

На правах рукописи

ДЕМИНА Ольга Игоревна

КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ВАРИАНТЫ ИНФЕКЦИОННОГО
МОНОНУКЛЕОЗА РАЗЛИЧНОЙ ЭТИОЛОГИИ У ДЕТЕЙ

14.01.09 – Инфекционные болезни

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном образовательном учреждении дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель: **Чеботарева Татьяна Александровна**, доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры детских инфекционных болезней ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации»

Научный консультант: **Кузнецова Софья Алексеевна**, кандидат физико-математических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биофизики ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Официальные оппоненты:

Бабаченко Ирина Владимировна, доктор медицинских наук, профессор, заведующий научно-исследовательским отделом капельных инфекций ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», профессор кафедры инфекционных заболеваний у детей ФП и ДПО ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет».

Харламова Флора Семеновна, доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры инфекционных болезней у детей ПФ ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России.

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов».

Защита диссертации состоится «28» октября 2021г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д.208.071.02 ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 125993 г. Москва, ул. Баррикадная, д. 2/1, стр. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России (125445, г. Москва, ул. Беломорская, д. 19/38 и на сайте www.rmaro.ru).

Автореферат разослан «__» _____ 2021г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

Мазанкова Людмила Николаевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы диссертации.

Инфекционный мононуклеоз (ИМ) – полиэтиологическое заболевание, которое вызывается вирусами из группы герпес (Новосад Е.В., Шамшева О.В., 2005, Черноусов А.Д. и др., 2005, Иванова, В.В., Симованьян Э.Н., 2006, Мелехина Е.В., 2020). По данным ВОЗ инфицированность населения герпесвирусами высокая: вирусами простого герпеса составляет 70-100%, варицелла-зостер вирусом – более 95%, вирусом Эпштейна-Барр (ВЭБ) 85-95%, цитомегаловирусом (ЦМВ) 60-85%, вирусом герпеса человека 6 (ВГЧ 6) 20-100% (Шарипова Е.В., Бабаченко И.В., 2013, Соловей Н.В. и др., 2016). Частота выявления моноэтиологического инфекционного мононуклеоза колеблется от 27,5 до 39,5%, в остальных случаях выявляют ассоциации герпес-вирусов (Шарипова Е.В., Бабаченко И.В., 2013, Харламова Ф.С., 2017). Таким образом, возможно одновременное участие нескольких вирусов в качестве этиологических факторов болезни как в виде сочетанной (микст) первичной инфекции, так и в виде комбинированной, когда первичное инфицирование вирусом является триггером реактивации персистирующего в организме. Несмотря на типичную клиническую картину ИМ, отмечаются ее особенности, которые обусловлены не только полиэтиологичностью заболевания, возрастом больных, но и вариантом инфекции – реактивированной или первичной. Результаты единичных исследований (Хмилевская С.А., 2010, Харламова Ф.С., 2017) неоднозначны, что определяет актуальность комплексного исследования для решения этой задачи.

Верификация этиологически значимого возбудителя/возбудителей ИМ в рутинной практике проводится методами иммуноферментного анализа (ИФА), полимеразной цепной реакции (ПЦР), являющимися взаимодополняющими. Михайловой Т.А. в 2008 году доказано, что сходство клинических проявлений моно- и микст-вариантов герпесвирусной инфекции на ранних этапах заболевания определяет необходимость обязательного комплексного применения ПЦР, ИФА и/или иммуноблотинга. Однако, остаются не разработанными количественные критерии метода ПЦР, определяющие диагностическую значимость при инфекционном мононуклеозе.

Картина периферической крови при инфекционном мононуклеозе характеризуется лейкоцитозом (до $10-20 \times 10^9/\text{л}$) с лимфоцитозом и появлением «атипичных мононуклеаров» (АМ), которые имеют морфологическую разнородность (Кишкун А.А., 2009). Оценка АМ с помощью рутинной гемограммы недостаточно информативна и часто приводит к гиподиагностике типичных форм ИМ. Использование проточной цитометрии при высокой стоимости метода не позволяет выявлять морфологические особенности клеток. Совместить морфологическое исследование и иммунофенотипирование возможно при использовании метода клеточного биочипа (С.А. Кузнецова и др., 2016), который внедрен в практику диагностики онкогематологических заболеваний. В области инфекционных болезней, в частности, при инфекционном мононуклеозе, данный метод не применялся; не разработаны количественные и качественные критерии

оценки характера и выраженности иммунного ответа при различных этиологических вариантах данной нозологической формы, а также - клиническая интерпретация его результатов.

Неблагоприятным исходом первого эпизода инфекционного мононуклеоза является формирование хронического герпесвирусного заболевания (М.В. Антонова, Э.А. Кашуба, Т.Г. Дроздова и др., 2017), однако предикторы его риска не определены. Согласно современным данным об ИМ, наиболее вероятными прогностическими параметрами могут служить этиология заболевания, характер (фаза) инфекционного процесса, клинико-лабораторные особенности, характеристика иммунного ответа ребенка. Установление их диагностической значимости в прогнозировании исхода ИМ является актуальной задачей.

Таким образом, высокая распространенность герпесвирусных инфекций у детей, отсутствие четких клинических и лабораторных критериев диагностики первичной и реактивированной инфекции, необходимых для определения оптимальной терапии и профилактики неблагоприятного исхода инфекционного мононуклеоза, определяют актуальность темы исследования.

Степень разработанности темы диссертационного исследования

Особенности клинической картины инфекционного мононуклеоза изучались многими исследователями (Мартынова Г.П. и др., 2015, Д.В. Дутлова, О.И. Уразова, А.П. Помогаева, 2016, И.В. Бабаченко, О.В. Мельник, А.С. Левина, 2012), однако, до настоящего времени не определены клинические и лабораторные критерии диагностики заболевания, вызванного первичной, реактивированной и ассоциированной с несколькими герпесвирусами инфекцией.

В практической медицине для подтверждения активных герпесвирусных инфекций при ИМ наиболее часто используется определение специфических иммуноглобулинов класса М (IgM), а верифицировать ДНК этиологического агента возможно методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) (Д.С. Тихомиров и др., 2015, Н.В. Каражас и др., 2017). Однако в настоящее время нет количественных критериев, позволяющих оценить диагностический уровень выявленной вирус-специфической ДНК в клиническом материале, в частности в мононуклеарах периферической крови.

Количественная оценка атипичных мононуклеаров в периферической крови внедрена в практику, но не отвечает современным представлениям о возможностях оценки иммунного ответа при ИМ. Метод клеточного биочипа позволяет одновременно оценивать морфологию и иммунофенотип АМ, при этом возможности этого метода для диагностики и прогнозирования ИМ, не определены.

Таким образом, не разработаны клинические и лабораторные критерии дифференциальной диагностики инфекционного мононуклеоза различной этиологии, не установлена клиническая значимость метода клеточного биочипа для комплексной оценки характера иммунного ответа при различных этиологических вариантах этого заболевания, не определена роль особенностей иммунного ответа в формировании исхода заболевания.

Цель исследования

Повышение эффективности диагностики и прогнозирования исхода инфекционного мононуклеоза различных этиологических вариантов заболевания у детей.

Задачи исследования

1. Выявить особенности клинической картины и результатов параклинического обследования при инфекционном мононуклеозе различной этиологии у детей
2. Оценить диагностическую значимость серологических и молекулярно-генетических методов исследования в острый период инфекционного мононуклеоза.
3. Установить значение морфологических особенностей лимфоцитов и их количественных значений в крови в острый период инфекционного мононуклеоза различной этиологии для диагностики заболевания и прогноза его течения.
4. Определить клиническое и прогностическое значение оценки иммунного ответа при инфекционном мононуклеозе у детей методом клеточного биочипа.
5. Разработать критерии дифференциальной диагностики и прогноза формирования хронического герпесвирусного заболевания при инфекционном мононуклеозе различной этиологии у детей.

Методология исследования

Предмет исследования – комплексная оценка этиологических вариантов, фазы инфекционного процесса, характера и степени иммунного ответа современным, высокоинформативным методом клеточного биочипа для повышения точности диагностики и прогноза исходов инфекционного мононуклеоза.

Объект исследования - дети с диагнозом «Инфекционный мононуклеоз» в возрасте от 6 мес. до 18 лет, госпитализированные в инфекционные отделения ГБУЗ «ДГКБ им. З.А. Башляевой ДЗМ» в период разгара заболевания.

Применен комплексный методологический подход с использованием анамнестического, клинического, лабораторных методов, результаты которых подвергались статистическому анализу.

Научная новизна исследования

Выявлены критерии неблагоприятного исхода инфекционного мононуклеоза, основанные на оценке клинических симптомов заболевания, определения доли клеток с морфологией атипичных мононуклеаров от всех лимфоцитов и показателя иммунорегуляторного индекса с помощью метода клеточного биочипа.

Доказано, что основным фактором риска формирования хронического течения ВЭБ-инфекции является моно-этиологический вариант инфекционного мононуклеоза. При этом дополнительным критерием риска является первичная ВЭБ-инфекция. Гендерный признак, возраст и преморбидный фон не влияют на тяжесть инфекционного мононуклеоза и риск неблагоприятного исхода в хроническую инфекцию.

Установлено, что число атипичных мононуклеаров в периферической крови, определяемых в рутинной гемограмме с помощью световой микроскопии мазка, не является диагностическим критерием типичного варианта инфекции.

Впервые выявлена взаимосвязь изменения относительного и абсолютного числа нейтрофилов при инфекционном мононуклеозе различной этиологии в разгар заболевания с развитием неспецифических бактериальных осложнений, определен вклад их оценки с 3-го по 10-ый дни болезни в оптимизацию диагностики.

Впервые на основании количественного и качественного анализа лимфоцитов периферической крови методом клеточного биочипа у пациентов с инфекционным мононуклеозом установлено, что атипичный мононуклеар является CD8⁺цитотоксическим лимфоцитом, а доля CD8⁺ атипичных мононуклеаров среди лимфоцитов периферической крови и значение иммунорегуляторного индекса (CD4⁺/CD8⁺) отражают фазу инфекционного процесса.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты исследования объясняют особенности клинического течения инфекционного мононуклеоза различной этиологии. Полученные данные об иммунных клетках с характерной морфологией атипичного мононуклеара и вариантах соотношений различных групп лимфоцитов дополняют существующие научные данные об иммунопатогенезе различных этиологических вариантов инфекционного мононуклеоза и являются обоснованием нового дифференциально-диагностического критерия фазы инфекционного процесса.

Проведенное исследование выявило, что пациентам с инфекционным мононуклеозом показано комплексное обследование, включающее применение двух методов этиологической расшифровки (прямого – ПЦР и опосредованного – ИФА), оценку клинических маркеров первичной ВЭБ-инфекции и результатов определения количественного и качественного анализа лимфоцитов периферической крови с помощью метода клеточного биочипа. Анализ показателей иммунного ответа у детей с инфекционным мононуклеозом, включающий их одновременную количественную оценку и соотношение, особенно при первичной ВЭБ-инфекции, способствуют раннему прогнозированию неблагоприятного исхода заболевания в хроническую инфекцию, что является патогенетическим обоснованием совершенствования тактики ведения пациентов. Установленный в разгар заболевания при инфекционном мононуклеозе нейтрофилез, как характерный лабораторный признак, является научным обоснованием сроков назначения антибактериальной терапии.

Соответствие диссертации паспорту специальности

Диссертационное исследование «Клинико-иммунологические варианты инфекционного мононуклеоза различной этиологии у детей» соответствует формуле специальности 14.01.09 – Инфекционные болезни и областям исследования: п. № 1 «Изучение свойств возбудителей и их взаимодействие с организмом человека, иммунологические, патоморфологические, биохимические, патофизиологические изменения в организме в процессе болезни, лечения и развития постинфекционного иммунитета»; п. № 2 «Клинические проявления инфекционного процесса, повреждения и нарушения функции различных органов и

систем, особенности течения заболевания во всех возрастных группах, в различных условиях окружающей среды и в сочетании с другими болезнями. Прогнозирование течения инфекционного заболевания и его исходов» и п. № 3 «Диагностика инфекционных болезней с использованием клинических, микробиологических, генетических, иммунологических, биохимических, инструментальных и других методов исследования, дифференциальная диагностика с другими болезнями инфекционной и неинфекционной природы».

Публикации и участие в научных конференциях

По теме диссертации опубликовано 10 научных работ, из них 4 в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК при Министерстве образования и науки Российской Федерации и 1 работа в зарубежном электронном журнале. Основные положения диссертации в виде научных докладов доложены на III Московском Городском Съезде педиатров «Трудный диагноз» в педиатрии», Москва, 4 – 6 октября 2017 года; XVI Конгрессе детских инфекционистов России, Москва, 13-15 декабря 2017 года, 7th Congress of the European Academy of paediatric societies, Paris, France, 30 октября – 3 ноября 2018 года; Научно-практической конференции ГБУЗ «ДГКБ им. З.А.Башляевой ДЗМ», Москва, 18 декабря 2019 года, XVIII Конгрессе детских инфекционистов России «Актуальные вопросы инфекционной патологии и вакцинопрофилактики» 12-14 декабря 2019 года, XII Всероссийской научно-практической конференции «Инфекционные аспекты соматической патологии у детей» 24 сентября 2020 года; XIX Конгрессе детских инфекционистов с международным участием 17-19 декабря 2020 года.

Личный вклад соискателя

Соискателем проведено изучение, анализ отечественной и зарубежной литературы по изучаемой проблеме, обоснована степень её разрешенности, сформулированы цель и задачи исследования. Самостоятельно автором производился набор пациентов, разработан дизайн исследования. Лично автором проводились общеклинические методы исследования, катамнестический контроль. Полученные данные подвергались статистической обработке с дальнейшей интерпретацией полученных результатов и их публикацией в научных изданиях. Сформулированы основные положения, выводы диссертации и практические рекомендации.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты диссертационной работы внедрены в учебно-педагогический процесс кафедры детских инфекционных болезней ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, в диагностическую практику инфекционных отделений ГБУЗ «ДГКБ им. З.А.Башляевой ДЗМ» (акт внедрения в практику от 15 декабря 2020 г.).

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 122 страницах печатного текста, включает в себя введение, обзор литературы, 5 глав с изложением материалов и результатов собственных исследований, заключение, выводы, практических рекомендации, список литературы. Диссертация проиллюстрирована 14 рисунками, 2

клиническими примерами, 36 таблицами. В библиографический указатель включено 220 источников, из них 153 отечественных и 67 зарубежных.

Положения, выносимые на защиту

1. Особенности клинической картины инфекционного мононуклеоза у детей определяются этиологией первичной инфекции: при Эпштейна-Барр вирусной моноинфекции доминирует спленомегалия, микст-инфекция вирусом Эпштейна-Барр и другими герпесвирусами отличается наличием затрудненного носового дыхания и гепатомегалией. Инфекционный мононуклеоз, ассоциированный с вирусом герпеса человека 6 не имеет отличительных клинических особенностей. Данные клинические критерии могут быть рекомендованы для дифференциальной диагностики этиологии заболевания.

2. Уровень атипичных мононуклеаров в периферической крови при всех этиологических вариантах инфекционного мононуклеоза не различается, относительный и абсолютный нейтрофилез в крови является характерным лабораторным признаком разгара инфекционного мононуклеоза и не зависит от этиологического варианта болезни. Данные показатели не могут быть использованы в качестве критериев дифференциальной диагностики этиологических вариантов заболевания.

3. Основными факторами риска хронического течения инфекции при инфекционном мононуклеозе являются первичная инфекция вирусом Эпштейна-Барр в моно-этиологическом варианте, доля клеток с морфологией атипичных мононуклеаров $<7,4\%$ от всех лимфоцитов, связавшихся моноклональными антителами к CD8+ (%CD8+ AM от CD45RA) и показатель иммунорегуляторного индекса $>1,2$ по данным метода клеточного биочипа.

4. Комплексная оценка характерных клинических симптомов, результатов молекулярно-генетических и серологических тестов этиологической расшифровки и морфологических особенностей лимфоцитов, их количественных значений, определяемых методом клеточного биочипа, позволяет установить фазу инфекционного процесса и прогнозировать риск формирования хронического течения инфекции при инфекционном мононуклеозе у детей.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Материалы и методы исследования

Под наблюдением находилось 107 детей с первым эпизодом инфекционного мононуклеоза в возрасте от 3-х месяцев до 17 лет, поступивших в ГБУЗ «ДГКБ им. З.А.Башляевой ДЗМ№ за период 2013-2018 гг.». Глубина катамнестического наблюдения от 2 до 6 лет.

В исследование не включались пациенты с ранее перенесенным мононуклеозоподобным заболеванием (по данным анамнеза), получавшие иммунные лекарственные препараты менее чем за 1 месяц до госпитализации в стационар, пациенты с документально подтвержденным первичным иммунодефицитом, сопутствующими инфекционными заболеваниями (ВИЧ, парентеральные гепатиты), сопутствующими тяжелыми соматическими

заболеваниями в стадии декомпенсации (сахарный диабет любого типа, пороки развития органов и систем, системные воспалительные заболевания, нарушения обмена веществ), наследственными генетическими заболеваниями. Из исследования исключались дети с отсутствием активной герпесвирусной инфекции (даже при наличии клинических проявлений ИМ) по данным этиологической расшифровки.

Дизайн исследования

Исследование являлось обсервационным когортным проспективным. Контингент для исследования подбирали методом случайной выборки.

Исследование было выполнено в соответствии с принципами Хельсинкской Декларации. Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом.

На I этапе работы проводились клинические, лабораторные исследования, анамнестический анализ. На II этапе – анализ крови методом биочипа. На III этапе проводилось катamnестическое наблюдение за пациентами в виде телефонного визита и применения дистанционных технологий с обязательной оценкой клинических критериев и лабораторных параметров активности герпесвирусных инфекций.

На аналитическом этапе исследования пациенты были разделены на 5 групп сравнения (табл. 1).

Методы исследования

Всем пациентам проводились соматический осмотр и оценка анамнеза, лабораторные исследования (клинический анализ крови, мочи, биохимический анализ крови, бактериологический анализ биоматериала мазков из ротоглотки, вирусологическая верификация возбудителей инфекционного мононуклеоза прямым и опосредованным методами) и анализ лимфоцитов периферической крови методом клеточного биочипа, все тесты выполнялись по протоколам производителей.

С помощью мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией продуктов в режиме реального времени количественно определяли ДНК возбудителей инфекционного мононуклеоза (ВЭБ, ЦМВ, ВГЧ 6) в мононуклеарах периферической крови (прямой метод). С помощью твердофазного непрямого иммуноферментного анализа проводили серологические исследования сыворотки или плазмы крови больных на наличие противовирусных иммуноглобулинов классов М и G. Для ЦМВ качественно определяли наличие IgM и титр IgG. Для ВЭБ в качественном формате определяли наличие IgM к вирусному капсидному антигену (VCA), IgG к раннему антигену ВЭБ (IgG-EA) и концентрацию IgG к ядерному антигену 1 типа ВЭБ (EBNA).

Для углубленной оценки морфологии и иммунофенотипа атипичных мононуклеаров использовался метод клеточного биочипа. В качестве нормативных параметров клеточного иммунитета использованы референсные интервалы здоровых детей с учетом возрастных особенностей становления системы иммунитета в группах (контроль):

- от 1 года до 7 лет (1-7 лет) включительно;

- с 7 лет одного дня до 18 лет включительно (>7-18 лет).

Статистическая обработка данных

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием параметрических и непараметрических методов исследования с использованием пакетов программ IBM SPSS Statistics 24. Для первичной подготовки таблиц и промежуточных расчетов был использован пакет Excel. Достоверность различий определялась на уровне значимости 0,05. Достоверность различия частот определяли при помощи критерия хи-квадрат Пирсона, двустороннего критерия Фишера, использовали z-test. Также определялись относительный риск (ОР) и отношения шансов (ОШ), U-тест Манна-Уитни и ROC-анализ результатов, оптимальные пороговые значения в ROC-анализе были определены с использованием индекса Юдена (максимизирующего сумму чувствительности и специфичности). Данные представлены в виде средних величин и среднеквадратичной ошибки отклонения ($M \pm m$), медианы и межквартильного размаха.

Результаты исследования и их обсуждение

Обследовано 107 детей (от 3-х месяцев до 17 лет), медиана возраста составляла 3 года (LQ: 2 года – UQ: 7 лет).

Группы детей с первичным эпизодом инфекционного мононуклеоза (сравнения) сформированы нами с учетом этиологии заболевания и фазы инфекционного процесса (табл. 1).

Таблица 1.

Группы сравнения с учетом этиологии инфекционного мононуклеоза и фазы инфекционного процесса

№ группы	Этиология/фаза инфекции	Количество пациентов, чел.	Всего, %
1	ВЭБ первичная (моно)	29	27,10%
2	ВЭБ реактивация(моно)	16	14,95%
3	ВЭБ первичная и ЦМВ первичная; ВЭБ первичная, ЦМВ первичная, ВГЧ 6; ВЭБ первичная и ЦМВ реактивация; ВЭБ первичная, ЦМВ реактивация, ВГЧ 6; ВЭБ первичная и ВГЧ 6 активная	25	23,36%
4	ВЭБ реактивация, ВГЧ 6 активная; ВЭБ реактивация и ЦМВ первичная; ВЭБ реактивация, ЦМВ реактивация, ВГЧ 6 активная	12	11,21%
5	ВГЧ 6 инфекция активная (моно); ВГЧ 6 инфекция активная, ЦМВ реактивация	25	23,36%
	Итого	107	100%

Результаты исследования показали, что инфекционный мононуклеоз ВЭБ этиологии не имеет строгой корреляции с критерием пола и встречается с одинаковой частотой, как у мальчиков, так и у девочек. Инфекционный

мононуклеоз, связанный с реактивацией ЦМВ при наличии ВГЧ 6 и инфекционный мононуклеоз моно-этиологии ВГЧ 6 (группа 5) наблюдался в 2,6 раза чаще у мальчиков (12 мальчиков, 72%, против 5 девочек, 28%, $p < 0,05$).

Анализ возрастной структуры инфекционного мононуклеоза среди всех обследованных детей показал явное доминирование детей в возрасте 2-3 лет. Медиана возраста больных ИМ составила 3 года (LQ: 2 года – UQ: 7 лет). Пик встречаемости инфекционного мононуклеоза ($n=107$) наблюдался в возрасте 2 года (19 детей, 17,76%) и 3 года (20 детей, 18,869%).

Частота встречаемости различных клинических проявлений инфекционного мононуклеоза по группам представлена в таблице 2.

Наиболее значимыми дифференциально-диагностическими критериями являются следующие: гепатомегалия, спленомегалия, наличие симптома «затрудненного носового дыхания». Частота гепатомегалии значимо различается в группе 3 и группе 5: у 17 детей (68,0%) и 8 (44,4%) соответственно, $p=0,028$. В группе 1 спленомегалия диагностирована у 58,62% детей, что достоверно различается с частотой спленомегалии в группе 2 (18,75% детей) и в группе 5 (28,0% пациентов), $p=0,013$ и $p=0,031$ соответственно.

Таблица 2.

Клиническая и лабораторная характеристика инфекционного мононуклеоза

Клинико-лабораторный признак	Группа 1, n=29	Группа 2, n=16	Группа 3, n=25	Группа 4, n=12	Группа 5, n=25
	(чел. / %)	(чел. / %)	(чел. / %)	(чел. / %)	(чел. / %)
Симптомы основные					
Гепатомегалия	18 / 62,01%	8 / 50,0%	17 / 68,0%*	8 / 66,67%	8 / 44,4%*
Спленомегалия	17 / 58,62%*	3 / 18,75%*	11 / 44%	6 / 50,0%	7 / 28,0%*
Мелкие шейные лимфоузлы	3 / 10,35%*	5 / 31,25%	3 / 12,0%	4 / 33,33%	9 / 36%*
Симптомы дополнительные					
Затрудненное носовое дыхание	22 / 75,86%	13 / 81,25%	23 / 92,0%*	7 / 58,33%*	14 / 56,0%*
Лабораторные показатели					
Нейтрофилы, %	n=24 / 35,89±3,99%*	n=15 / 63,75±4,66%*	n=20 / 50,00±5,30%*	n=10 / 62,5±6,33%*	n=18 / 51,56±5,81%*
Нейтрофилы, абс (кл/мкл)	n=24 / 4701,98±619,86*	n=15 / 9252,31±1303,39*	n=20 / 7133,55±51205,22	n=10 / 9507,30±2516,33*	n=18 / 6382,49±1390,57
Примечание: * - $p < 0,05$					

При инфекционном мононуклеозе, ассоциированном с первичной ВЭБ-инфекцией в сочетании с другими герпесвирусами (группа 3), частота симптома «затрудненное носовое дыхание» достоверно отличается от частоты при инфекционном мононуклеозе, обусловленном реактивированной сочетанной ВЭБ-инфекцией или инфекцией ВГЧ 6: 23 (92,0%) детей по сравнению с 7 (58,33%) в

группе 4 и 14 (56%) в группе 5, $p_{3-4}=0,025$ и $p_{3-5}=0,0045$ соответственно. Проведенный анализ позволяет трактовать наличие спленомегалии в пользу инфекционного мононуклеоза, обусловленного первичной моно ВЭБ-инфекцией; комбинации симптомов затрудненного носового дыхания и гепатомегалии в пользу инфекционного мононуклеоза, обусловленного первичной ВЭБ-инфекцией в составе микст-этиологических вариантов заболевания.

Клиническая картина ИМ, обусловленного ВГЧ 6, представлена классическим симптомокомплексом.

Установлено, что среднее содержание относительного числа нейтрофилов в группе 1 составляет $35,89 \pm 3,99\%$ и значительно отличается от среднего содержания относительного числа нейтрофилов в группе 2 – $63,75 \pm 4,66\%$ ($p_{1-2}=0,000061$), группе 3 – $50,00 \pm 5,30\%$ ($p_{1-3}=0,036$), группе 4 – $62,5 \pm 6,33\%$ ($p_{1-4}=0,0011$) и в группе 5 – $51,56 \pm 5,81\%$ ($p_{1-5}=0,027$). Анализ по абсолютным величинам нейтрофилов у пациентов подтвердил указанные различия между группами 1 и 2 – $4701,98 \pm 619,86$ и $9252,31 \pm 1303,39$ соответственно, $p_{1-2}=0,0011$, а также между группами 1 и 4 – $4701,98 \pm 619,86$ и $9507,30 \pm 2516,33$, $p_{1-4}=0,015$.

Учитывая известную взаимосвязь нейтрофилиза в периферической крови с наличием бактериальной инфекции, нами были проанализированы следующие клиничко-лабораторные параллели: соотношение синдрома фарингита/тонзиллита с учетом характера наложений и частотой трансформации налетов в гнойные с микробиологическим подтверждением бактериального генеза тонзиллита. Распределение частоты развития фарингита/тонзиллита и частоты неспецифических инфекционно-воспалительных осложнений во всех группах было одинаковым. Патологическая микрофлора в посевах из ротоглотки у всех обследованных пациентов не обнаруживались. Повышенный уровень нейтрофилов в периферической крови являлся достоверным дифференциальным лабораторным признаком формирования инфекционно-воспалительных осложнений только в группе с изолированной ВЭБ-инфекцией в стадии реактивации: детей с неосложненным течением инфекционного мононуклеоза уровень абсолютного числа нейтрофилов был 7102 ± 1543 кл/мкл, у детей с осложненным течением – 12478 ± 1647 кл/мкл, $p=0,038$ (рис. 1).

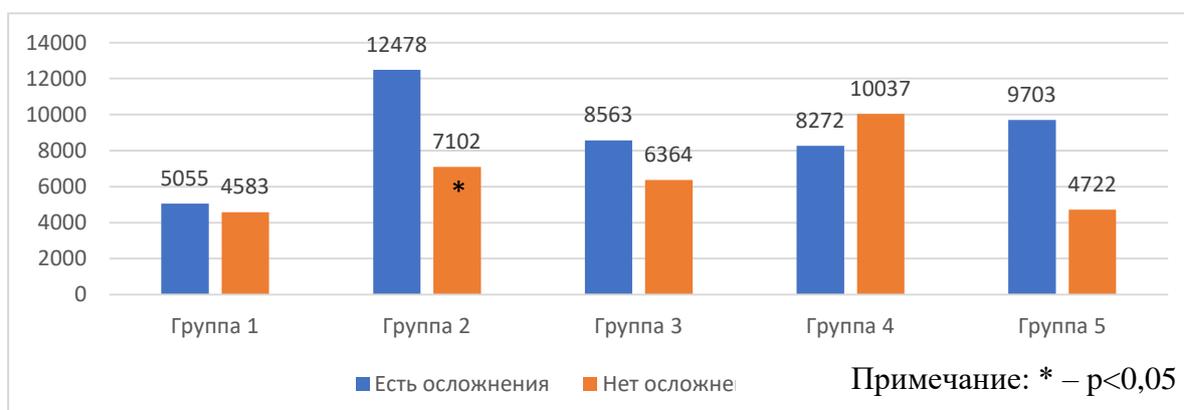


Рисунок 1. Абсолютные значения содержания нейтрофилов (кл/мкл) в периферической крови в этиологических группах при наличии и отсутствии неспецифических инфекционно-воспалительных осложнений

Проведенный анализ показал, что повышение абсолютного количества нейтрофилов в периферической крови характеризует как осложненное, так и неосложненное течение ИМ у детей. Учитывая установленные в исследовании сроки развития бактериальных неспецифических осложнений ИМ – 5 дней (LQ: 3 дня – UQ: 10 дней), при наличии повышения числа нейтрофилов в крови в сочетании с дополнительными клиническими маркерами бактериальных осложнений или без таковых, целесообразно расширить диагностический алгоритм. Наиболее оптимальными для дополнительного обследования пациентов, являются сроки, начиная с 3-го дня от начала заболевания. Не рекомендуется немедленное назначение антибактериальной терапии без доказанной бактериальной инфекции. Дополнительным клиническим обоснованием выбора тактики антибактериальной терапии при ИМ является взаимосвязь возникновения токсико-аллергического кожного синдрома в присутствии ряда антибиотиков. В нашем исследовании частота возникновения экзантемы на фоне антибактериальной терапии составила от 16 до 32% случаев при разно-этиологических вариантах ИМ. При этом обоснованность назначения антибиотика составила не более чем у 14 % пациентов с экзантемой.

При развитии пневмонии было установлено, что в группе 1 чаще отмечался нейтрофилез в периферической крови, чем в группе 2 (соответственно 2,09 и 1,27, $p > 0,05$), что согласуется с данными о снижении иммунной реактивности организма при реактивации хронической ВЭБ. В группе 2 при исследовании биологических субстратов у пациентов с тонзиллитом бактериологическим методом выявлено, что флора была представлена в 100% случаев условно-патогенными бактериями (УПБ) – *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus viridans*, *Enterococcus sp.* и грибами – *Candida albicans*: в группе 2 у 4 человек (28,6%) по сравнению с группой 1 у 2 человек (18,2%), $p > 0,05$, что в 1,6 раза чаще и может косвенно свидетельствовать о более выраженном снижении местного иммунитета при реактивации ВЭБ-инфекции, а установленное в нашем исследовании достоверное повышение абсолютного числа нейтрофилов при формировании бактериальных осложнений у пациентов исключительно в этой группе демонстрирует важность уточнения фазы инфекции для дифференцированной практической рекомендации по тактике назначения антибиотиков детям с ИМ.

Катамнестическое наблюдение установило, что неблагоприятный исход ИМ с формированием хронической инфекции достоверно преобладает у детей с ВЭБ-инфекцией (группа I) по сравнению с другими (группа II) (табл. 3).

Таблица 3.

Частота неблагоприятного исхода инфекционного мононуклеоза

Исход заболевания	Группа I n=82	Группа II n=25	P
	(чел. / %)	(чел. / %)	
Клиническое выздоровление	66 / 80,49%	25 / 100,00%	0,02
Исход в хроническое течение инфекции	16 / 19,51%	0 / 0,00%	

Нами были проанализирован риск неблагоприятного исхода ИМ в зависимости от этиологии с помощью анализа Отношений Шансов (ОШ) и Отношений Рисков (ОР), что отражено в таблице 4.

Таблица 4.

Риск неблагоприятного исхода инфекционного мононуклеоза

Этиологический вариант ИМ	Клиническое выздоровление, чел (%)	Исход в хроническое течение инфекции, чел (%)	ОШ (95% ДИ)	ОР (95% ДИ)
	p=0,021 (точный двусторонний критерий Фишера)		p=0,081	p=0,0001
Группа I n=82	66 (80,49%)	16 (19,51%)	0,079 (0,005 – 1,367)	0,805 (0,724 – 0,895)
Группа II n=25	25 (100,00%)	0 (0,00%)		

Проведенный анализ показал, что инфекционный мононуклеоз ВЭБ-этиологии является фактором риска хронического течения по сравнению с другими этиологическими вариантами заболевания: анализ ОР показывает, что в группе I исход в виде клинического выздоровления наступает реже, чем в группе II, где шансы на выздоровление выше и по показателю ОШ. При этом первичный моно-ВЭБ ИМ является наиболее неблагоприятным прогностическим этиологическим вариантом – 21 пациент (72,41%) с исходом в клиническое выздоровление по сравнению с 8 детьми (27,59%) с исходом в хроническое течение инфекции, ОШ при сравнении с другими этиологическими вариантами ИМ составило 0,3000 (95% ДИ (0,1004 – 0,8964), p=0,03).

Полученный результат имеет значение для обоснования внедрения в клиническую практику обязательной этиологической расшифровки ИМ и представляет научный и практический интерес для дальнейших исследований и разработки тактики ведения в острый период и период реконвалесценции пациентов с разными этиологическими вариантами ИМ.

Учитывая преобладание ВЭБ в этиологической структуре анализируемой выборки пациентов с ИМ (82 ребенка – 76,6%), нами, в первую очередь, было проанализировано распределение маркеров различных фаз активной ВЭБ инфекции. Фаза инфекционного процесса может быть установлена при исследовании панели противовирусных антител методом ИФА.

Анализ значимости применения метода ПЦР в расшифровке этиологии ИМ у обследованных детей нами проведен в нескольких аспектах: диагностический диапазон вирусной нагрузки в мононуклеарах периферической крови для различных герпесвирусов; возрастные особенности; взаимовлияние герпесвирусов при сочетанной этиологии на их детекцию.

У детей с инфекционным мононуклеозом ВЭБ-этиологии (n=67) в период разгара при сравнении подгрупп, различающихся уровнем вирусной нагрузки ДНК

ВЭБ в мононуклеарах периферической крови более 2,7 lg и менее 2,7 lg выявлены достоверные различия. Уровень вирусной нагрузки в большинстве случаев был менее 2,7 lg (51 человек – 76,12%), и только у 16 человек (23,88%) нагрузка превышала 2,7 lg ($p < 0,05$, z-тест). Проведенный анализ в возрастном аспекте подтвердил достоверную разницу в пользу низкой вирусной нагрузки у детей дошкольного возраста. При ВГЧ 6-этиологии ИМ у детей анализ по подгруппам, различающихся уровнем вирусной нагрузки в мононуклеарах периферической крови показал более чем в 25 раз чаще регистрируемую низкую вирусную нагрузку. Концентрация ДНК ВГЧ 6 в мононуклеарах крови $>2,7$ lg регистрировалась у 3,8% пациентов, а $<2,7$ lg – в 96,2% случаев. Выявить закономерности распределения уровня вирусной нагрузки у детей с ЦМВ-этиологией ИМ не представлялось возможным из-за малочисленности выборки.

Таким образом, концентрация копий ДНК ВЭБ и ВГЧ 6 в мононуклеарах периферической крови является диагностической в любом ее числовом значении, что научно обосновывает применение как количественных, так и качественных тест-систем для метода ПЦР при инфекционном мононуклеозе у детей.

Поскольку наиболее частыми возбудителями ИМ являются ВЭБ и ВГЧ 6, нами была проанализирована связь между частотой выявления ДНК этих герпесвирусов методом ПЦР (табл. 5).

Таблица 5.

Анализ частоты выявления ДНК вируса Эпштейна-Барр и ДНК вируса герпеса человека 6 методом ПЦР

Концентрация вирусной ДНК		ВЭБ						Значение p
		$<2,7$ lg копий/ 10^5 клеток		$>2,7$ lg копий/ 10^5 клеток		Отрицательно		
		N	%	N	%	N	%	
ВГЧ 6	$<2,7$ lg копий/ 10^5 клеток	16	32,0%	4	25,0%	30	73,2%	$<0,001^*$
	$>2,7$ lg копий/ 10^5 клеток	0	0,0%	1	6,3%	1	2,4%	
	Отрицательно	35	70,0%	11	68,8%	9	22,0%	

Примечание: * - Критерий хи-квадрат Пирсона

Анализ поставленной нами нулевой гипотезы об отсутствии влияния вирусов на детекцию в мононуклеарах периферической крови с применением критерия хи-квадрат Пирсона ее опроверг и показал, что частоты выявления ДНК ВЭБ и ДНК ВГЧ 6 методом ПЦР не являются взаимно независимыми ($p < 0,001$). Выявление одного из вирусов уменьшает шанс выявить другой вирус, что также подтверждено анализом отношения шансов – ОШ=0,133; 95% ДИ от 0,0537 до 0,3273, $p < 0,0001$.

Для решения 4-ой задачи применен метод клеточного биочипа, с помощью которого проанализирован иммунный ответ пациентов с инфекционным мононуклеозом. Сопоставления показателей иммунного статуса в клинических группах наблюдаемых детей проводились с показателями референсных интервалов здоровых детей (контроль).

При анализе результатов исследования иммунного статуса детей с инфекционным мононуклеозом от 1 года до 7 лет установлены наиболее значимые отклонения при первичной моно-ВЭБ этиологии и представлены были повышением доли CD8+ клеток, HLA-клеток, доли CD8+ клеток с морфологией атипичного мононуклеара от всех лимфоцитов, и доли атипичных мононуклеаров от всех CD8+-клеток. Установленные изменения свидетельствуют о выраженной активации противовирусного ответа при первичной встрече с вирусом Эпштейна-Барр (1 и 3 группы) по сравнению с характером иммунологических реакций при реактивации ВЭБ и при других герпесвирусных возбудителях ИМ. Аналогичные изменения иммунного статуса установлены в исследуемых группах детей в возрасте старше 7 лет, что позволило проводить дальнейший анализ в целом в группах сравнения, различающихся по этиологии ИМ. Морфология атипичного мононуклеара, визуализируемая методом клеточного биочипа, представлена на рисунке 2.

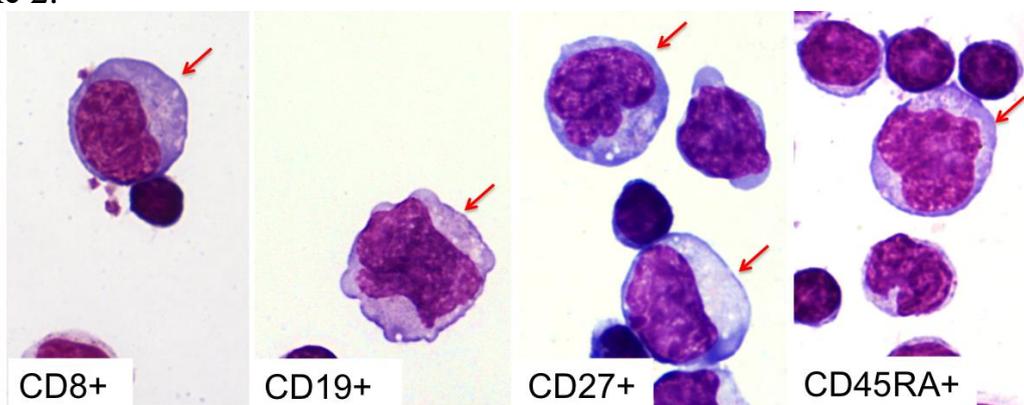


Рисунок 2. Вид атипичных мононуклеаров, положительных по разным дифференцировочным кластерам.

Нами установлено, что клетки с морфологией атипичных мононуклеаров в подавляющем большинстве положительны по CD8+, то есть относятся к цитотоксическим Т-лимфоцитам.

Особенности иммунного ответа пациентов в изучаемых группах представлены в таблице 6.

Таблица 6.

Показатели клеточного иммунитета детей с инфекционным мононуклеозом в исследуемых группах (метод клеточного биочипа)

Показатель	Результат				
	Группа 1, n=29	Группа 2, n=16	Группа 3, n=25	Группа 4, n=12	Группа 5, n=25
Доля CD4+, %	n=26 / 21,8±2,50%	n=12 / 28,1±3,77%	n=25 / 26,4±2,64%	n=11 / 29,1±4,38%	n=19 / 30,9±2,79%
Доля CD8+, %	n=26 / 42,0±4,29%*** *	n=12 / 21,7±3,07%*	n=25 / 33,5±3,94%	n=11 / 25,5±3,85%	n=19 / 18,9±1,50%* *
	* – достоверность различий в группе 1 и группе 2, p<0,05; ** – достоверность различий в группе 1 и группе 5, p<0,05				
Доля CD19+, %	n=26 / 13,1±1,59%*	n=12 / 16,9±2,17%	n=25 / 12,5±1,54%***	n=11 / 21,9±3,11%***	n=19 / 18,8±1,81%

					*
	* – достоверность различий в группе 1 и группе 3, p<0,05; ** – достоверность различий в группе 1 и группе 4, p<0,05				
Доля HLA-DR+, %	n=26 / 63,7±5,71%*** ****	n=12 / 31,8±3,65%*	n=23 / 47,3±4,28%	n=11 / 37,3±5,65%**	n=8 / 34,0±2,96%* **
	* – достоверность различий в группе 1 и группе 2, p<0,05; ** – достоверность различий в группе 1 и группе 4, p<0,05; *** – достоверность различий в группе 1 и группе 5, p<0,05				
Доля CD8+ AM от CD45RA+, %	n=26 / 15,3±2,51%** *	n=10 / 2,2±0,55%*	n=24 / 11,9±2,81%	n=8 / 3,3±1,08%	n=16 / 2,8±0,55%**
	* – достоверность различий в группе 1 и группе 2, p<0,05; ** – достоверность различий в группе 1 и группе 5, p<0,05				
Доля AM от CD8+, %	n=26 / 32,5±4,05%*	n=10 / 9,1±1,21%*	n=24 / 30,6±3,84%**	n=9 / 15,6±3,68%	n=13 / 11,4±1,74%* **
	* – достоверность различий в группе 1 и группе 2, в группе 1 и группе 5 p<0,05; ** – достоверность различий в группе 3 и группе 2, в группе 3 и группе 5, p<0,05;				
CD4/CD8	n=26 / 0,8±0,15*	n=12 / 1,4±0,16	n=25 / 1,0±0,14**	n=11 / 1,5±0,14	n=19 / 1,7±0,17***
	* – достоверность различий в группе 1 и группе 3, p<0,05; ** – достоверность различий в группе 1 и группе 5, p<0,05				

Различия в доле различных подгрупп иммунных клеток составили более чем в 2 раза для доли CD8+ и HLA-DR+ и от 3 до 7 раз при сравнении по группам по доле атипичных мононуклеаров от всех CD8+ клеток в группах 1 и 3, что позволяет применить метод клеточного биочипа как дополнительный при клинической интерпретации этиологии ИМ в пользу первичной ВЭБ моно- или комбинированной с другими герпесвирусами этиологии заболевания, а также реактивированной ВЭБ-инфекции и реактивированной ЦМВ-инфекций в комбинации с ВГЧ 6, характеризующихся низким уровнем HLA-DR+-клеток и доли (%) атипичных мононуклеаров от CD8+. Учитывая тот факт, что согласно отечественной классификации инфекционного мононуклеоза (Нисевич Н.И., Учайкин В.Ф.) для диагностики важным лабораторным критерием является обнаружение AM в концентрации более 10% в периферической крови, мы провели анализ диагностической значимости метода клеточного биочипа в исследуемых группах (рис.3).

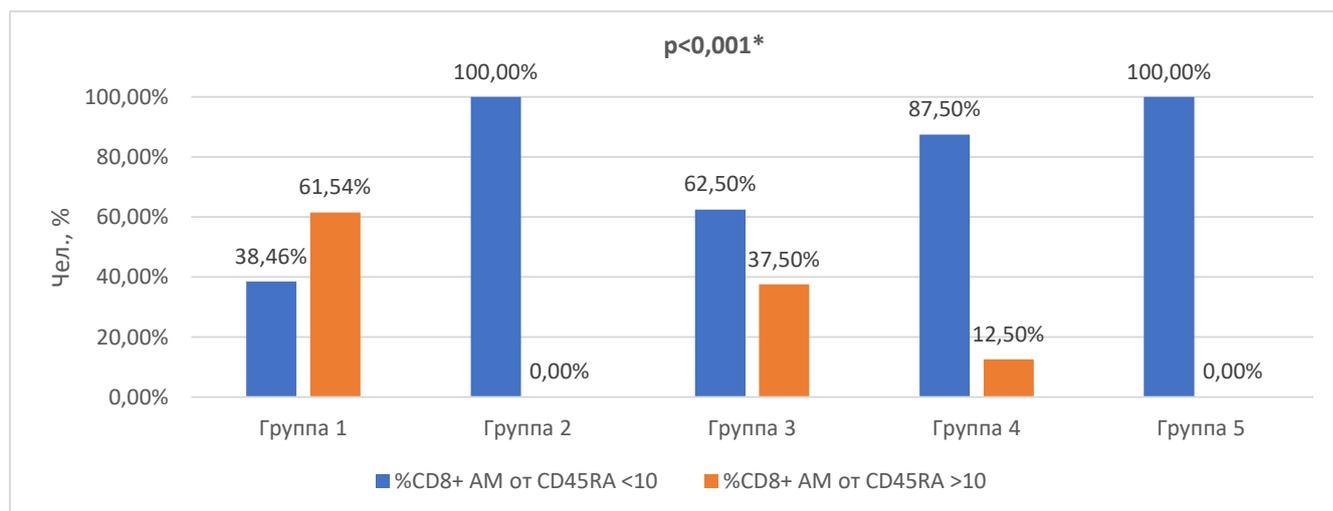


Рисунок 3. Процент атипичных мононуклеаров по данным клеточного биочипа (CD8+ АМ от CD45RA) по группам

Примечание: * - критерий хи-квадрат Пирсона

При сопоставлении двух методов выявления АМ различия также были значимыми. Наиболее показательными эти различия установлены в группе детей с долей клеток от всех лимфоцитов с морфологией атипичных мононуклеаров, связавшихся моноклональными антителами к CD8+ (%CD8+ АМ от CD45RA) <10%, обнаруженных методом клеточного биочипа. В большинстве случаев отмечалось отсутствие атипичных мононуклеаров в периферической крови, определяемых в рутинном клиническом анализе, в разгар заболевания – в группе 1 – 72,7% пациентов, в группе 2 – 86,7%, в группе 3 – 61,5%, в группе 4 – 100% пациентов и в группе 5 – 94,4%. Это позволяет трактовать результаты метода клеточного биочипа как более чувствительные по отношению к данному параметру, особенно у пациентов с реактивированными герпесвирусами в этиологии ИМ.

Нами установлено, что между группами имеется достоверная разница в значении иммунорегуляторного индекса (ИРИ). В группах, представленных первичной ВЭБ его значение составило от 0,881±0,15% (группа 1) до 1,0±0,14%, (группа 3), тогда как в группе 5 он имел достоверно большее значение, сопоставимое с нормативным у здоровых детей – 1,7±0,17%, p<0,05. Снижение показателя ИРИ ниже нормативного (норма для здоровых детей Московского региона 1,0-1,6) может служить дополнительным диагностическим критерием в пользу первичной ВЭБ-этиологии инфекционного мононуклеоза.

Дальнейшие сопоставления нами проводились в этиологических группах ИМ, представленного первичной моно-ВЭБ инфекцией и другими вариантами герпесвирусных инфекций (табл. 7).

Таблица 7.

Показатели клеточного иммунитета детей с инфекционным мононуклеозом первичной ВЭБ этиологии и с другими вариантами инфекционного мононуклеоза

Показатель	Результат		P
	ИМ, обусловленный первичной ВЭБ (группа 1, группа 3). n=54	ИМ, обусловленный другими вариантами (группы 2,4,5). n=53	
Доля CD4, %	n=51 / 24,9±1,83%	n=42 / 29,6±1,97%	<0,05
Доля CD8, %	n=51 / 37,8±2,95%	n=42 / 21,4±1,51%	<0,05
CD4/CD8	n=51 / 0,9±0,10	n=42 / 1,6±0,10	<0,05
Доля CD19, %	n=51 / 12,8±1,10%	n=42 / 19,7±1,36%	<0,05
Доля CD38, %	n=36 / 51,2±4,28%	n=34 / 40,1±4,35%	<0,05
Доля HLA, %	n=49 / 56,0±3,79%	n=41 / 34,21±2,23%	<0,05
Доля CD8+ АМ от CD45RA, %	n=50 / 13,7±1,88%	n=34 / 2,7±0,39%	<0,05
Доля АМ от CD8, %	n=50 / 31,6±2,77%	n=32 / 11,9±1,34%	<0,05
Доля CD19+АМ 45RA, %	n=47 / 1,2±0,23	n=6 / 2,7±0,18%	<0,05

У пациентов с ИМ, вызванным первичной ВЭБ инфекцией, достоверно ниже средняя доля CD4-клеток (24,9±1,83%) и значение ИРИ менее 1,2 (средний уровень 0,9±0,10) по сравнению с группой ИМ, представленной другими вариантами

(29,6±1,97% и 1,6±0,10 соответственно), $p=0,042$ и $p < 0,00001$ соответственно. Также отмечается снижение среднего числа CD19+ клеток (12,8±1,10%) и доли CD19+ атипичных мононуклеаров от всех лимфоцитов (1,2±0,23%) в отличие от группы ИМ, не связанной с первичной ВЭБ-инфекцией (19,7±1,36% и 2,7±0,18% соответственно), $p=0,00039$ и $p=0,04$ соответственно. Вероятно, данное отклонение в иммунном статусе детей с ВЭБ-этиологией ИМ свидетельствует о цитопатическом действии как самого возбудителя, тропного к В-лимфоцитам, так и высоком противовирусном потенциале цитотоксических клеток CD8+ и AM от CD8+, направленном на инфицированные CD19+ лимфоциты. Подтверждением данной гипотезы могут служить следующие установленные нами отклонения в клеточном звене иммунитета пациентов с ИМ, обусловленным первичной ВЭБ-инфекцией – доля CD8+ клеток достоверно выше – 37,8±2,95% против 21,4±1,51% ($p=0,00001$); также выше доля CD38+ клеток – 51,2±4,28% против 40,1±4,35% ($p=0,07$); для HLA-DR+ клеток – 56,0±3,79% против 34,21±2,23% ($p < 0,00001$); доля CD8+ клеток с морфологией атипичных мононуклеаров от всех лимфоцитов – 13,7±1,88% против 2,7±0,39% ($p < 0,00001$); доля клеток с морфологией AM среди всех CD8+ клеток, 31,6±2,77% против 11,9±1,34% ($p=0,0000006$). Таким образом, метод клеточного биочипа может применяться как дополнительный при диагностике этиологии ИМ, ассоциированного с первичной ВЭБ-инфекцией в случаях затруднений интерпретации других лабораторных методов (ПЦР и ИФА) и с целью углубленной оценки клеточного иммунного ответа у пациентов с отсутствием AM в общем анализе крови при ИМ любой этиологии.

Учитывая установленный в исследовании риск неблагоприятного исхода ИМ в хроническое течение инфекции (ОШ=0,3; 95% ДИ от 0,1 до 0,9, $p < 0,03$) у пациентов с первичной ВЭБ инфекцией (в составе моноинфекции), нами проведен анализ прогностической значимости показателей иммунного ответа при оценке методом клеточного биочипа (табл.8, 9).

Таблица 8.

Результаты статистического ROC-анализа показателя иммунорегуляторного индекса по данным клеточного биочипа

CD4+/CD8+	р, критерий Манна-Уитни	AUC*, ROC-анализ	Оптимальный порог отсеечения
Первичная ВЭБ/реактивированная ВЭБ	0,00000008	0,81	1,1
Первичная ВЭБ инфекция/другие этиологические варианты	5E-11	0,72	1,1
Клиническое выздоровление/хроническое течение первичной ВЭБ инфекции	0,02	0,81	1,2

AUC* - площадь под ROC-кривой

Доказано, что при инфекционном мононуклеозе, обусловленном первичной ВЭБ-инфекцией иммунорегуляторный индекс $< 1,1$, тогда как при инфекционном мононуклеозе, вызванном другими вариантами - CD4+/CD8+ $> 1,1$ (чувствительность и специфичность 78%, $p=0,00000008$).

Доказано, что для первичной ВЭБ-инфекции с исходом в клиническое выздоровление характерен иммунорегуляторный индекс $<1,2$ (чувствительность этого критерия 17%, специфичность – 77%, $p=0,02$).

Таблица 9.

Результаты статистического ROC-анализа показателя доли CD8+ AM CD45RA по данным клеточного биочипа

Доля CD8+ AM CD45RA	p, критерий Манна-Уитни	AUC*, ROC-анализ	Оптимальный порог отсечения, ROC-анализ
Первичная ВЭБ/реактивированная ВЭБ	0,000000001	0,81	4,6%
Первичная ВЭБ инфекция/другие этиологические варианты	1E-15	0,84	4,6%
Клиническое выздоровление/хроническое течение первичной ВЭБ инфекции	0,02	0,74	7,4%

AUC* - площадь под ROC-кривой

При инфекционном мононуклеозе, обусловленном первичной ВЭБ-инфекцией, доля CD8+ AM CD45RA $>4,6\%$, тогда как для других вариантов инфекционного мононуклеоза (реактивированная ВЭБ и другие герпесвирусы) доля CD8+ AM CD45RA $<4,6\%$ (чувствительность – 78%, специфичность – 86%, $p=0,000000001$).

Для первичной ВЭБ-инфекции с исходом в хроническую инфекцию доля CD8+ AM CD45RA $>7,4\%$, (чувствительность этого критерия 67%, специфичность – 67%, $p=0,02$).

Характерной особенностью иммунного ответа детей на первичную ВЭБ-инфекцию является гиперпродукция Т-цитотоксических лимфоцитов, установленная у 85% обследованных детей как с моно-ВЭБ, так и комбинированной с другими герпесвирусами первичной ВЭБ-этиологией ИМ. Низкие показатели CD8+ клеток при повышении индекса ИРИ регистрируются у пациентов с неблагоприятным исходом ИМ в хроническое течение инфекции. Наиболее выраженная взаимосвязь установлена при прогнозировании риска неблагоприятного исхода в хроническую инфекцию при первичной ВЭБ-этиологии ИМ у детей, что отражено в разработанном нами алгоритме (рис.4) и убедительно доказывает прогностическую ценность метода клеточного биочипа в группе наибольшего риска неблагоприятного исхода заболевания.

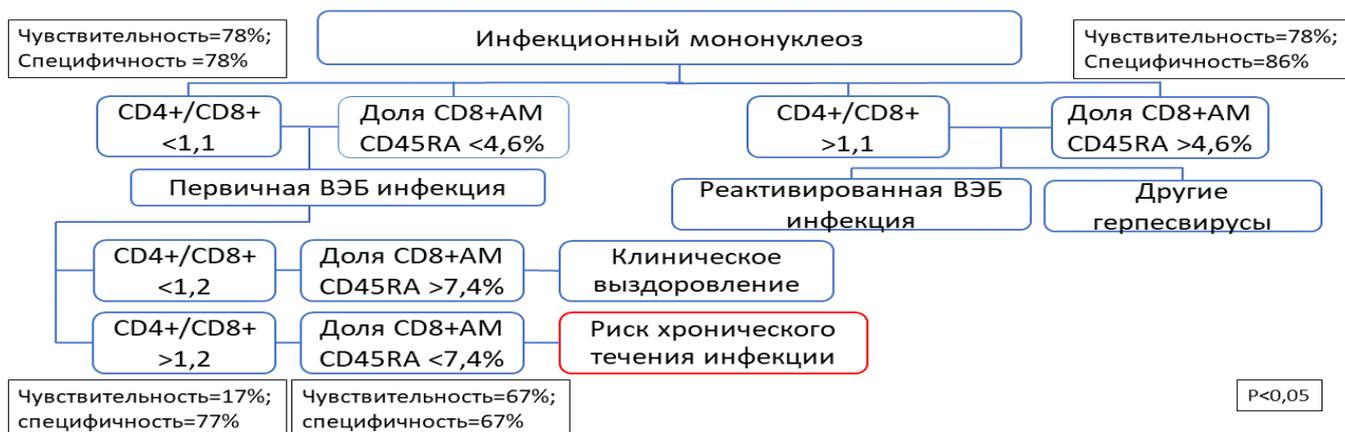


Рисунок 4. Алгоритм прогноза риска хронического течения инфекции при инфекционном мононуклеозе

Заключение

В ходе исследования систематизированы клинические и иммунологические особенности инфекционного мононуклеоза различной этиологии у детей, на их основе проведен анализ частоты исхода в хроническое заболевание и его взаимосвязь с этиологией и фазой инфекционного процесса. Установлено, что ВЭБ и ВГЧ 6 являются преобладающими агентами в структуре инфекционного мононуклеоза у детей. Выявлено, что при ИМ при первичной ВЭБ инфекции в сочетании с другими герпесвирусами достоверно чаще регистрируется затрудненное носовое дыхание и гепатомегалия, при первичной моно ВЭБ-инфекции – спленомегалия. Для ИМ ВГЧ 6 этиологии характерен типичный симптомокомплекс. Установлено, что ИМ, обусловленный вирусом герпеса человека 6 моно- и в комбинации с реактивированной цитомегаловирусной инфекцией, преобладает у мальчиков. Представлено научное обоснование тактики антибактериальной терапии при ИМ в зависимости от выявленного варианта заболевания. В результате исследования установлено, что обнаружение вирусной ДНК в мононуклеарах периферической крови методом ПЦР возможно без использования дополнительных локусов, в качественном варианте. Доказано, что метод клеточного биочипа позволяет уточнить этиологический вариант инфекционного мононуклеоза, фазу инфекционного процесса и может быть применен для прогноза исхода первичной ВЭБ-инфекции в хроническую.

Выявленные в исследовании клинические, лабораторные и вирусологические характеристики ИМ позволят врачу проводить этиологическую диагностику с уточнением фазы инфекционного процесса в острый период заболевания, выявить пациентов с риском формирования хронической инфекции, сформировать группы диспансерного наблюдения, что является основой для оптимизации тактики ведения детей с инфекционным мононуклеозом.

Выводы

1. В этиологической структуре первого эпизода инфекционного мононуклеоза у детей преобладают вирус Эпштейна-Барр и вирус герпеса человека 6. Клинические особенности инфекционного мононуклеоза при первичной инфекции вирус Эпштейна-Барр в составе микст-варианта представлены достоверно чаще регистрируемым затруднением носового дыхания и гепатомегалией; при первичной вирус Эпштейна-Барр инфекции моно-этиологического варианта заболевания – спленомегалией ($p < 0,05$). Клиническая картина инфекционного мононуклеоза, ассоциированного с вирусом герпеса человека 6, характеризуется типичным симптомокомплексом.

2. Гендерными особенностями инфекционного мононуклеоза являются: более высокая частота инфекции (в 2,6 раза) вирусом герпеса человека 6 типа в моноварианте и в комбинации с реактивированной цитомегаловирусной инфекцией у мальчиков; у девочек преобладает инфекция вирусом Эпштейна-Барр ($p < 0,05$).

3. Обнаружение вирусной ДНК герпесвирусов методом ПЦР и/или специфических противовирусных антител методом ИФА в первом эпизоде инфекционного мононуклеоза является оптимальным для этиологической расшифровки и позволяет дифференцировать первичную и реактивированную вирус Эпштейна-Барр инфекцию. Выявление вирусной ДНК в мононуклеарах крови без исследования материала из дополнительных локусов является необходимым и достаточным основанием для верификации этиологии, в том числе при применении качественных тестов, что оптимизирует использование метода ПЦР в рутинной практике.

4. Установлено взаимное влияние герпесвирусов при интерпретации результатов метода ПЦР – выявление ДНК одного из вирусов уменьшает шанс выявить ДНК другого, что является научным обоснованием внедрения диагностических тест-систем анти-IgM к вирусу герпеса человека 6.

5. Метод клеточного биочипа позволяет установить фазу инфекционного процесса при инфекционном мононуклеозе различной этиологии. Особенности инфекционного мононуклеоза при инфицировании вирусом Эпштейна-Барр являются достоверно более высокие показатели концентрации CD8⁺ клеток и числа атипичных мононуклеаров среди них, HLA-DR⁺ клеток, CD8⁺ атипичных мононуклеаров, сниженный показатель иммунорегуляторного индекса $0,8 \pm 0,15$. Для реактивированной ВЭБ-инфекции и реактивированной ЦМВ-инфекции в сочетании с инфекцией ВГЧ 6 характерно низкое содержание атипичных мононуклеаров среди CD8⁺ клеток.

6. Предикторами исхода инфекционного мононуклеоза в хроническую инфекцию являются: первичная ВЭБ-инфекция, доля CD8⁺ атипичных мононуклеаров от общего числа лимфоцитов менее 7,4 % и повышение иммунорегуляторного индекса $> 1,2$ по данным клеточного биочипа.

Практические рекомендации

1. Определение этиологии ИМ и фазы инфекционного процесса целесообразно с помощью совместного применения прямых (ПЦР) и опосредованных (ИФА) методов диагностики. Вспомогательным инновационным методом является метод клеточного биочипа.

2. Для дифференциальной диагностики инфекционного мононуклеоза различной этиологии в период разгара заболевания следует использовать комплекс клинических и лабораторных критериев: наличие в симптомокомплексе затрудненного носового дыхания, гепатомегалии, спленомегалии; обнаружение ДНК герпесвирусов в мононуклеарах крови методом ПЦР, выявление в крови анти-IgM к герпесвирусам (ИФА).

3. ПЦР-диагностика этиологии инфекционного мононуклеоза с помощью определения ДНК герпесвирусов в мононуклеарах крови без исследования

дополнительных локусов, что позволяет снизить финансовую нагрузку на лечебно-профилактическое учреждение.

4. Нейтрофилез является характерным лабораторным признаком острой фазы инфекционного мононуклеоза (с 3-го по 10-ый дни болезни) при первичном инфицировании и не является обязательным критерием наличия бактериальной инфекции, а также основанием назначения антибактериальной терапии. Вместе с тем, при наличии нейтрофилеза у пациентов с инфекционным мононуклеозом реактивированной моно ВЭБ-этиологии следует начинать антибактериальную терапию.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Демина О.И. Природа и клиническое значение атипичных мононуклеаров при инфекционном мононуклеозе / С.А. Кузнецова, О.И. Демина, О.С. Федянина, Т.А. Чеботарева // Материалы XVI конгресса детских инфекционистов России «Актуальные вопросы инфекционной патологии и вакцинопрофилактики». – 2017. – С.30; 1/0,25 с.

2. Демина О.И. Оценка иммунного статуса и морфологии атипичных мононуклеаров методом клеточного биочипа у пациентов с инфекционным мононуклеозом / О.И. Демина, А.Е. Задорожная // Материалы IX конференции молодых ученых с международным участием «Трансляционная медицина: возможное и реальное». – 2018. – Т.1. – С. 130 – 133. 4/2с.

3. Demina O. Prognostic role of CD8+ atypical mononuclear cells in infectious mononucleosis // O. Demina, S. Kuznetsova, O. Fedyanina, T. Chebotareva, L. Mazankova. Materials of 7th Congress of the European Academy of Paediatric Societies. – 2018; 1/0,2 с. URL: <https://www.morressier.com/article/05--prognostic-role-cd8-atypical-mononuclear-cells-infectious-mononucleosis/5b5f2d48b56e9b003813d9c2> (Дата обращения 17.06.2020).

4. Демина О.И. Особенность кожного синдрома при инфекционном мононуклеозе с высокой репликативной активностью ВГЧ-6 у ребенка с лекарственной аллергией: случай из практики / О.И. Демина, Л.Н. Мазанкова, Т.А. Чеботарева, С.А. Кузнецова, О.С. Федянина, Д.С. Тихомиров, И.М. Хегай, Т.А. Туполева, А.В. Тебеньков // Фарматека. – 2019. – Т.26, № 4. – С. 94 – 98; 5/0,56 с. ИФ – 0,457. <https://dx.doi.org/10.18565/pharmateca.2019.1.94-98>

5. Демина О.И. Иммунопатогенетическая роль плазмоцитоподобных дендритных клеток при Эпштейна-Барр-вирусной инфекции / О.Н. Учаева, И.П. Трякина, Г.В. Сапронов, О.И. Демина // Медицинский алфавит. – 2019. Т 3, № 32. – С. 24 – 28. – 5/1,25 с. ИФ - 0,309 [https://doi.org/10.33667/2078-5631-2019-3-32\(407\)-24-28](https://doi.org/10.33667/2078-5631-2019-3-32(407)-24-28)

6. Демина О.И. Клинические проявления инфекционного мононуклеоза при первичной или реактивированной герпесвирусной инфекции / О.И. Демина, Т.А. Чеботарева, Л.Н. Мазанкова, В.Б. Тетова, О.Н. Учаева // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2020. – Т. 65, № 1. – С. 37 – 44. – 8/1,6 с. ИФ – 0,672. (SCOPUS) <https://doi.org/10.21508/1027-4065-2020-65-1-37-44>.

7. Демина О.И. Значимость прямых и косвенных лабораторных тестов для верификации этиологии инфекционного мононуклеоза / Т. А. Чеботарёва, О. И. Демина, Д.С. Тихомиров, Л.Н. Мазанкова, Т.А. Туполева // Сборник тезисов научно-практической конференции с международным участием «Применение высоких инновационных технологий в профилактической медицине». 2020. – с. 15 – 16. 2/0,4 с.

8. Демина О.И. Клиническая значимость вирусологических методов верификации этиологии инфекционного мононуклеоза / О. И. Демина, Д.С. Тихомиров, Т.А. Чеботарёва, Л.Н. Мазанкова, Т.А. Туполева // Детские инфекции. – 2020. – Т. 20, № 2. – с. 29-37. 9/1,8 с. ИФ – 0,688 <https://doi.org/10.22627/2072-8107-2020-19-2-29-37>.

9. Demina O.I. The nature and clinical significance of atypical mononuclear cells in infectious mononucleosis caused by the Epstein-Barr virus in children / O.S. Fedyanina, A.E. Filippova, O.I. Demina, O.A. Zhuliabina, D.S. Tikhomirov, A.V. Filatov, T.A. Chebotareva, S.A. Kuznetsova // The Journal of Infectious Diseases. – 2020. Accepted manuscript. 1/1,25. doi: 10.1093/infdis/jiaa601 (URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32959062/>).

10. Демина О.И. Инфекционный мононуклеоз у детей: клинико-лабораторная характеристика в зависимости от этиологии и фазы инфекционного процесса / О.И. Демина, Т.А. Чеботарева, Л.Н. Мазанкова, В.Б. Тетова, О.Н. Учаева // Инфекционные болезни. – 2020. – Т.18, №3. – с. 62–72. 11/2,2 с. ИФ – 0,734 DOI: 10.20953/1729-9225-2020-3-62-7

Список сокращений

ВГЧ 6	Вирус герпеса человека 6
ВЭБ	Вирус Эпштейна-Барр
Доля %CD8+ AM от CD45RA	Процент атипичных мононуклеаров
ИМ	Инфекционный мононуклеоз
ИРИ	Иммунорегуляторный индекс
ИФА	Иммуноферментный анализ
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
у.е.	Условные единицы
ЦМВ	Цитомегаловирус
CD	Cluster of differentiation (дифференцировочный кластер)
CMV	Цитомегаловирус
EBV	Вирус Эпштейна-Барр
HHV 6	Вирус герпеса человека 6
IgG	Иммуноглобулин класса G
IgG-EA	Иммуноглобулин класса G к раннему антигену ВЭБ
IgG-EBNA-1	Иммуноглобулин класса G к ядерному антигену ВЭБ
IgM	Иммуноглобулин класса M
IgM-VCA	Иммуноглобулин класса M к капсидному антигену ВЭБ
%AM от CD8	Доля клеток с морфологией AM, связавшихся с CD8+.

