Neatlikta	-



11 pav. Aptiktos CMV DNR atvejai skirtingos NKS etiologinėse grupėse

Atlikus CMV DNR nustatymą sauso kraujo lašuose, NKS atvejų priežastys buvo patikslinktos (7 lentelė) ir ketvirta grupė pasipildė 7-iais naujais teigiamais CMV atvejais iš trečios grupės (vietoje pradžioje buvusių 5-ių patvirtintų naujagimystėje). Dažniausia NKS priežastis – genetinės mutacijos (67 atvejai iš 113), tuo tarpu perinatalinės patologijos/infekcijos bei

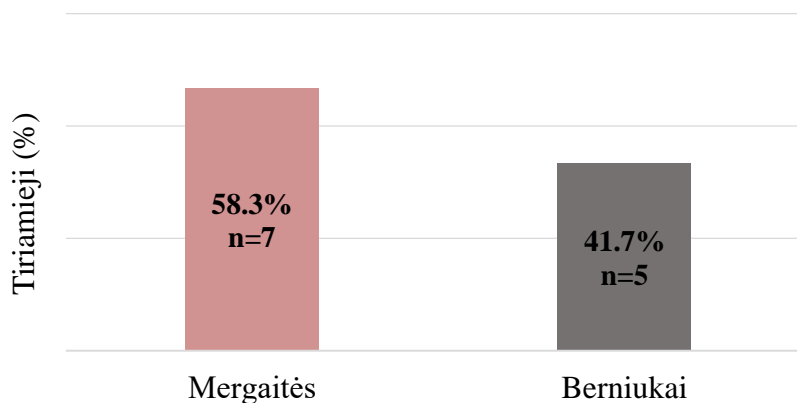
postnatalinės infekcijos lėmė 16 iš 113 (14,2%) negalios atvejų. Trečia pagal dažnumą, tikėtina kaip pirminė NKS priežastis – įgimta CMV infekcija. Šią grupę sudarė 12 atvejų iš 113 (10,6%), į ją neįtraukėme 2 genų mutacijas ir CMV infekciją turėjusius tiriamuosius. Nežinomos priežastys sudarė 9 atvejus (8%), tiek pat tiriamųjų NKS etiologija išliko iki galo nepatikslinkta (7 lentelė, 12 pav.).



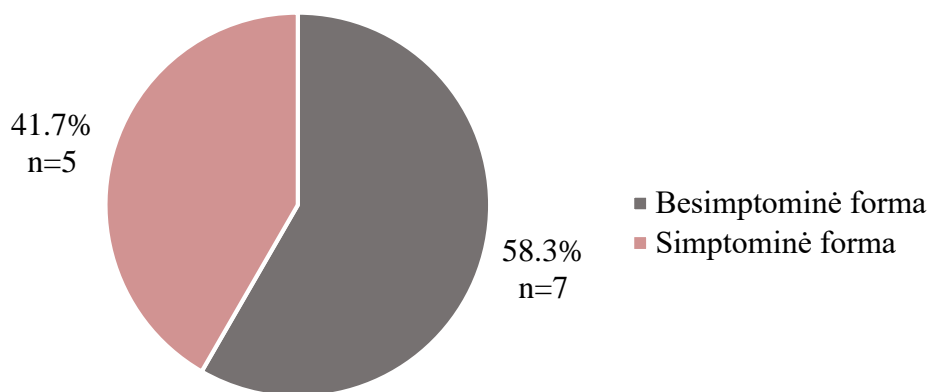
12 pav. NKS priežasčių dažnis tiriamojoje imtyje po atlikto CMV DNR nustatymo

3.1.2 Tiriamųjų grupės, kuriai įgimta/prenatalinė CMV infekcija yra tikėtina ikikalbinio NKS priežastis, charakteristika

Tiriamųjų grupę sudarė 7 (58,3%) mergaitės bei 5 (42,7%) berniukai (13 pav.). Daugiau nei pusei tiriamųjų (58,3%) prenatalinei CMV infekcijai būdingi simptomai naujagimystėje nepasireiškė, likę 42,7% turėjo įgimtai infekcijai būdingus požymius (14 pav.).

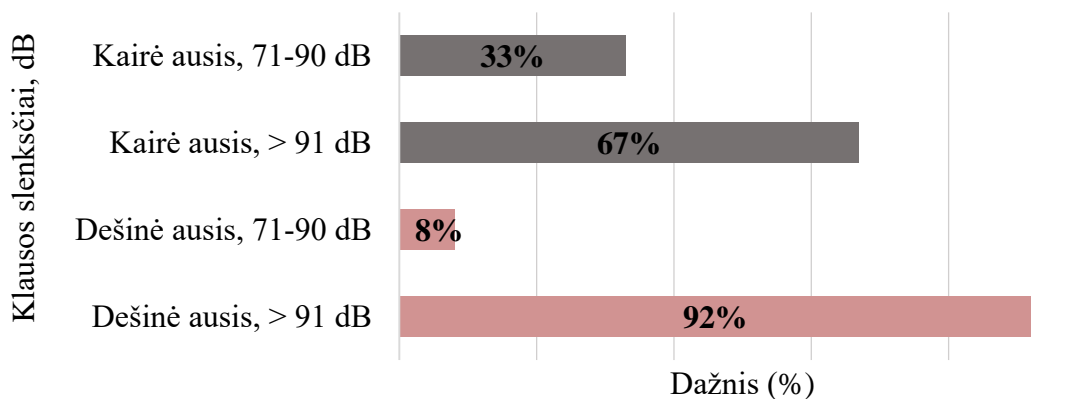


13 pav. Tiriamųjų pasiskirstymas pagal lytį



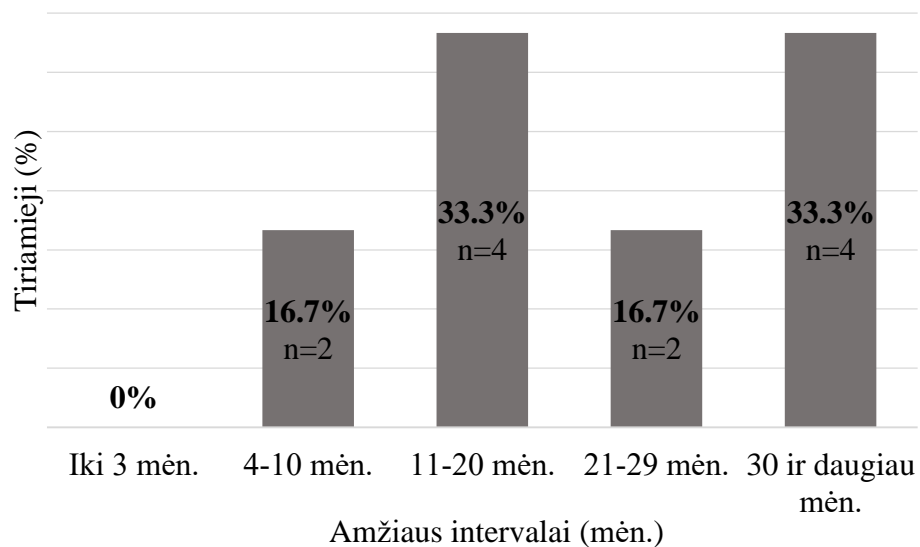
14 pav. Įgimtos CMV infekcijos formos tiriamojoje grupėje

Tiriamiesiems iki KI pasireiškė dvipusis (nuo sunkaus iki labai sunkaus laipsnio), KSSKP tyrimu patvirtintas, klausos sutrikimas. Kairiųjų ausų klausos slenksčiai 67% atvejų buvo aukštesni nei 91 dB, dešinioms ausims šis slenkstis buvo dažnesnis ir nustatytas 92% atvejų (15 pav).



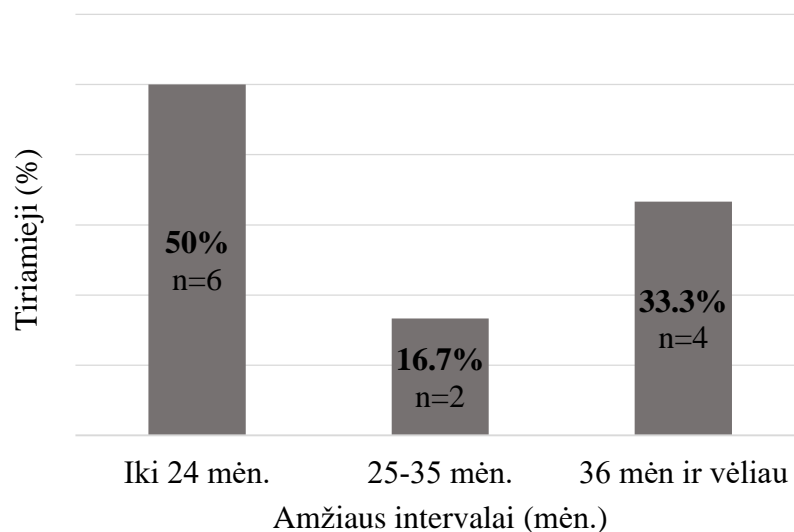
15 pav. KSSKP tyrimu nustatyti klausos slenksčiai iki KI

Ikikalbinio NKS diagnozė vienodai dažnai nustatyta tiek 11-20, tiek 30 mėnesių ir vyresnio amžiaus tiriamiesiems. Rečiausiai klausos negalia nustatyta iki 10 mėn. ir intervale nuo 21 iki 29 mėn. amžiaus (16 pav). Klausos negalia diagnozuota statistiškai reikšmingai vėliau, lyginant su naujagimių kurtumo diagnozės rekomendacijomis, $p = 0,0002$.



16 pav. Amžius, kada diagnozuotas NKS

Dažniausiai KI atlikta iki 24 mėnesio amžiaus (50%), rečiausiai – 25-35 mėnesių amžiuje (16,7%), 33,3% atvejų KI atlikta 36 mėnesių amžiuje ir vėliau. Tiriamiesiems, kuriems įgimta CMV infekcija yra tikėtina NKS priežastis, amžius kada buvo atlikta KI statistiškai reikšmingai nuo rekomendacijų nesiskyrė (17 pav.).



17 pav. Amžius kada atlikta KI

3.1.3 Tiriamųjų grupių su skirtinga NKS etiologija amžiaus – kada nustatyta kurtumo diagnozė ir atlikta KI, palyginimas

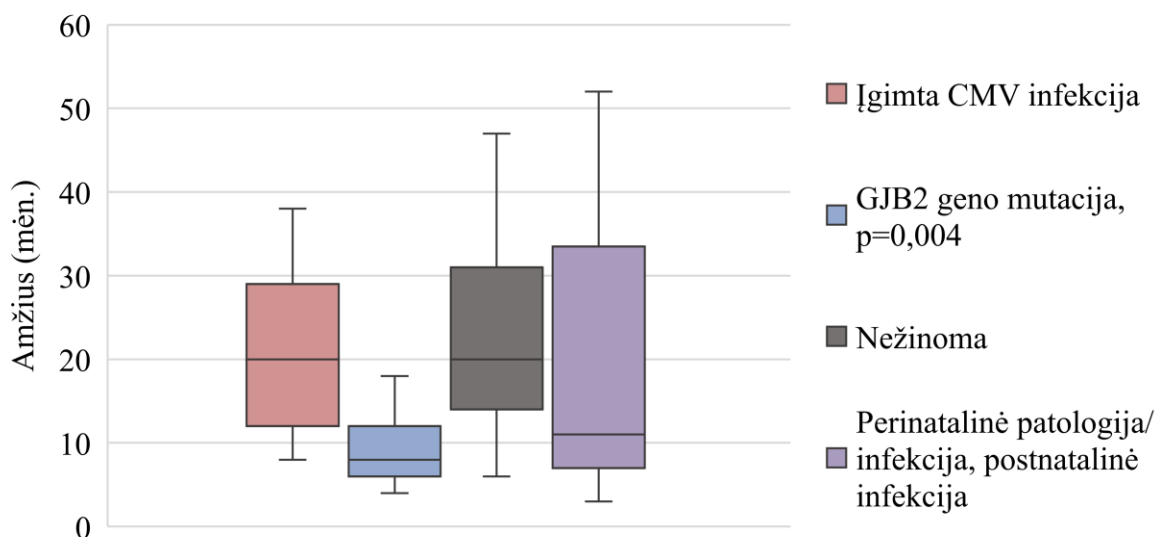
Į palyginimą buvo įtrauktos pirma, antra, trečia bei ketvirta grupės. Statistinis reikšmingumas apskaičiuotas lyginant kiekvieną grupę su ketvirtąja grupe. Siekiant palyginimo tikslumo grupėse stebimos išskirtys į analizę neįtrauktos. Grupė su paveldimu klausos sutrikimu susiaurinta iki tiriamųjų, kuriems nustatyta dažniausia izoliuoto NKS priežastis – GJB2 geno

mutacija bei turinčių kada nustatyta kurtumo diagnozė, kada atlikta KI bei KAK, KSS kategorijų duomenis (n=26).

Analizuojant tiriamųjų amžių, kada buvo nustatyta kurtumo diagnozė, galimos įgimtos/prenatalinės CMV infekcijos sukelti neurosensoriniai klausos pažeidimai, diagnozuoti statistiškai reikšmingai vėliau, nei izoliuoti GJB2 geno mutacijos sukelti klausos pokyčiai ($p = 0,004$). Antros bei trečios grupių amžiaus medianos, kada atlikta sutrikimo diagnozė, nuo kevirtos grupės statistiškai reikšmingai nesiskyrė ($p=0,377$; $p=0,879$) (7 lentelė, 18 pav.).

7 lentelė. Kurtumo diagnozės amžius tarp skirtingų NKS etiologinių grupių

Grupės pagal NKS priežastis	n	Amžius, mėn.			
		Min.	Mediana	Maks.	p reikšmė
1. GJB2 geno mutacija	26	4	8	37	p=0,004
2. Perinatalinė patologija/infekcija, postnatalinė infekcija	16	3	11	52	p=0,377
3. Nežinomi veiksniai	9	6	20	47	p=0,879
4. Įgimta CMV infekcija	12	8	20	38	-



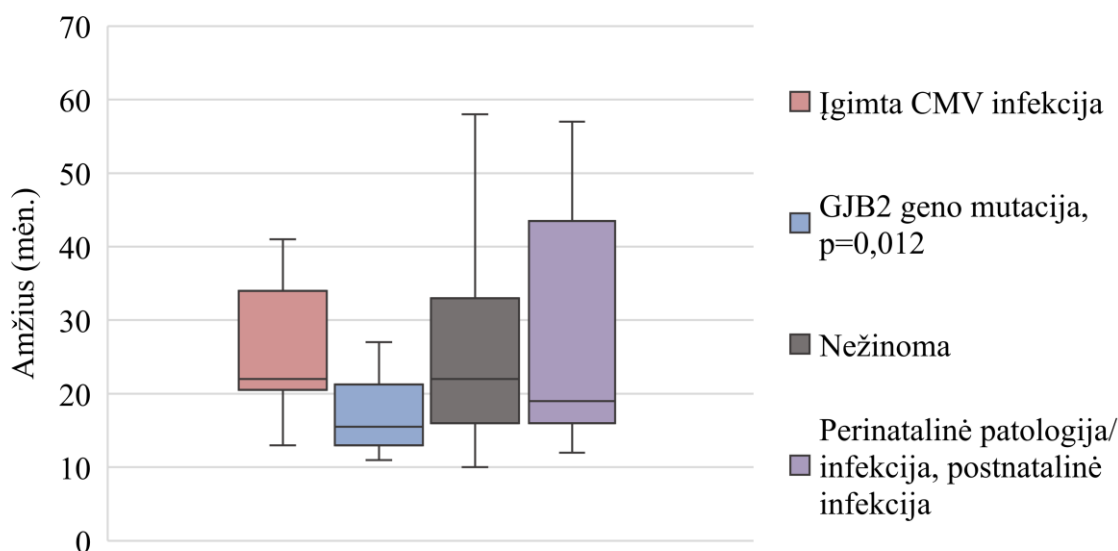
18 pav. Amžius, kada diagnozuotas kurtumas tarp skirtingų NKS etiologinių grupių

Tiriamiesiems su galimai įgimtos/perinatalinės CMV infekcijos sukeltais neurosensoriniais klausos pažeidimais, KI atlikta statistiškai reikšmingai vėliau nei tiriamiesiems su GJB2 geno mutacijos sukeltu izoliuotu klausos sutrikimu ($p = 0,012$). Tuo tarpu antros bei trečios grupių amžiaus medianos, kada atlikta klausos rehabilitacija kochleariniais implantais,

lyginant su kitvirta grupe, statistiškai reikšmingai nesiskyrė ($p=0,55$; $p=0,675$) (8 lentelė, 19 pav.).

8 lentelė. Amžius, kada atlikta KI tarp skirtingų NKS etiologinių grupių

NKS priežastis	N	Amžius, mėn.			
		Min.	Mediana	Maks.	P reikšmė
1. GJB2 geno mutacija	26	11	15,5	74	P=0,012
2. Perinatalinė patologija/infekcija, postnatalinė infekcija	16	12	19	57	P=0,55
3. Nežinomi veiksniai	9	10	22	58	P=0,675
4. Įgimta CMV infekcija	12	13	22	78	-

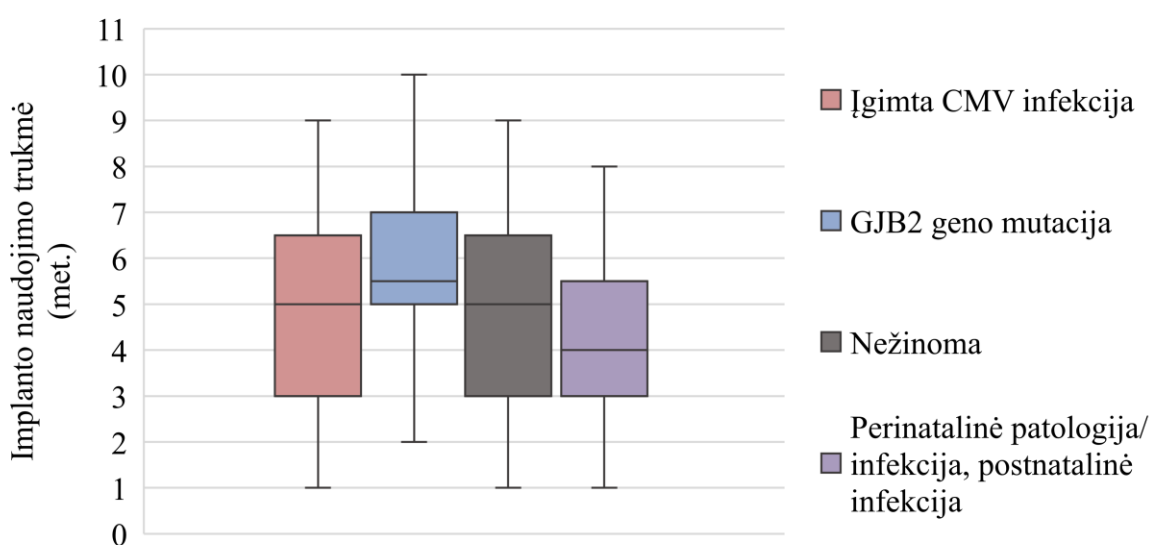


19 pav. Amžius, kada atlikta KI tarp skirtingų NKS etiologinių grupių

Pagal kochlearinio implanto naudojimo laikotarpį, ketvirtos grupės kochlearinio implanto naudojimo trukmės mediana statistiškai reikšmingai su kitų NKS etiologinių grupių medianomis nesiskyrė ($p=0,427$; $p=0,373$; $p=0,91$) (9 lentelė, 20 pav.).

9 lentelė. Kochlearinių implantų naudojimo trukmė tarp skirtingų NKS etiologinių grupių

NKS priežastis	N	Kochlearinio implanto naudojimo trukmė, metais			
		Min.	Mediana	Maks.	p reikšmė
GJB2 geno mutacija	26	1	5,5	11	p= 0,373
Perinatalinė patologija/infekcija, postnatalinė infekcija	16	1	4	8	p=0,427
Nežinomi veiksniai	9	1	5	9	p=0,91
Įgimta CMV infekcija	12	1	5	9	-



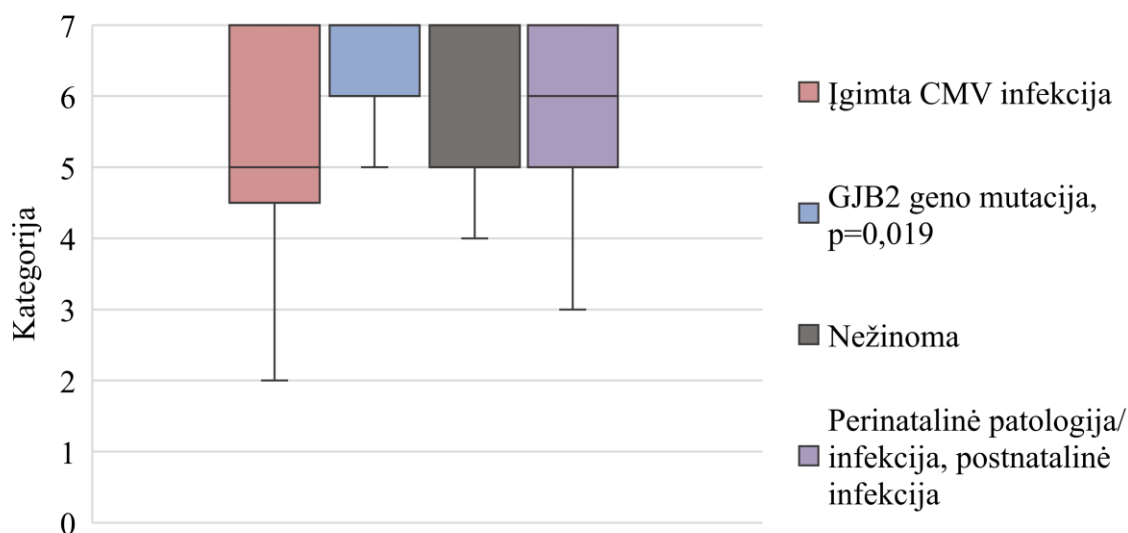
20 pav. Kochlearinių implantų naudojimo trukmė tarp skirtingų NKS etiologinių grupių

3.1.4 Tiriamųjų grupių su skirtinga NKS etiologija, KI efektyvumo palyginimas

Siekiant suprasti, ar KI yra vienodai efektyvi skirtingos etiologijos ikikalbinio neurosensorinio sutrikimo grupėse, poimplantaciniai kalbos/garsų suvokimo įgūdžiai palyginti remiantis pagal KAK skalę (0-7) nustatytais kategorijomis. Ketvirtos grupės KAK kategorijų mediana, lyginant pirmąją grupę yra statistiškai reikšmingai žemesnė ($p=0,019$). Ketvirtos grupės skirtumas su antros bei trečios grupių kategorijų medianomis yra statistiškai nereikšmingas ($p=0,513$; $p=0,75$) (10 lentelė, 21 pav.).

10 lentelė. Girdėjimo įvertinimas po KI, remiantis pagal KAK skalę nustatytais kategorijomis tarp skirtingų NKS etiologinių grupių

NKS priežastis	N	Kategorija (nustatyta pagal KAK skalę)			
		<i>Min.</i>	<i>Mediana</i>	<i>Maks.</i>	<i>p reikšmė</i>
1. GJB2 geno mutacija	26	4	7	7	0,019
2. Perinatalinė patologija/infekcija, postnatalinė infekcija	16	3	6	7	p=0,513
3. Nežinomi veiksniai	9	4	5	7	p=0,75
4. Įgimta CMV infekcija	12	2	5	7	-

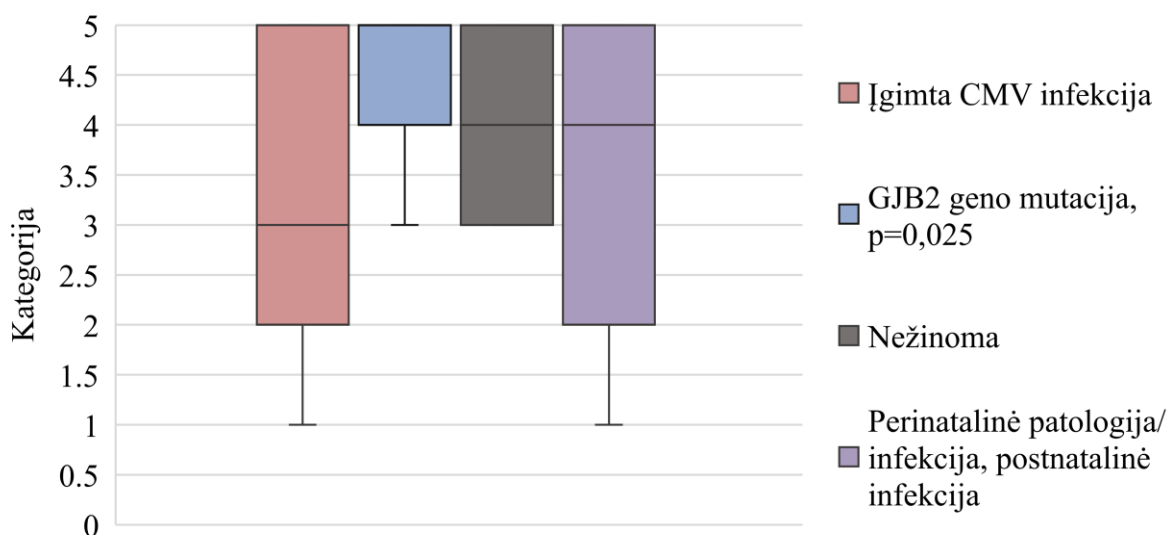


21 pav. Girdėjimo įvertinimas po KI, remiantis pagal KAK skalę nustatytais kategorijomis tarp skirtingų NKS etiologinių grupių

Tiriamųjų kalbos suprantamumo įgūdžiai palyginti remiantis pagal KSS skalę (0-5) nustatytais kategorijomis. Lyginant su pirmos grupės tiriamaisiais, ketvirtos grupės pagal KSS skalę nustatytų kategorijų mediana yra statistiškai reikšmingai žemesnė ($p=0,025$). Ketvirtos grupės kategorijų medianos skirtumas su antrąja bei trečiąja grupėmis yra statistiškai nereikšmingas ($p=0,646$; $p=0,43$) (12 lentelė, 22 pav.).

12 lentelė. Kalbos suprantamumo įvertinimas po KI, remiantis pagal KSS skalę nustatytais kategorijomis tarp skirtingų NKS etiologinių grupių

NKS priežastis	N	Kategorija (nustatyta pagal KSS skalę)			
		Min.	Mediana	Maks.	p reikšmė
GJB2 geno mutacija	26	1	5	5	p=0,025
Perinatalinė patologija/infekcija, postnatalinė infekcija	16	1	4	5	p=0,646
Nežinomi veiksniai	9	3	4	5	p=0,43
Įgimta CMV infekcija	12	1	3	5	-



22 pav. Kalbos suprantamumo įvertinimas po KI, remiantis pagal KSS skalę nustatytais kategorijomis tarp skirtingų NKS etiologinių grupių

3.2 Aptarimas

Atliktas tyrimas padėjo nustatyti 14 (12,4%) įgimtos CMV infekcijos atvejų, iš kurių 12 (10,6%) tiriamųjų tai yra tikėtina ikikalbinio NKS priežastis. Panašius retrospektyvaus tyrimo rezultatus aprašo ir *J.W Kimani et al.* Pagal tuos pačius parametrus atrinktų 109 tiriamųjų imtyje, tyrėjai nustatė 11 (10%) įgimtos CMV infekcijos atvejų, iš kurių ši infekcija yra 10 tiriamųjų kurtumo priežastis [100]. Neurosensorinio pobūdžio klausos sutrikimo etiologijoje žinomi tiek genetiniai, kiek ir negenetiniai veiksniai, todėl ieškant pirminės sutrikimo priežasties, būtina atmesti genetinių veiksnių tikimybę. Visiems 12 tiriamųjų yra paneigtos kurtumą sukeliančios mutacijos, o kiti galimi negenetiniai veiksniai iš jų paneigti 11 tiriamųjų, 1 atvejis

turi ne tik CMV, bet ir neišnešiotumo rizikos veiksni. Remiantis šiais duomenimis, galime daryti prielaidą, kad tiriamųjų vidinės ausies stuktūrų pažeidimus sukėlė būtent prenatalinė CMV infekcija. Kitiems 2 CMV teigiamiems tiriamiesiems kurtumą sukėlė mutacijos. Tiriamiesiems, kurių sutrikimo etiologijoje CMV virusas yra tikėtina kurtumo priežastis, sutrikimas diagnozuotas statistiškai reikšmingai vėliau, nei nurodoma Jungtinio kūdikių klausos komiteto rekomendacijose (rekomenduojama iki 3 mėn., tiriamųjų mediana 20 mėn.), tačiau klausos reabilitacija implantais atlikta laiku (KI rekomenduojama atlikti iki 24 mėn., tiriamųjų mediana 22 mėn.). Tiksliai pasakyti, kodėl kurtumas diagnozuotas vėliau – sunku. Grupę, kuriai CMV infekcija yra tikėtina pirminė NKS priežastis, daugiausiai sudarė tiriamieji, gimę iki 2014-ųjų, kai VNKP dar nebuvo įdiegta, ir tik vienas tiriamasis gimė, kai VNKP jau buvo atliekama. Taigi, vėlyva diagnozė gali būti paaiškinta tuo, kad didžioji dalis tiriamųjų gimė prieš Lietuvoje įsigaliojant VNKP. Tačiau būtina pabrėžti, kad CMV sukeltiems klausos pažeidimams būdinga vėlesnė pradžia bei progresuojanti klausos blogėjimo eiga, kas taip pat galėjo atitolinti sutrikimo diagnozę. Dėl vėlyvos ir progresuojančios sutrikimo ypatybės, VNKP neįturi visiems KS, kuriuos lemia CMV, nes patikros etapų metu, klausos gali būti dar nesutrikusi. Kaip aprašo *K. B. Fowler et al.*, VNKP patikros metu 57% CMV infekcijos sukeltų KS yra sėkmingai identifikuojami [101], todėl norint nustatyti ir pateikti tikrąjį VNKP jautrumą šios KS etiologijos atvejams Lietuvoje, reikėtų sudaryti ir išanalizuoti visuotinėje patikroje dalyvavusią grupę. Apibendrinant, ar statistiškai reikšmingą atitolimą nuo diagnozės rekomendacijų lėmė VNKP nebuvimas, ar vėlyva NKS pradžia – atsakyti sunku. Kitų grupių tiriamiesiems KS taip pat nebuvo nustatytas rekomenduojamu laikotarpiu, tačiau mūsų rezultatai parodo, kad CMV viruso sukeltas NKS diagnozuojamas reikšmingai vėliau nei NKS, kuriuos lemia GJB2 mutacija. Šį skirtumą vėlgi lemia CMV sukeltų KS vėlesnė klausos blogėjimo pradžia, kadangi GJB2 genų mutacijos sukeltas kurtumas pasireiškia nuo gimimo.

Geresni girdėjimo rezultatai pasiekiami ne iš karto po KI, todėl jos efektyvumas įvertinamas praėjus tik tam tikram laikui (po 12 mėn. ir vėliau). Be to, klausos gerėjimo rezultatai yra labai individualūs, priklauso nuo implanto naudojimo trukmės bei kitų veiksnių [99]. Kadangi tiriamojame imtyje buvo skirtingos trukmės implantų naudotojai, prieš lyginant reabilitacijos efektyvumą, turėjome įvertinti ar implantų naudojimo trukmės tarp grupių nėra reikšmingai skirtingos. Įsitikinęs, kad statistinio reikšmingumo nėra, visų pirma analizavome tiriamųjų, pagal KAK skalę įvertintą, poimplantacinį gebėjimą suvokti aplinkinių kalbą bei garsus, kuriam priklausomai nuo rezultatų suteikta atitinkama kategorija. Tyrimo metu nustatėme, kad tiriamieji su perinatalinės CMV infekcijos sukeltais neurosensoriniais klausos pažeidimais atlikus KI pasiekė žemesnę pagal KAK skalę įvertintą kategoriją, lyginant su turinčiais GJB2 geno mutaciją, kurių KI efektyvumo rezultatas pasiekia aukščiausią (geriausią) pagal KAK skalę įvertintą

kategoriją. Panašius rezultatus gavo *R. Ferreira et al.*, kurie taip pat nustatė statistiškai reikšmingai žemesnes KAK kategorijas įgimtą CMV infekciją turinčių tarpe, lyginant su tiriamiaisiais, kurių kurtumą lėmė GJB2 mutacija. *R. Ferreira et al.* taip pat aprašo ir KSS kategorijų skirtumus tarp šių grupių, tačiau statistiškai reikšmingų rezultatų jiems gauti nepavyko. Tuo tarpu mūsų tyrimo metu, GJB2 genų mutaciją turinčių tiriamųjų tarpe KSS kategorijos aukštesnės, lyginant su turinčiais prenatalinę CMV infekciją. Galime daryti išvadą, kad įgimtos CMV infekcijos sukelti klausos pokyčiai yra sunkesni ir daugeliu atveju KI nepadeda pasiekti aukščiausių KAK ir KSS kategorijų. Būtina pripažinti, kad dėl mažų skirtingos NKS etiologijos sudarytų grupių, gautas statistinis reikšmingumas yra abejotinas. Tačiau CMV infekcija turinčiųjų prastesnis KI efektyvumas gali būti paaiškinamas tuo, kad įgimtas CMV virusas gali plisti ir pažeisti ne tik vidinę ausį, bet ir pačius smegenų garsų suvokimo centrus. GJB2 genų mutacija sukelia izoliuotus pokyčius, todėl kochleariniai implantai išsprendžia nestimuliuojamų neuroepitelinių ląstelių problemą, tačiau garsų suvokimo centrų sutrikimų jų veikimas nepakeičia [102]. Be to, šiuos skirtumus galime paaiškinti ir tuo kad, tiriamųjų grupėje su galimais dėl įgimtos CMV infekcijos atsiradusiais klausos pažeidimais, KI atlikta vėliau negu tiriamiesiems su GJB2 geno mutacija. Nepaisant to, kad abiem grupėms KI atlikta rekomenduojamu terminu (iki 24 mėn.), yra įrodyta, kad kuo anksčiau yra atlikta operacija, tuo geresnių rezultatų pasiekama, todėl galima manyti, kad aukščiausios pagal KAK ir KSS skales įvertintos kategorijos dėl minėtos priežasties yra nepasiektos [98].

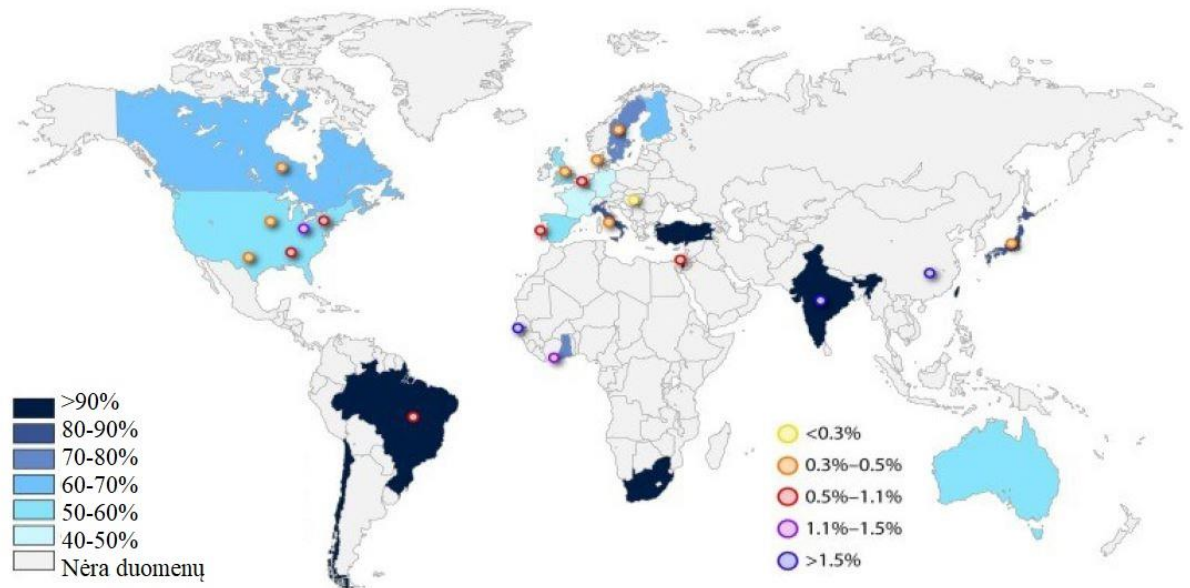
Atliktas tyrimas demonstruoja *Guthrie* sauso kraujo skritulių panaudojimo reikšmingumą ne tik paveldimų medžiagų apykaitos sutrikimų diagnostikoje, bet ir siekiant retrospektyvaus prenatalinės infekcijos patvirtinimo. Kaip aprašo *L. Wang et al.*, 12-18 metų archyvavimo trukmės sauso kraujo skrituliai yra tinkami virusologiniams tyrimams, diagnostinis jautrumas bei specifiskumas naudojant tokio tipo mėginius siekia 81,25% ir atitinkamai 100% [103]. Naudojome nuo 2-jų iki 18-kos metų archyvavimo trukmės *Guthrie* metodu saugomus sauso kraujo mėginius, CMV DNR aptikome 18-kos, 12-kos, 11-kos, 10-ies, 9-ių metų ir mažesnės archyvavimo trukmės mėginiuose, todėl *L. Wang* aprašomas teiginys mūsų tyrime pasitvirtino. Ilgesnio nei 18-kos metų archyvavimo trukmės mėginių neturėjome. Ar *Guthrie* kortelių saugojimo ypatumai (kortelės saugomos viena šalia kitos, galimas kryžminis užsiteršimas CMV) gali lemti klaidingai teigiamus rezultatus – vieningo atsakymo nėra [103]. Žemas naudotų reagentų jautrumas pademonstruotas ne kartą [104], todėl buvo pasirinkta *D. Spalletti-Cernia et al.* aprašoma aptikimo jautrumą gerinanti trigubo mėginių DNR išskyrimo strategija, kurios metu mėginį laikėme teigiamu, jei iš 3 tiriamojo mėginių, viruso DNR aptikta bent 2 atskiruose mėginiuose [105]. Nepaisant 14 aptiktų infekcijos atvejų, manome, diagnostinis jautrumas išliko nepakankamas. Atliekant TL-PGR tyrima daugumos CMV teigiamų mėginių Ct

vertės siekė 27 ir velesnius ciklus, kas leidžia manyti, kad tiriamųjų viremija gimimo metu buvo žema. Naudotų reagentų aptikimo riba siekė 57.1 kopijos/ml, tačiau neatmetame tikimybės kad viremija galėjo būti žemiau šios aptikimo ribos, todėl neatmetama klaidingai neigiamų mėginių tikimybė.

Į atlikto tyrimo imtį buvo įtraukti asmenys, kuriems įgimtos CMV infekcijos aptikimo tikimybė, dėl jau žinomo ikikalbinio neurosensorinio klausos pažeidimo ir jo galimos etiologijos, buvo didesnė. Tokių ekspertinių-tikslinių imčių duomenys yra subjektyvūs ir analizuojant įgimtų CMV atvejų paplitimą negali būti pritaikyti visai populiacijai. Nepaisant to, naudojant sauso kraujo skritulius aptikta CMV DNR įrodo Lietuvoje egzistuojančius įgimtos/prenatalinės CMV infekcijos atvejus. Nagrinėjant ULAC sergamumo metines ataskaitas, pastebėtas įgimtos CMV infekcijos atvejų retumas. Laikotarpiu nuo 2003-ųjų iki 2016-ųjų metų apie įgimtą infekciją pranešta 3 kartus, tuo tarpu 2003-2016 metų gimimo tiriamųjų grupėje įgimtą infekciją nustatėme net 13-kai tiriamųjų. Neefektyvios įgimtos CMV infekcijos nustatymo praktika aprašoma daugelio šalių mediciniuose leidiniuose, o stebint ULAC bei atlikto tyrimo duomenis, manome, kad įgimta CMV infekcija išlieka šešėlyje ir mūsų šalyje. Remiantis tyrimo rezultatais ir anamnezės duomenimis, galime teigti, kad 7-iems tiriamiesiems besimptominė infekcijos forma pirmą kartą nustatyta tik šio tyrimo metu, kadangi iki tyrimo jų NKS etiologija buvo nežinoma. Kitiems 5-iems tiriamiesiems sunki infekcijos forma naujagimystėje jau buvo patvirtinta, tačiau atlikę CMV DNR nustatymą iš sauso kraujo lašo jiems CMV viremiją, buvusią naujagimystėje, patvirtinome dar kartą. Vadinasi, apie CMV viruso grėsmę nepamirštama ir ryškios infekcijos formos atpažįstamos, deja, ULAC apie jas dažnu atveju nepranešama.

Šią dieną daugelyje pasaulio šalių aptariamos efektyvios prenatalinės CMV infekcijos nustatymo strategijos, viena iš jų – visuotinė naujagimių patikra, kuri laiku padėtų aptikti ne tik simptomines, bet ir besimptomines įgimtos infekcijos formas, su kuria gimsta didžioji dalis virusu infekuotų naujagimių. Simptominės infekcijos formos diagnostinės problemos nekelia, tačiau kliniškai tylios formos 15-20% atvejų pereina į vėliau pastebimus neurologinius sutrikimus bei kurtumą, todėl norint prognozuoti tolimesnę infekcijos eigą – būtina diagnozuoti iš anksto. Visiems, naujagimystėje turėjusiems besimptominę infekcijos formą, nustatytas kurtumas. Negana to, jiems yra ir gretutiniai pusiausvyros aparato sutrikimai. Tiriamieji, kurių prenatalinė infekcija buvo ryški nuo naujagimystės, turi sunkius cerebrinio paralyžiaus, mikrocefalijos ir raidos sutrikimo pasekmes. Visuotinė naujagimių patikra būtų naudingas įrankis, kuris leistų laiku nustatyti abejas infekcijos formas ir taikant gydymą bei stebėjimą, iš anksto kontroliuoti galimas pasekmes ir sutrikimų progresavimą. Deja, Lietuvos, kaip ir kitų Baltijos šalių vaisingo amžiaus moterų bei nėščiąjų populiacijos CMV serologinis

paplitimas nėra žinomas (23 pav.), tačiau kol visuotinės naujagimių patikros dėl įgimtos CMV infekcijos dar nėra, tyrimas leistų nustatyti padidintos užsikrėtimo rizikos nėščiųjų grupes. Kaip minėta literatūros apžvalgoje, visuotinė nėščiųjų CMV infekcijos stebėseną dėl nevienareikšmiškų IgM bei IgG rezultatų sudėtinga ir netikslinga, tačiau serologinio paplitimo žinojimas bei konsultavimas dėl CMV keliamų pavojų ir infekcijos profilaktikos taisyklių, galėtų sumažinti CMV perdavimo vaisiui tikimybę.



23 pav. Globalus vaisingo amžiaus moterų CMV serologinis paplitimas (kairė) bei įgimtos CMV infekcijos paplitimas (dešinė). Adaptuota iš [106]

IŠVADOS

1. Atlikta retrospektyvinė analizė parodė, kad dauguma CMV viremijų turinčių naujagimių lieka neidentifikuoti, todėl ne visi galimi įgimtos CMV infekcijos atvejai yra registruojami ULAC sergamumo ataskaitose.
2. Tiriamiesiems, kurių kurtumo etiologijoje CMV virusas yra tikėtina priežastis, klausos sutrikimo diagnozė nustatyta reikšmingai vėliau nei nurodoma JAV Jungtinio kūdikių klausos komiteto rekomendacijose, bei vėliau nei tiriamųjų su GJB2 geno mutacija grupėje. Klausos rehabilitacija implantais atlikta laiku, tačiau vėliau negu tiriamųjų su GJB2 geno mutacija grupėje.
3. Tiriamųjų, kurių ikikalbinio klausos sutrikimo etiologijoje CMV virusas yra tikėtina priežastis, klausos įvertinimo kategorijos po KI buvo reikšmingai žemesnės nei tiriamųjų su GJB2 mutacija ir nepasiekė aukščiausių klausos įvertinimo kategorijų.

SUMMARY

Retrospective PCR Analysis of Dried Blood Spots (DBS) to Identify Congenital Cytomegalovirus Infection as a Cause of Pediatric Sensorineural Hearing Loss

Congenital cytomegalovirus infection (cCMV) has high importance among all intra-uterine transmission of infections, as it is the most common cause of non-genetic sensorineural hearing loss (SNHL) and other lesions in children. Timely diagnosis might be a successful way to mitigate the consequences cCMV infection and prevent progression of lesions by treatment. However, most cases of maternal and fetal CMV infections are clinically silent and it remains problematic.

The aim of the Thesis: To use dried blood spots (DBS) as a sample for retrospective detection of CMV, as congenital infection is a cause of non-genetic SNHL in children, and to compare anamnesis data of different SNHL etiologies.

Objectives:

1. To test DBS for possible CMV viraemia and compare the results obtained with the incidence rate of congenital CMV infection in the reports by Lithuanian Infectious Diseases and AIDS Center in 2003 - 2016.
2. To assess the correspondence with age recommendations for the diagnosis of infant deafness and cochlear implantation in the group where cCMV is likely to be the primary cause of SNHL and to compare the results with other SNHL etiology groups.
3. To compare the efficacy of cochlear implantation in the group where cCMV is likely to be the primary cause of SNHL with other SNHL etiology groups, based on Speech Intelligibility Rating (SIR), Category of Auditory Performance (CAP) scores.

Methods. The data of 113 children with prelingual SNHL who underwent cochlear implantation (CI) was analyzed. DNA extraction from dried blood spots (DBS) was performed. CMV DNA detection performed by real time PCR, the results were evaluated qualitatively due to the unknown actual dry blood spot volume. Additionally, patients medical records were analysed. Other possible etiological factors which caused SNHL were identified by other researches.

Results. From 113 DBS samples tested by real time PCR, 14 (12,4%) were positive for CMV DNA, 12 (10,6%) of them were associated with prenatal CMV infection as a SNHL. A retrospective analysis has shown that newborns with CMV viremia remain unidentified, and therefore potential incidences of cCMV infection are not recorded in ULAC morbidity reports. For the group where cCMV is likely to be the primary cause of SNHL, the diagnosis of the hearing impairment did not comply with the Joint Committee on Infant Hearing (JCIH) recommendations and was not performed before 3 months of age and was carried out later than that in the GJB2 gene mutation group. Hearing rehabilitation with CI was performed in a timely manner, but later than in the group with the GJB2 gene mutation. For the group where cCMV is likely to be the primary cause of SNHL, CI did not help to achieve the highest CAP and SIR scores, which were lower compared to GJB2 gene mutation group.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Goderis J, De Leenheer E, Smets K, Van Hoecke H, Keymeulen A, Dhooge I. Hearing loss and congenital CMV infection: a systematic review. *Pediatrics*. 2014;134(5):972-82. doi: 10.1542/peds.2014-1173.
2. Rasti S, Ghasemi FS, Abdoli A, Piroozmand A, Mousavi SG, Fakhrie-Kashan Z. ToRCH "co-infections" are associated with increased risk of abortion in pregnant women. *Congenit Anom (Kyoto)*. 2016;56(2):73-8. doi: 10.1111/cga.12138.
3. Kagan KO, Hamprecht K. Cytomegalovirus infection in pregnancy. *Arch Gynecol Obstet*. 2017;296(1):15-26. doi: 10.1007/s00404-017-4380-2
4. Fowler KB, Boppana SB. Congenital cytomegalovirus infection. *Semin Perinatol*. 2018 Mar 1. pii: S0146-0005(18)30008-9. doi: 10.1053/j.semperi.2018.02.002.
5. Luck SE, Wieringa JW, Blázquez-Gamero D, Henneke P, Schuster K, Butler K et al. Congenital Cytomegalovirus: A European Expert Consensus Statement on Diagnosis and Management. *ESPID Congenital CMV Group Meeting, Leipzig 2015. Pediatr Infect Dis J*. 2017;36(12):1205-1213. doi: 10.1097/INF.0000000000001763
6. Giannattasio A, Di Costanzo P, De Matteis A, Milite P, De Martino D, Bucci L et al. Outcomes of congenital cytomegalovirus disease following maternal primary and non-primary infection. *J Clin Virol*. 2017;96:32-36. doi: 10.1016/j.jcv.2017.09.006.
7. Rovito R, Claas FHH, Haasnoot GW, Roelen DL, Kroes ACM, Eikmans M et al. Congenital Cytomegalovirus Infection: Maternal-Child HLA-C, HLA-E, and HLA-G Affect Clinical Outcome. *Front Immunol*. 2018;8:1904. doi: 10.3389/fimmu.2017.01904.
8. Şahiner F, Honca M, Çekmez Y, Kubar A, Honca T, Fidancı MK et al. The role of maternal screening in diagnosing congenital cytomegalovirus infections in highly immune populations. *Ir J Med Sci*. 2015;184(2):475-81. doi: 10.1007/s11845-014-1149-5.
9. Uematsu M, Haginoya K, Kikuchi A, Hino-Fukuyo N, Ishii K, Shiihara T et al. Asymptomatic congenital cytomegalovirus infection with neurological sequelae: A retrospective study using umbilical cord. *Brain Dev*. 2016;38(9):819-26. doi: 10.1016/j.braindev.2016.03.006
10. Ross SA, Ahmed A, Palmer AL, Michaels MG, Sánchez PJ, Stewart A et al. Newborn Dried Blood Spot Polymerase Chain Reaction to Identify Infants with Congenital Cytomegalovirus-Associated Sensorineural Hearing Loss. *J Pediatr*. 2017;184:57-61.e1. doi: 10.1016/j.jpeds.2017.01.047.
11. Hoffman MF, Quittner A. L, Cejas I. Comparisons of Social Competence in Young Children With and Without Hearing Loss: A Dynamic Systems Framework. *J Deaf Stud Deaf Educ*. 2015; 20(2): 115–124.
12. Shojaei E, Jafari Z, Gholami M. Effect of Early Intervention on Language Development in Hearing-Impaired Children. *Iran J Otorhinolaryngol*. 2016;28(84):13-21
13. Lietuvos Respublikos sveikatos apsaugos ministro įsakymas 2013 m. birželio 11 d. įsakymas Nr. V-612 „Dėl visuotinio naujagimių klausos tikrinimo tvarkos aprašo patvirtinimo“// Valstybės žinios, 2013-06-18, Nr. 64-3190. Interneto prieiga: <https://www.e-tar.lt/portal/lt/legalAct/TAR.5F4F3AE516FE>
14. Bartlett AW, McMullan B, Rawlinson WD, Palasanthiran P. Hearing and neurodevelopmental outcomes for children with asymptomatic congenital c

- ytomegalovirus infection: A systematic review. *Rev Med Virol.* 2017. doi: 10.1002/rmv.1938.
15. Lasak JM, Allen P, McVay T, Lewis D. Hearing loss: diagnosis and management. *Prim Care.* 2014;41(1):19-31. DOI: 10.1016/j.pop.2013.10.003.
 16. Reiter R, Pickhard A, Brosch S. Hearing impairment and language development. *Laryngorhinootologie.* 2012;91(9):550-9. DOI: 10.1055/s-0032-1312614.
 17. Pasaulio sveikatos organizacija: Deafness and hearing loss. interneto prieiga: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs300/en/>
 18. Wroblewska-Seniuk K, Dabrowskiralli P, Greczka G, Szabatowska K, Glowacka A, Szyfter W et al. Sensorineural and conductive hearing loss in infants diagnosed in the program of universal newborn hearing screening. *nt J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2018 Feb;105:181-186. DOI: 10.1016/j.ijporl.2017.12.007
 19. Ječmenica J, Bajec-Opančina A, Ječmenica D. Genetic hearing impairment. *Childs Nerv Syst.* 2015;31(4):515-9. doi: 10.1007/s00381-015-2628-3.genti
 20. Pasaulio sveikatos organizacija: Alberti PW. The anatomy and physiology of the ear and hearing. Interneto prieiga: http://www.who.int/occupational_health/publications/noise2.pdf
 21. Reichenbach T, Hudspeth AJ. The physics of hearing: fluid mechanics and the active process of the inner ear. *Rep Prog Phys.* 2014;77(7):076601. doi: 10.1088/0034-4885/77/7/076601.
 22. Fettiplace R. Hair cell transduction, tuning and synaptic transmission in the mammalian cochlea. *Compr Physiol.* 2017; 7(4): 1197–1227. doi: 10.1002/cphy.c160049
 23. Kirwan JD, Bekaert M, Commins JM, Davies KTJ, Rossiter SJ et al. A phylomedicine approach to understanding the evolution of auditory sensory perception and disease in mammals. *Evol Appl.* 2013; 6(3): 412–422. doi: 10.1111/eva.12047
 24. Kjer, HM, Paulsen RR. Modelling of the Human Inner Ear Anatomy and Variability for Cochlear Implant Applications. *Kgs. Lyngby: Technical University of Denmark (DTU).* 2015; No. 381. ISSN 0909-3192
 25. Byčkova J. Vaikų su įgimtu neurosensoriniu klausos sutrikimu ištyrimas ir stebėjimas. Vaikų ligoninė, VšĮ VULSK filialas, Klausos tyrimų poskyris. 2018 [cituota 2018 03 04]. Interneto prieiga: http://www.vaikuligonine.lt/wpcontent/uploads/doc/pacientui/LOR_vaiku_su_nuolatiniu_KS_sekimas.pdf
 26. Alzahrani M, Tabet P, Saliba I. Pediatric hearing loss: common causes, diagnosis and therapeutic approach. *Minerva Pediatr.* 2015;67(1):75-90.
 27. Tomblin JB, Oleson JJ, Ambrose SE, Walker E, Moeller MP. The influence of hearing aids on the speech and language development of children with hearing loss. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg.* 2014;140(5):403-9. DOI: 10.1001/jamaoto.2014.267.
 28. Egilmez OK, Kalcioğlu MT. Genetics of Nonsyndromic Congenital Hearing Loss. *Scientifica (Cairo).* 2016;2016:7576064. DOI: 10.1155/2016/7576064.
 29. Koffler T, Ushakov K, Avraham KB. Genetics of Hearing Loss: Syndromic. *Otolaryngol Clin North Am.* 2015;48(6):1041-61. DOI: 10.1016/j.otc.2015.07.007.
 30. Mittal R, Patel AP, Nguyen D, Pan DR, Jhaveri VM, Rudman JR et al. Genetic basis of hearing loss in Spanish, Hispanic and Latino populations. *Gene.* 2018 Mar 20;647:297-305. DOI: 10.1016/j.gene.2018.01.027.
 31. Meyer L, Sharon B, Huang TC, Meyer AC, Gravel KE, Schimmenti LA, et al. Analysis of archived newborn dried blood spots (DBS) identifies congenital cytomegalo

- virus as a major cause of unexplained pediatric sensorineural hearing loss. *Am J Otolaryngol.* 2017;38(5):565-570. doi: 10.1016/j.amjoto.2017.06.002.
32. Ralli M, Rolesi R, Anzivino R, Turchetta R, Fetoni AR. Acquired sensorineural hearing loss in children: current research and therapeutic perspectives. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 2017;37(6):500-508. DOI: 10.14639/0392-100X-1574.
 33. Mikštienė V, Preikšaitienė E, Utkus A. Paveldimas klausos sutrikimas. Genetiniai veiksniai kurtumo etiopatogenezeje. *Medicinos teorija ir praktika.* 2015 - T. 21 (Nr. 1), 55–64 p. doi:10.15591/mtp.2015.008
 34. Gentil F, Meireles S, Roza T, Santos C, Parente M, Almeida E et al. Comparison of otoacoustic emissions in patients with tinnitus having normal hearing versus mild hearing loss. *Int Tinnitus J.* 2015;19(2):39-46. doi: 10.5935/0946-5448.20150007.
 35. Atkinson CE. Towards a screening programme for congenital cytomegalovirus. A thesis submitted to University College London for the degree of Doctor of Philosophy (PhD) London; 2015
 36. Griffiths P, Baraniak I, Reeves M. The pathogenesis of human cytomegalovirus. *J Pathol.* 2015;235(2):288-97. doi: 10.1002/path.4437
 37. Crough T, Khanna R. Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(1):76-98, Table of Contents. doi: 10.1128/CMR.00034-08.
 38. Tomtishen JP 3rd. Human cytomegalovirus tegument proteins (pp65, pp71, pp150, pp28). *Virology.* 2012;9:22. doi: 10.1186/1743-422X-9-22.
 39. Boeckh M, Geballe AP. Cytomegalovirus: pathogen, paradigm, and puzzle. *J Clin Invest.* 2011;121(5):1673-80. doi: 10.1172/JCI45449
 40. Burke HG, Heldwein EE. Crystal Structure of the Human Cytomegalovirus Glycoprotein B. *PLoS Pathog.* 2015;11(11):e1005300. doi: 10.1371/journal.ppat.1005300
 41. Schleiss MR. Congenital cytomegalovirus infection: molecular mechanisms mediating viral pathogenesis. *Infect Disord Drug Targets.* 2011;11(5):449-65
 42. Kielian M. Mechanisms of Virus Membrane Fusion Proteins. *Annu Rev Virol.* 2014;1(1):171-89. doi: 10.1146/annurev-virology-031413-085521
 43. Kilcher S, Mercer J. DNA virus uncoating. *Virology.* 2015;479-480:578-90. doi: 10.1016/j.virol.2015.01.024.
 44. Strang BL. Viral and cellular subnuclear structures in human cytomegalovirus-infected cells. *J Gen Virol.* 2015;96(Pt 2):239-53. doi: 10.1099/vir.0.071084-0.
 45. Pasaulio sveikatos organizacija: Report of the WHO Collaborative Study to establish the First International Standard for Detection of IgG antibodies to Cytomegalovirus (anti-CMV IgG). Interneto prieiga: http://www.who.int/biologicals/expert_committee/BS2322_WHO_IS_aCMV-IgG_ECBS_report_final_300617.pdf
 46. Plosa EJ, Esbenschade JC, Fuller MP, Weitkamp JH. Cytomegalovirus infection. *Pediatr Rev.* 2012;33(4):156-63; quiz 163. doi: 10.1542/pir.33-4-156.
 47. van Zuylen WJ, Hamilton ST, Naing Z, Hall B, Shand A, Rawlinson WD. Congenital cytomegalovirus infection: Clinical presentation, epidemiology, diagnosis and prevention. *Obstet Med.* 2014;7(4):140-6. doi: 10.1177/1753495X14552719
 48. Harmon CM, Cooling LL. Current strategies and future directions for the prevention of transfusion-transmitted cytomegalovirus. *International Journal of Clinical Transfusion Medicine.* 2017; 5:49-59. doi:10.2147/IJCTM.S11566.]

49. Li G, Kamil JP. Viral Regulation of Cell Tropism in Human Cytomegalovirus. *J Virol.* 2015;90(2):626-9. doi: 10.1128/JVI.01500-15.
50. Revello MG, Gerna G. Human cytomegalovirus tropism for endothelial/epithelial cells: scientific background and clinical implications. *Rev Med Virol.* 2010;20(3):136-55. doi: 10.1002/rmv.645.
51. La Rosa C, Diamond DJ. The immune response to human CMV. *Future Virol.* 2012 Mar 1;7(3):279-293. DOI:10.2217/fvl.12.8.
52. Gerna G, Lilleri D, Fornara C, Bruno F, Gabanti E, Cane I et al. Differential kinetics of human cytomegalovirus load and antibody responses in primary infection of the immunocompetent and immunocompromised host. *J Gen Virol.* 2015;96(Pt 2):360-9. doi: 10.1099/vir.0.070441-0.
53. Naddeo F, Ana Maria Passos-Castilho AM, Granato C. Cytomegalovirus infection in pregnancy. *J Bras Patol Med Lab.* 2015;51(5):310-314. doi: 10.5935/1676-2444.20150050
54. Fouda GG, Martinez DR, Swamy GK, Permar SR. The Impact of IgG transplacental transfer on early life immunity. *Immunohorizons.* 2018;2(1):14-25. doi: 10.4049/immunohorizons.1700057.
55. Willame A, Blanchard-Rohner G, Combescure C, Irion O, Posfay-Barbe K, Martinez de Tejada B et al. Awareness of Cytomegalovirus Infection among Pregnant Women in Geneva, Switzerland: A Cross-sectional Study. *Int J Environ Res Public Health.* 2015;12(12):15285-97. doi: 10.3390/ijerph121214982.
56. Silasi M, Cardenas I, Kwon JY, Racicot K, Aldo P, Mor G. Viral infections during pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 2015;73(3):199-213. doi: 10.1111/aji.12355.
57. Enders G, Daiminger A, Bäder U, Exler S, Enders M. Intrauterine transmission and clinical outcome of 248 pregnancies with primary cytomegalovirus infection in relation to gestational age. *J Clin Virol.* 2011;52(3):244-6. doi: 10.1016/j.jcv.2011.07.005.
58. Davis NL, King CC, Kourtis AP. Cytomegalovirus infection in pregnancy. *Birth Defects Res.* 2017;109(5):336-346. doi: 10.1002/bdra.23601.
59. Buxmann H, Hamprecht K, Meyer-Wittkopf M, Friese K. Primary Human Cytomegalovirus (HCMV) Infection in Pregnancy. *Dtsch Arztebl Int.* 2017;114(4):45-52. doi: 10.3238/arztebl.2017.0045.
60. Lim Y, Lyall H. Congenital cytomegalovirus - who, when, what-with and why to treat? *J Infect.* 2017 Jun;74 Suppl 1:S89-S94. doi: 10.1016/S0163-4453(17)30197-4.
61. Gentile I, Zappulo E, Pia Riccio M, Binda S, Bubba L, Pellegrinelli L et al. Prevalence of Congenital Cytomegalovirus Infection Assessed Through Viral Genome Detection in Dried Blood Spots in Children with Autism Spectrum Disorders. *In Vivo.* 2017; 31(3): 467-473. doi: 10.21873/invivo.11085
62. Coleman JL, Steele RW. Preventing Congenital Cytomegalovirus Infection. *Clin Pediatr (Phila).* 2017;56(12):1085-1094. doi: 10.1177/0009922817724400.
63. Tabata T, Petitt M, Fang-Hoover J, Zydek M, Pereira L. Persistent Cytomegalovirus Infection in Amniotic Membranes of the Human Placenta. *Am J Pathol.* 2016;186(11):2970-2986. doi: 10.1016/j.ajpath.2016.07.016
64. Bialas KM, Swamy GK, Permar SR. Clin Perinatol. Perinatal cytomegalovirus and varicella zoster virus infections: epidemiology, prevention, and treatment. *Clin Perinatol.* 2015;42(1):61-75, viii. doi: 10.1016/j.clp.2014.10.006

65. Revello MG, Tibaldi C, Masuelli G, Frisina V, Sacchi A, Furione M et al. Prevention of Primary Cytomegalovirus Infection in Pregnancy. *EBioMedicine*. 2015;2(9):1205-10. doi: 10.1016/j.ebiom.2015.08.003
66. Lietuvos Respublikos sveikatos apsaugos ministro įsakymas 2013 m. rugsėjo 2013d. įsakymas nr. v-900 „Dėl nėščiųjų, gimdyvių ir naujagimių sveikatos priežiūros tvarkos aprašo patvirtinimo“// Valstybės žinios, 2013-09-28, Nr. 102-5056. Interneto prieiga: <https://www.e-tar.lt/portal/lt/legalAct/TAR.B29E76C4B765>
67. Rodrigues S, Gonçalves D, Taipa R, Rodrigues Mdo C. Nonprimary Cytomegalovirus Fetal Infection. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2016;38(4):196-200. doi: 10.1055/s-0036-1583170.
68. Mack I, Burckhardt MA, Heininger U, Prüfer F, Schulzke S, Wellmann S. Symptomatic Congenital Cytomegalovirus Infection in Children of Seropositive Women. *Front Pediatr*. 2017;5:134. doi: 10.3389/fped.2017.00134.
69. Hadar E, Dorfman E, Bardin R, Gabbay-Benziv R, Amir J, Pardo J. Symptomatic congenital cytomegalovirus disease following non-primary maternal infection: a retrospective cohort study. *BMC Infect Dis*. 2017;17(1):31. doi: 10.1186/s12879-016-2161-3.
70. Bitnun A, Renaud C, Kakkar F, Vaudry W. Diagnosis and management of infants with congenital cytomegalovirus infection. *Paediatr Child Health*. 2017;22(2):72-74. doi: 10.1093/pch/pxx002.
71. Goderis J, Keymeulen A, Smets K, Van Hoecke H, De Leenheer E, Boudewyns A et al. Hearing in Children with Congenital Cytomegalovirus Infection: Results of a Longitudinal Study. *J Pediatr*. 2016;172:110-115.e2. doi: 10.1016/j.jpeds.2016.01.024.
72. Korver AM, Smith RJ, Van Camp G, Schleiss MR, Bitner-Glindzicz MA, Lustig LR et al. Congenital hearing loss. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:16094. doi: 10.1038/nrdp.2016.94
73. Cohen BE, Durstenfeld A, Roehm PC. Viral causes of hearing loss: a review for hearing health professionals. *Trends Hear*. 2014;18. pii: 2331216514541361. doi: 10.1177/2331216514541361
74. Bradford RD, Yoo YG, Golemac M, Pugel EP, Jonjic S, Britt WJ. Murine CMV induced hearing loss is associated with inner ear inflammation and loss of spiral ganglion neurons. *PLoS Pathog*. 2015;11(4):e1004774. doi:10.1371/journal.ppat.1004774.
75. Schachtele SJ, Mutnal MB, Schleiss MR, Lokensgard JR. Cytomegalovirus-induced sensorineural hearing loss with persistent cochlear inflammation in neonatal mice. *J Neurovirol*. 2011;17(3):201-11. doi: 10.1007/s13365-011-0024-7.
76. Standfuss J. Structural biology. Viral chemokine mimicry. *Science*. 2015;347(6226):1071-2. doi: 10.1126/science.aaa7998.
77. Schraff SA, Schleiss MR, Brown DK, Meinen-Derr J, Choi KY, Greinwald JH et al. Macrophage inflammatory proteins in cytomegalovirus-related inner ear injury. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2007;137(4):612-8. DOI:10.1016/j.otohns.2007.03.044
78. Pass FP, Arav-Boger R. Maternal and fetal cytomegalovirus infection: diagnosis, management, and prevention. Version 1. *F1000Res*. 2018; 7: 255. doi: 10.12688/f1000research.12517.1
79. Khalil A, Heath P, Jones C, Soe A, Ville YG on behalf of the Royal College of Obstetricians and Gynaecologists. Congenital Cytomegalovirus Infection: Update on Treatment. *Scientific Impact Paper No. 56*. 2018;125:e1–e11. DOI: 10.1111/1471-0528.14836
80. Abdullahi Nasir I, Babayo A, Shehu MS. Clinical Significance of IgG Avidity Testing and Other Considerations in

- the Diagnosis of Congenital Cytomegalovirus Infection: A Review Update. *Med Sci (Basel)*. 2016;4(1). pii: E5. doi: 10.3390/medsci4010005.
81. Ziemann M, Thiele T. Transfusion-transmitted CMV infection - current knowledge and future perspectives. *Transfus Med*. 2017;27(4):238-248. doi: 10.1111/tme.12437.
 82. Leruez-Ville M, Ville Y. Cytomegalovirus infection in pregnancy. *Presse Med*. 2014;43(6 Pt 1):683-90. doi: 10.1016/j.lpm.2014.02.016.
 83. Picone O, Grangeot-Keros L, Senat M, Fuchs F, Bouthry E, Ayoubi J et al. Cytomegalovirus non-primary infection during pregnancy. Can serology help with diagnosis? *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2017;30(2):224-227.
 84. Saldan A, Forner G, Mengoli C, Gussetti N, Palù G, Abate D. Testing for Cytomegalovirus in Pregnancy. *J Clin Microbiol*. 2017;55(3):693-702. doi: 10.1128/JCM.01868-16.
 85. Ziemann M, Unmack A, Steppat D, Juhl D, Görg S, Hennig H. The natural course of primary cytomegalovirus infection in blood donors. *Vox Sang*. 2010;99(1):24-33. doi: 10.1111/j.1423-0410.2009.01306.x.
 86. Revello MG, Furione M, Rognoni V, Arossa A, Gerna G. Cytomegalovirus DNAemia in pregnant women. *J Clin Virol*. 2014;61(4):590-2. doi: 10.1016/j.jcv.2014.10.002.
 87. Naing ZW, Scott GM, Shand A, Hamilton ST, van Zuylen WJ et al. Congenital cytomegalovirus infection in pregnancy: a review of prevalence, clinical features, diagnosis and prevention. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 2016;56(1):9-18. doi: 10.1111/ajo.12408.
 88. Koontz D, Baecher K, Amin M, Nikolova S, Gallagher M, Dollard S. Evaluation of DNA extraction methods for the detection of Cytomegalovirus in dried blood spots. *J Clin Virol*. 2015;66:95-9. doi: 10.1016/j.jcv.2015.03.015
 89. Wang L, Xu X, Zhang H, Qian J, Zhu J. Dried blood spots PCR assays to screen congenital cytomegalovirus infection: a meta-analysis. *Virol J*. 2015;12:60. doi: 10.1186/s12985-015-0281-9
 90. Binda S, Pellegrinelli L, Terraneo M, Caserini A, Primache V, Bubba L et al. What people know about congenital CMV: an analysis of a large heterogeneous population through a web-based survey. *BMC Infect Dis*. 2016;16(1):513. DOI:10.1186/s12879-016-1861-z
 91. Ali N, Rampazzo RCP, Costa ADT, Krieger MA. Current Nucleic Acid Extraction Methods and Their Implications to Point-of-Care Diagnostics. *Biomed Res Int*. 2017;2017:9306564. doi: 10.1155/2017/9306564.
 92. Prakash SB. To Perform Restriction Digestion of the Given DNA Sample. In: *Laboratory Protocols in Applied Life Sciences*. CRC Press; 2014. p. 1097. ISBN: 9781466553149
 93. QIAgen [gamintojo tinklapis]. QIAgen.com. 2018 [cituota 2018 04 15]. Interneto prieiga: <https://www.qiagen.com/us/search/qiaamp-dna-blood-mini-kit/>
 94. Ambrasienė D. Naujaisių mokslinių pasiekimų biotechnologijos srityje mokslinė studija. VDU, Gamtos fak. Interneto prieiga [http://molbio.vdu.lt/medziaga/Ambrasiene/AMBRASIENE-projektas%202007%2007%2023.pdf]
 95. Waggoner J, Ho YH, Libiran P, Pinsky BA. Clinical Significance of Low Cytomegalovirus DNA Levels in Human Plasma. *J Clin Microbiol*. 2012; 50(7): 2378–2383. doi: 10.1128/JCM.06800-11

96. Kasnauskienė J. Viso žmogaus genomo analizės metodai. Mokomoji knyga. Vilnius: Vilniaus universitetas, 2014.
97. Navarro E, Serrano-Heras G, Castaño MJ, Solera J. Real-time PCR detection chemistry. *Clinica Chimica Acta* 439 (2015) 231–250. doi.org/10.1016/j.cca.2014.10.017
98. Executive summary of joint committee on infant hearing year 2007 position statement. Principles and guidelines for early hearing detection and intervention programs. Interneto prieiga:
https://www.infanthearing.org/coordinator_orientation/section2/4_executive_summary.pdf
99. Byčkova J, eglė Gradauskienė E, Lesinskas E, Mikštienė B, Utkus A. Ankstyvi kochlearinės implantacijos rezultatai vaikams. *Biomedicina*; 2012, 22(6): 140-145
100. Kimani JW, Buchman CA, Booker JK, Huang BY, Castillo M, Powell CM et al. Sensorineural hearing loss in a pediatric population: association of congenital cytomegalovirus infection with intracranial abnormalities. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2010;136(10):999-1004. doi: 10.1001/archoto.2010.156.
101. Fowler KB, McCollister FP, Sabo DL, Shoup AG, Owen KE, Woodruff JL et al. A Targeted Approach for Congenital Cytomegalovirus Screening Within Newborn Hearing Screening. *Pediatrics.* 2017;139(2). pii: e20162128. doi: 10.1542/peds.2016-2128.
102. Ferreira R, Martins J.H, Alves M, Oliveira J, Silva L.F, Ribeiro C et al. Results of cochlear implantation in children with congenital cytomegalovirus infection versus gjb2 mutation. *Journal of Hearing Science.* 2015: 5(2):OA36-41
103. Wang L, Xu X, Zhang H, Qian J, Zhu J. Dried blood spots PCR assays to screen congenital cytomegalovirus infection: a meta-analysis. *Virology.* 2015;12:60. doi: 10.1186/s12985-015-0281-9
104. Koontz D, Baecher K, Amin M, Nikolova S, Gallagher M, Dollard S. Evaluation of DNA extraction methods for the detection of Cytomegalovirus in dried blood spots. *J Clin Virol.* 2015;66:95-9. doi: 10.1016/j.jcv.2015.03.015.
105. Spalletti-Cernia D, Barbato S, Sorrentino R, Vallefucio L, Rocco C, Di Costanzo P et al. Evaluation of the Automated QIASymphony SP/AS Workflow for Cytomegalovirus DNA Extraction and Amplification from Dried Blood Spots. *Intervirology.* 2016;59(4):211-216. doi: 10.1159/000457953
106. Emery VC, Lazzarotto T. Cytomegalovirus in pregnancy and the neonate. *F1000Res.* 2017;6:138. doi: 10.12688/f1000research.10276.1.

1 PRIEDAS

1 lentelė. KAK skalė

	Kategorija
0	Nesupranta nei balso, nei aplinkos garsų
1	Supranta, kai yra aplinkos garsų
2	Reaguoja į kalbos garsus
3	Identifikuoja aplinkos garsus
4	Skiria kalbos garsus, neskaitydamas iš lūpų
5	Supranta pagrindinius nurodymus, neskaitydamas iš lūpų
6	Supranta pokalbį, neskaitydamas iš lūpų
7	Kalba telefonu, kai pašnekovas yra žinomas asmuo

2 lentelė. KSS skalė

	Kriterijus
5	Rišli kalba yra suprantama visiems klausytojams. Vaiką lengva suprasti kasdienės veiklos metu.
4	Kalba yra suprantama tam klausytojui, kuris šiek tiek išmano kurčiųjų kalbą.
3	Kalba yra suprantama tam klausytojui, kuris labai atidžiai klauso ir skaito iš lūpų.
2	Kalba yra nesuprantama. Suprantama kalba vystosi atskirais žodžiais, kai tuo pat metu dar galima skaityti iš lūpų ir suprasti pagal kontekstą.
1	Kalba nesuprantama. Šnekamojoje kalboje naudojami neatpažįstami žodžiai

PADĖKA

Nuoširdžiai norėčiau padėkoti:

Magistrinio darbo vadovei **Dr. Silvijai Kiverytei** už pagalbą bei pastabas ruošiant šį darbą;

Gydytojai-otorinolaringologei **Jekaterinai Byčkovai** už nuoširdų bendradarbiavimą, išsamius tiriamųjų duomenis bei suteiktas vertingas konsultacijas, kurios padėjo įsigilinti į NKS etiologiją bei duomenis;

Giedrei, už bendradarbiavimą tiriamųjų sauso kraujo mėginių paieškoje

VšĮ VUL SK LMC Mikrobiologijos laboratorijos molekulinės diagnostikos **kolektyvui** už draugišką darbo atmosferą, paskatinimą bei palaikymą;

Draugei **Astai**, už nuolatinį paskatinimą, moralinį palaikymą bei pagalbą;

Šeimai, už kantrybę ir supratimą.