

На правах рукописи

ТУРУКИНА НАДЕЖДА ВИТАЛЬЕВНА

**ОСОБЕННОСТИ ГЕНОДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННОГО
МОНОНУКЛЕОЗА У ДЕТЕЙ С УЧЕТОМ КЛИНИКО-
ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ**

14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология

АВТОРЕФЕРАТ

**на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

УФА 2010

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор
Жестков Александр Викторович

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук
Азнабаева Лилия Фаритовна
доктор медицинских наук, профессор
Молотилев Борис Александрович

Ведущая организация – Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Саратовский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию».

Защита состоится «29» декабря 2010 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета ДМ 208.006.05 при Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Башкирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию» по адресу: 450000, г. Уфа, ул. Ленина, 3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Башкирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию» по адресу: 450000, г. Уфа, ул. Ленина, 3.

Автореферат разослан «28» ноября 2010 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Лукманова К.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Инфекционный мононуклеоз – широко распространенное среди детей и взрослых инфекционное заболевание, вызванное вирусом Эпштейна–Барр (ВЭБ). Поскольку вирус не элиминируется из организма и обладает тропностью к лимфоидной и ретикулярной ткани, моделируется своеобразный иммунопатологический процесс, затрагивающий все звенья иммунной системы. Отмечена активная пролиферация инфицированных вирусом лимфоцитов во всех органах, имеющих лимфоидную ткань, с инфильтрацией и гистологическими изменениями в лимфатических узлах, печени, селезенке и др. Это обуславливает полиморфизм симптоматики и осложнений при инфекционном мононуклеозе [Хаитов Р.М., 2007].

Сложность клинической диагностики этого заболевания усугубляется разнообразием клинических форм инфекционного мононуклеоза и схожести клинических проявлений мононуклеозоподобных состояний (ЦМВ – инфекция и другие). Нам не встретилось работ, в которых был использован комплексный подход к диагностике инфекционного мононуклеоза, включающий современные методы генодиагностики (полимеразная цепная реакция) и оценку клинико-иммунологического статуса во взаимосвязи с особенностями перинатального периода. Между тем изучение инфекционного мононуклеоза у детей с указанных позиций весьма актуально в связи с ростом частоты заболевания, отсутствием специальной вакцинопрофилактики, трудностями в диагностике и необходимостью разработки специфических, высокоэффективных методов лабораторного контроля и профилактики данного заболевания на разных этапах его развития.

Цель исследования

Улучшение диагностики инфекционного мононуклеоза у детей на основе определения генодиагностических и иммунологических критериев развития и прогрессирования заболевания.

Задачи исследования

1. Исследовать особенности формирования иммунного ответа при инфекционном мононуклеозе у детей в зависимости от тяжести течения заболевания.
2. Изучить динамику содержания в сыворотке крови провоспалительных цитокинов в комплексе с иммунологическими показателями у детей в зависимости от тяжести течения заболевания.
3. Определить сравнительную чувствительность и специфичность выявления возбудителя инфекционного мононуклеоза у детей методами полимеразной цепной реакции и иммуноферментного анализа для верификации диагноза.
4. Разработать лабораторные критерии для прогноза развития тяжелого течения инфекционного мононуклеоза у детей.

Научная новизна исследования

Впервые осуществлен комплексный подход к обследованию детей с мононуклеозоподобными заболеваниями с применением метода выявления возбудителя ВЭБ-инфекции в биологическом материале (слюна) методом ПЦР, в сочетании с серологическими (ИФА-диагностика) и иммунологическими (цитокиновый профиль) критериями оценки инфекционного мононуклеоза.

Выявлена высокая чувствительность (97,1%) и специфичность (98,9%) метода ПЦР, по сравнению с ИФА-диагностикой (чувствительность - 58,8%, специфичность - 57,4%), для ранней и дифференциальной диагностики клинических форм инфекционного мононуклеоза с заболеваниями, имеющими сходную клиническую картину.

Установлена зависимость тяжести течения болезни от уровня продукции провоспалительных цитокинов. Среднетяжелое течение характеризовалось незначительным увеличением ИЛ-6 и ИЛ-8 (менее 100 пг/мл), тяжелое течение, наряду с гиперпродукцией ИЛ-6 и ИЛ-8 (более 100 пг/мл), сопровождалось значительным увеличением ИЛ-1 β , ФНО- α , ИФ- γ (более 100 пг/мл) в сыворотке крови.

Практическая значимость работы

Выявлена зависимость раннего дебюта инфекционного мононуклеоза от насыщенности патогенными воздействиями в перинатальном периоде.

Разработаны и внедрены в практику клиничко-иммунологические показания для проведения генодиагностики инфекционного мононуклеоза. Выявлена специфичность отклонения иммунологических показателей в периферической крови у детей с инфекционным мононуклеозом.

Внедрение результатов исследований в практику

Результаты проведенных исследований включены в программу практических занятий и лекционного курса на кафедре общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии ГОУ ВПО Самарский государственный медицинский университет Росздрава, используются в практической работе ММУ ГБ № 5 г. Самары.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. При инфекционном мононуклеозе у детей развивается иммунопатологический процесс, характеризующийся активацией Th1 - пути клеточного иммунного ответа в виде увеличения в периферической крови Т-лимфоцитов (CD3+, CD8+) и повышением ИЛ-6 и ИЛ-8 в сыворотке крови при среднетяжелом течении заболевания. Тяжелое течение сопровождается выраженным увеличением количества (CD3+, CD4+, CD8+, CD95+) лимфоцитов при выраженном повышении в сыворотке крови провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ИФ- γ и ФНО- α (более 100 пг/мл) и нарушением антителообразования, в том числе специфических антител.

2. Метод ПЦР – диагностики выявления ВЭБ при остром инфекционном мононуклеозе обладает высокой чувствительностью (97,1%) и специфичностью (98,9%) по сравнению с ИФА (чувствительность - 58,8%, специфичность – 57,4%). Сочетание ПЦР и ИФА повышают возможности диагностики до 99,2%.

Апробация работы

Работа апробирована на совместном научном заседании кафедр общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии, госпитальной педиатрии, детских инфекций, детских болезней, фармакологии ГОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию» и на заседании диссертационного совета ДМ 208.006.05 при ГОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию». Материалы диссертации доложены на Российской научно-практической конференции «Среда обитания и охрана здоровья населения регионов России в условиях реформирования здравоохранения» (Самара, 1999), национальной конференции «Гигиена на рубеже XXI века» (Воронеж, 2000), на научно-практической конференции «Гигиенические проблемы охраны здоровья населения (Самара, 2000), на XII конгрессе педиатров России «Актуальные проблемы педиатрии» (Москва, 2008), на Всероссийском ежегодном конгрессе «Инфекционные болезни у детей: диагностика, лечение и профилактика» (Санкт-Петербург, 2010).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ, из них 1 - в журнале, рекомендованном в перечне ВАК РФ («Нижегородский медицинский журнал»).

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 121 страницах, содержит 11 таблиц и 11 рисунков. Она состоит из введения, обзора литературы, 2 глав собственных исследований, обсуждения, заключения выводов и практических рекомендаций. Список литературы содержит 154 источника (62 отечественных и 92 зарубежных).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Комплексные клинико-лабораторные исследования проведены у 70 детей в возрасте 3–17 лет, больных инфекционным мононуклеозом, находящихся на стационарном лечении в отделении № 2 ММУ Городская детская инфекционная больница № 5 г. Самары (главный врач – к.м.н., доцент С.М. Китайчик).

Реконвалесцентов острой ВЭБ-инфекции наблюдали в кабинетах инфекционных заболеваний детских поликлиник г. Самара по месту жительства через 3 и 6 месяцев после выписки в количестве 115 человек.

Отдаленные результаты оценивали путем клинико-иммунологического обследования 115 детей (70 мальчиков и 45 девочек) реконвалесцентов острой ВЭБ-инфекции через 3 месяца после перенесенного заболевания (n=65) и 6 месяцев (n=50) в возрасте 3 – 17 лет. Из них 50 человек наблюдались в динамике до лечения, через 3 и 6 месяцев после лечения. В качестве контрольной группы выступали 30 практически здоровых детей в возрасте 3 – 17 лет (18 мальчиков и 12 девочек).

Диагноз инфекционный мононуклеоз выставлялся врачами-инфекционистами на основе клинико-лабораторных данных. Выборка наблюдаемых больных детей проводилась сплошная за период 5 месяцев. Критериями исключения служили возраст детей менее 3 лет, наличие соматической и хронической воспалительной патологии.

Всем 70 наблюдаемым больным проводили традиционные клинико-лабораторные исследования: общий анализ крови в динамике болезни, общий анализ мочи, биохимический анализ крови (определение общего билирубина и его фракций, аланин- и аспаратаминотрансфераз). Среди показателей гуморальных факторов иммунитета изучали уровень содержания в сыворотке крови основных классов иммуноглобулинов (IgA, IgM, IgG) методом радиальной иммунодиффузии в агаровом геле по Манчини (тест-системы НПО «Микроген», Н.Новгород), выражали концентрацию иммуноглобулинов в граммах белка на литр сыворотки (г/л) (Комитет экспертов ВОЗ, 1981).

Определяли содержание циркулирующих иммунных комплексов, основанных на нефелометрии различной растворимости мономеров иммуноглобулинов в составе иммунных комплексов при наличии в среде 4 % полиэтиленгликоля (ПЭГ 6000).

Систему комплемента оценивали путем титрования по 50% гемолизу эритроцитов барана, результаты выражали в условных единицах гемолитической активности.

Иммунологическое обследование включало также изучение основных показателей клеточных факторов иммунитета. Проводили оценку фенотипа лимфоцитов по наличию дифференцировочных антигенов на поверхности клеток методом непрямой иммуофлюоресценции с помощью моноклональных антител (типировали CD4+, CD8+, CD16+, CD95+ маркеры, вычисляли индекс - соотношение CD4+/CD8+ клеток)(ООО «Сорбент», Москва).

Проводили количественное определение в сыворотке крови провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ФН- α , ИФ- γ) твердофазным иммуноферментным методом. В качестве индикаторного фермента применяли пероксидазу хрена. Для определения концентраций использовали тест-системы производства ООО «Протеиновый контур» (г. Санкт-Петербург, Россия).

Определяли специфические антитела к вирусам Эпштейн-Барра (ВЭБ) классов М и G методом иммуноферментного анализа с использованием тест-систем ЗАО «Вектор-Бест» (Новосиб. обл., Россия): Вектор ВЭБ-NA-IgG, Вектор ВЭБ-EA-IgG, Вектор ВЭБ-VCA-IgM, Вектор ВЭБ-VCA-IgG.

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) проводили в три этапа: изоляция ДНК, собственно ПЦР и детекция продукта ПЦР по методике Федорова Н.А. (1996), использовали тест-системы производства НПФ «Литех» (г. Москва, Россия). Метод позволяет осуществлять амплификацию при помощи фермента термостабильной ДНК-полимеразы из 4-х дезоксинуклеозидтрифосфатов, являющихся структурными элементами ДНК, и коротких олигонуклеотидных 30-членных затравок (праймеров), комплементарных 3-х концевым последовательностям антипараллельных цепей ДНК гена. В качестве биологического материала выступала слюна.

Была проведена оценка иммунной системы в динамике до лечения (n=70), через 3 месяца (n=65) и через 6 месяцев (n=50) после выписки из стационара.

Иммунологические исследования проводили на кафедре общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии ГОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию» (зав. кафедрой - д.м.н., профессор А.В. Жестков), ПЦР-диагностику и ИФА на базе ООО «Лабораторно-консультационный центр» (зав. лабораторией Н.В. Турукина).

В динамике лечения проводилась клинико-иммунологическая оценка 35 детей, больных инфекционным мононуклеозом: 20 человек, наряду с симптоматической терапией, получали интерферонотерапию рекомбинантным интерфероном- $\alpha 1$ (Виферон, пр-во Россия) в виде ректальных свечей детям в возрасте до 6 лет в дозе 150000 МЕ ежедневно в течение 5-ти дней; детям старшего возраста по 500000 МЕ ежедневно в течение 5-ти дней. Группу сопоставления составили 15 человек, получавших симптоматическую терапию.

Статистическая обработка результатов проводилась параметрическими и непараметрическими методами с применением современных программных пакетов математико-статистического анализа. Отличия считали статистически значимыми при $p < 0,05$ (Реброва О.Ю., 2002).

Математическая обработка полученных параметрических данных проведена методом вариационной статистики с вычислением средних величин (M), ошибок среднеарифметической (m), стандартного отклонения (σ).

При сравнении количественных признаков применялся критерий Стьюдента (t); для множественных сравнений использовался параметрический однофакторный дисперсионный анализ с последующим сравнением в группах по критерию Стьюдента с поправкой Бонферрони. При сравнении качественных признаков использовался двусторонний вариант точного критерия Фишера для четырехпольных таблиц и критерий χ^2 с поправкой Йэйтса на непрерывность.

Для составления математической модели иммунологических показателей в остром периоде инфекционного мононуклеоза и в периоде реконвалесценции ис-

пользовали метод Е.В. Гублер (1978), регистрирующий значения изучаемых показателей в n-мерном пространстве признаков. Обработку результатов проводили с помощью программы Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что инфекционный мононуклеоз развивался преимущественно у детей дошкольного возраста (3 – 7 лет): у 33 из 70 (47,1%), из них - чаще у мальчиков: у 24 из 33 (72,73%). В старших возрастных группах заболевание чаще выявлялось у девочек – 25 из 37 (67,5%).

Следует отметить, что при анализе медицинской документации имел место высокий процент расхождения диагнозов: направительного, при поступлении в стационар и клинического. Большинство детей при госпитализации имели несколько выставленных диагнозов. У 55,7% больных при поступлении поставлен диагноз «Лакунарная ангина», «ОРВИ». Диагноз «Инфекционный мононуклеоз» при поступлении присутствовал в направлении лишь у 44,3% детей.

Клиническая картина инфекционного мононуклеоза у детей не отличалась от ранее описанной в литературе [Хаитов Р.М., 2007]. Результаты выявляемости клинических данных представлены на рис. 1.

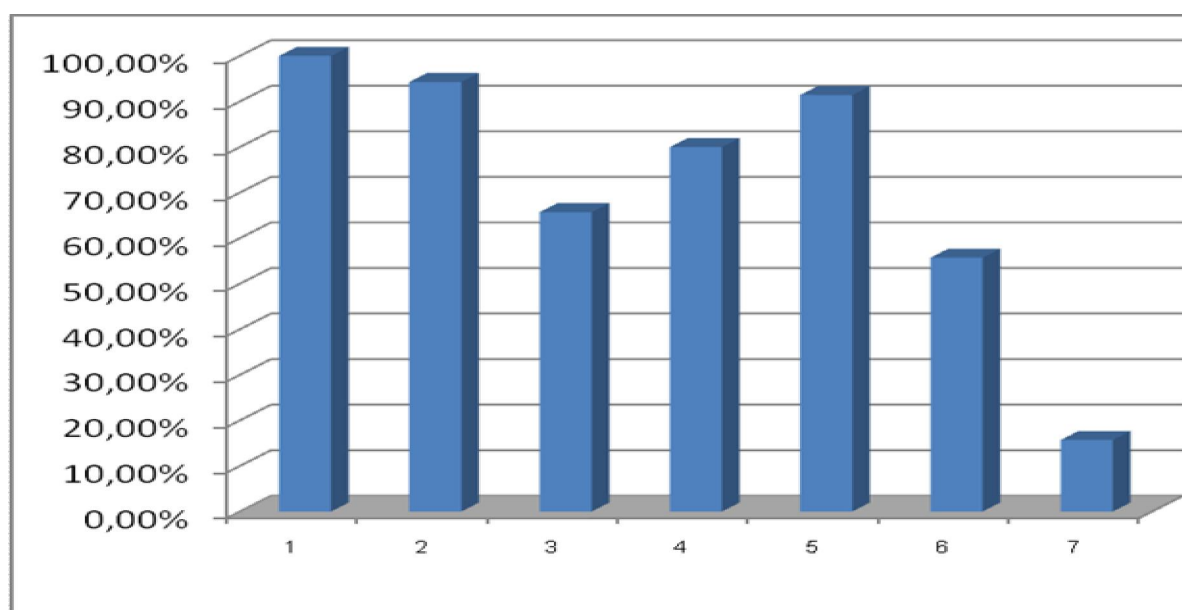


Рисунок 1 - Наиболее часто встречающиеся у детей клинические симптомы инфекционного мононуклеоза: 1. Повышение температуры. 2. Увеличение лимфоузлов. 3. Затруд-

нение дыхания. 4. Воспалительные изменения ротоглотки. 5. Гепатомегалия. 6. Спленомегалия. 7. Интоксикационный синдром.

Независимо от степени тяжести и возраста больных наиболее часто наблюдались следующие симптомы: увеличение лимфатических узлов – у 94,3% (66 из 70), гепатомегалия – у 91,4% (64 из 70), гиперемия мягкого и твердого неба отмечалась у 80,0% (56 из 70), фебрильная лихорадка – у 75,7% (53 из 70), затруднение носового дыхания – у 65,7% (46 из 70), боль в горле – 62,0% (44 из 70), спленомегалия – у 55,7% (39 из 70), гипертрофия миндалин – у 52,9% (37 из 70) пациентов. Таким образом, основными жалобами являлись поражения органов, богатых лимфоидной тканью.

Анализируя тяжесть течения ВЭБ-инфекции, мы учитывали весь комплекс клинических проявлений заболевания, что позволило сделать следующий вывод: для инфекционного мононуклеоза у детей характерно острое течение заболевания с преобладанием среднетяжелых форм инфекционного процесса (78,6%, 55 из 70). Тяжелое течение (21,4%, 15 из 70) чаще отмечалось у детей старшей возрастной группы (13 – 17 лет), что составило 40 % (6 из 15) по сравнению с 9% (3 из 15) детей дошкольной группы ($\chi^2=4,6$, $p=0,03$). Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Распределение детей с инфекционным мононуклеозом по возрасту и степени тяжести заболевания

Возраст, лет	Тяжесть течения заболевания		Всего
	Средняя (n=55)	Тяжелая (n=15)	
3 – 7	30 (90%)	3 (9%)	33 (100%)
8 – 12	16 (73%)	6 (27%)	22 (100%)
13 -17	9 (60%)	6 (40%)	15 (100%)

Согласно полученным данным, среди заболевших инфекционным мононуклеозом детей сопутствующая инфекция отмечалась у 30,0% в виде острого бронхита, катарального и гнойного отита, синусита, ринофарингита. Хронический тонзиллит выявлен у 17,1%, острые респираторные вирусные инфекции – у 7,1% детей,

все это могло способствовать снижению иммунного ответа и сенсibilизации организма ребенка.

При проведении общего анализа крови при острой ВЭБ-инфекции установлен умеренный лейкоцитоз у 24,3% больных, лимфоцитоз – у 82,0%, моноцитоз – у 78,0 %, увеличение СОЭ – у 91,0% детей. При исследовании мазков периферической крови частота обнаружения атипичных мононуклеаров была 50% от общего числа обследованных, количество клеток не превышало 10%. Данный симптомокомплекс соответствует типичной форме инфекционного мононуклеоза по классификации Н.И.Нисевич, В.С. Казарина, М.О. Гаспарян (1977).

В период реконвалесценции, через 3 месяца, у 92,8% (65 из 70) больных сохранялись клинические признаки перенесенного заболевания: поражение лимфоидной ткани в виде увеличения подчелюстных лимфоузлов – у 43,1% (30 из 70) больных детей, заднешейных – у 26,2% (18 из 70) наблюдаемых, признаки астеновегетативного синдрома – у 12,3% (9 из 70) детей, гепатомегалия выявлена у 10,8% (8 из 70) и спленомегалия – у 6,2% (4 из 70) детей.

При лабораторном исследовании периферической крови детей в период реконвалесценции отмечалась умеренная лейкоцитопения у 6,2%, лимфоцитоз - у 2,0% реконвалесцентов. У одного ребенка были выявлены атипичные мононуклеары спустя 3 месяца после начала заболевания.

В динамике наблюдения наиболее часто отмечалось сохранение признаков поражения периферических лимфоидных органов в виде увеличения лимфоузлов и гепатомегалии как через 3, так и через 6 месяцев наблюдения. Тогда как другие клинические симптомы заболевания исчезали через 3 месяца после перенесенного заболевания.

Таким образом, инфекционный мононуклеоз у детей протекал с полиморфизмом клинической симптоматики, поражением многих систем и органов и длительными остаточными явлениями в виде увеличения лимфоидных органов.

В таблице 3 представлены клинические признаки инфекционного мононуклеоза у детей в различные сроки наблюдения.

Таблица 3 – Частота клинико-лабораторных признаков инфекционного мононуклеоза у детей в различные сроки наблюдения

Клинико-лабораторные признаки	Сроки наблюдения					
	До лечения (n=70)		Через 3 месяца (n=65)		Через 6 месяцев (n=50)	
	абс. ч.	%	абс. ч.	%	абс. ч.	%
Слабость	68	97,1	2	3,0	2	4,0
Потливость	63	90,0	4	6,1	4	8,0
Снижение аппетита	58	82,8	1	1,5	0	0
Боли в правом подреберье	58	82,8	1	1,5	1	2,0
Увеличение подчелюстных лимфоузлов	66	94,3	28	43,1	10	20,0
Увеличение заднешейных лимфоузлов	65	92,8	17	26,2	5	10,0
Гепатомегалия	64	91,4	7	10,8	4	8,0
Лейкоцитоз	35	24,3	0	0	0	0
Лейкоцитопения	17	23,8	4	6,2	1	2,0
Лимфоцитоз	57	82,0	2	3,1	1	2,0
Атипичные мононуклеары	35	50,0	0	0	0	0

Учитывая, что клинический симптомокомплекс, характеризующий ВЭБ-инфекцию, указывал на поражение периферических органов иммунной системы

ребенка, наряду с общеклиническими методами обследования, нами проводилось изучение состояния иммунной системы у детей в острый период инфекционного мононуклеоза (n=70) и в период реконвалесценции через 3 месяца после выписки из стационара (n=65).

Среди детей, которым проводилось иммунологическое исследование в острый период инфекционного мононуклеоза, было 35 больных со средней степенью тяжести и 15 – с тяжелой формой инфекции.

Анализ показателей клеточных и гуморальных факторов иммунитета у детей, больных инфекционным мононуклеозом, не выявил существенных различий в зависимости от возраста и пола.

Оценка иммунного статуса детей, больных инфекционным мононуклеозом, в зависимости от тяжести течения заболевания выявила как общие закономерности, так и особенности иммунной регуляции. Сравнение проводили с группой контроля, которую составили практически здоровые дети (n=30).

Общая закономерность заключалась в достоверном увеличении при данном заболевании числа Т-лимфоцитов (CD3+) ($p < 0,05$), а среди субпопуляций Т-лимфоцитов – количества цитотоксических клеток (CD8+) ($p < 0,05$) (рис.2).

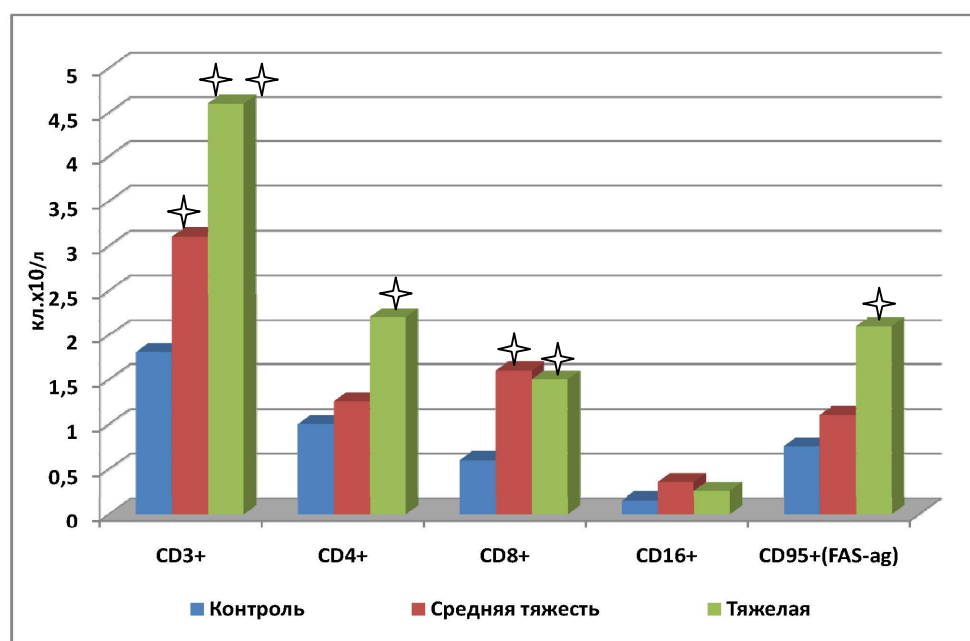


Рисунок 2 - Субпопуляционный состав лимфоцитов в периферической крови детей с инфекционным мононуклеозом в зависимости от тяжести заболевания

Примечание: * - показатели отличаются от данных контрольной группы со статистической достоверностью $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$.

Особенности иммунной регуляции были связаны с тяжестью течения инфекционного мононуклеоза. У больных с тяжелым течением, наряду с увеличением CD3⁺ и CD8⁺ клеток, имелось выраженное повышение CD4⁺ и CD95⁺ клеток (рис.2). Полученные данные свидетельствуют о Th1 (клеточного) пути иммунного реагирования, что характерно для иммунного ответа на вирусную инвазию. Однако, в обеих группах, независимо от степени тяжести заболевания, не было выявлено ожидаемого при вирусной инфекции возрастания основных лимфоцитов, обеспечивающих первую линию защиты против возбудителя внутриклеточного типа паразитирования – натуральных киллерных клеток (NK-клеток, CD16⁺).

Таким образом, мы предполагаем, что отсутствие активации NK-клеток (CD16⁺) у больных инфекционным мононуклеозом способствует персистенции инфицированных вирусом клеток в организме больного длительное время.

Оценка маркера CD95⁺ (Fas-рецептор) показала его достоверное увеличение ($p < 0,05$) лишь при тяжелом течении заболевания, что наряду с повышением показателей T-клеточного звена (CD4⁺) можно рассматривать как признак активации иммунной системы. Оценка гуморального звена иммунной системы в группах сравнения (уровень сывороточных антител, циркулирующих иммунных комплексов) не выявила выраженных отличий. В то же время, у больных с тяжелой степенью заболевания отмечалось увеличение комплементарной активности сыворотки крови ($p < 0,05$) (рис.3).

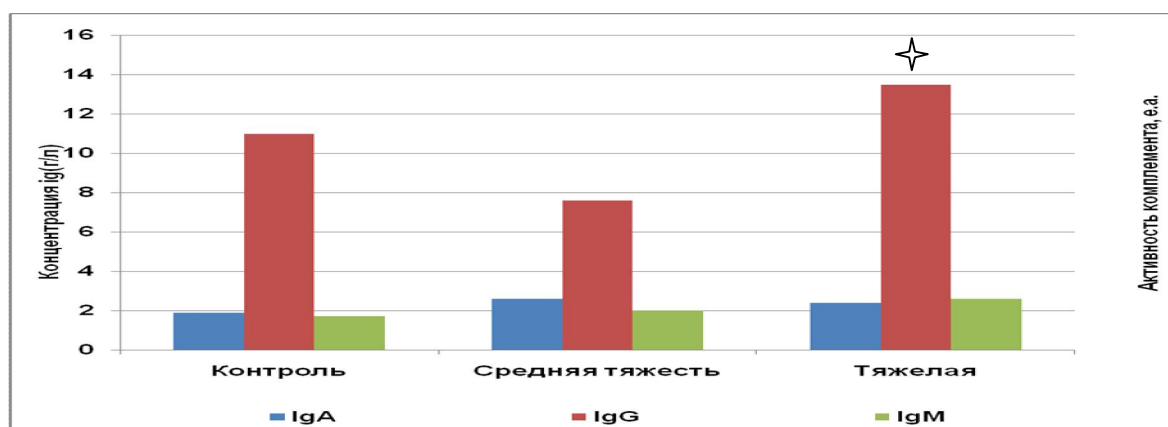


Рисунок 3 - Гуморальное звено иммунной системы у детей с инфекционным мононуклеозом в зависимости от тяжести течения заболевания

Примечание: * - показатели комплементарной активности отличаются от данных контрольной группы со статистической достоверностью $p < 0,05$.

При инфекционных воспалительных заболеваниях есть общие обязательные звенья развития воспалительного процесса, а именно: первыми клеточными элементами, с которыми сталкиваются инфекционные гены при проникновении через эпителий слизистых и кожных покровов, являются макрофаги (или моноциты–макрофаги), от их «поведения» зависит выраженность ответа организма на инфекцию. Избыточная активность макрофагов приводит к выработке большого количества провоспалительных цитокинов: интерлейкина-1 β (ИЛ-1 β), фактора некроза опухоли (ФНО- α), ИЛ-6, ИЛ-8, иммунорегуляторного интерферона -гамма (ИФ- γ), а также нейросоединений, простагландинов, реакционноспособных радикалов.

Эти вещества дают пара – и эндокринные эффекты, вызывают общие и местные воспалительные реакции, в том числе повышение температуры тела. Следовательно, вовлечение моноцитарно-макрофаганального ряда с последующей активацией комплекса биологически активных веществ – это универсальное звено воспаления и на него можно воздействовать патогенетически, независимо от этиологии.

Нами определялся спектр цитокинов в контрольной группе из 30 здоровых детей, а также в двух клинических группах: у детей со среднетяжелым течением инфекционного мононуклеоза (35 больных) и пациентов с тяжелым течением данной инфекции (15 человек).

В исследованиях цитокинового спектра сыворотки крови у детей в остром периоде ВЭБ-инфекции отмечался возрастающий характер изменений содержания провоспалительных интерлейкинов в зависимости от тяжести заболевания. В целом, инфекционный мононуклеоз сопровождался активацией цитокиновой системы. Имелись особенности цитокинового профиля в зависимости от тяжести заболевания. Среднетяжелые формы инфекционного мононуклеоза сопровождались незначительным (до 100 пг/мл) увеличением ИЛ-6 и ИЛ-8. Тяжелые формы заболевания характеризовались гиперпродукцией (более 100 пг/мл) провоспалительных цитокинов. Наряду с повышением уровней ИЛ-6 и ИЛ-8, было выявлено значительное увеличение ИЛ-1 β , ИФ- γ и ФНО- α (таблица 4).

Таблица 4 - Показатели уровней цитокинов в сыворотке крови здоровых детей и больных инфекционным мононуклеозом в острый период заболевания, (пг/мл), (M±m)

Показатели, пг/мл	Исследуемые группы детей			Уровень значимости (p)
	Группа здоровых детей, n = 30	Дети с инфекционным мононуклеозом, n=50		
		Группа средней тяжести, n=35	Группа тяжелого течения, n = 15	
Интерлейкин - 1 β	46,1 ±3,9	54,7 ±7,8	183,7 ±14,1	p 1,3<0,001 p 2,3<0,001
Интерлейкин - 6	40,90 ±2,60	88,0 ±15,4	129,8 ±17,4	p 1,2<0,01 p 1,3<0,001
Интерлейкин - 8	19,89 ±0,38	72,9 ±15,2	131,9 ±19,6	p 1,2<0,01 p 1,3<0,001 p 2,3<0,05
Интерферон - γ	43,6 ±1,09	64,5 ±17,5	121,7 ±21,4	p 1,3<0,01 p 2,3<0,05
Фактор некроза опухоли - α	42,09 ±2,25	50,9 ±10,2	132,1 ±28,8	p 1,3<0,01 p 2,3<0,05

Согласно данным литературы, провоспалительные цитокины (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- α и ИФ- γ) тесно связаны по своим функциям и эффектам, обеспечивающим направленность иммунного ответа и интенсивность воспаления. Нерегулируемая гиперпродукция провоспалительных цитокинов приводит к гиперэргическим реакциям вплоть до развития инфекционно-токсического шока (Симбирцев А.С., 2009). Кроме того, гиперпродукция ИФ- γ , стимулируя Th1 - путь иммунного реагирования, способствует «блокировке» Th2 - пути (антителообразования).

Особого внимания заслуживает состояние цитокинового профиля у детей с тяжелым течением инфекционного мононуклеоза. По результатам наших исследований, при тяжелом течении ВЭБ-инфекции происходило значительное (в несколь-

ко раз) увеличение уровней цитокинов в сыворотке крови по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых детей.

Этот факт, на наш взгляд, отражает более грубые изменения иммунной системы у этих детей по сравнению с пациентами со среднетяжелым течением инфекционного процесса, что ведет к полиморфизму клинической симптоматики и осложнениям при ВЭБ-инфекции, более тяжелому течению, длительному периоду восстановления баланса между показателями иммунной системы.

Проведенные исследования показали, что при инфекционном мононуклеозе происходят выраженные иммунологические изменения в виде активации Т-клеточного звена. Тяжелое течение сопровождается гиперпродукцией цитокинов воспалительного характера, способствующих развитию токсико-инфекционных проявлений: высокая температура, поражение лимфоидных органов (лимфаденопатия, гепатоспленомегалия).

Оценка показателей иммунного реагирования у детей реконвалесцентов через 3 месяца наблюдения выявила особенности цитокиновой реакции в зависимости от способа проведенного лечения.

Применение в остром периоде заболевания симптоматической терапии у детей реконвалесцентов способствовало лишь тенденции к восстановлению иммунорегуляторных механизмов. Сохраняющийся высокий уровень цитокинов определял продолжительность и выраженность иммуновоспалительного процесса при инфекционном мононуклеозе в виде реагирования периферических лимфоидных органов (увеличение лимфоузлов) вплоть до сохранения признаков гепатоспленомегалии.

В отличие от результатов симптоматической терапии, при интерферонотерапии (Виферон) все исследуемые показатели цитокиновой реакции нормализовались. Сохранилось незначительное увеличение ИЛ-6 и ИЛ-8, что можно расценивать как поддержание противoinфекционного иммунитета, даже через три месяца после полученного лечения. В то же время отмечалось сниженное содержание ИФ- γ в сыворотке крови у больных по сравнению с аналогичными показателями в группе контроля, что необходимо учитывать при назначении дальнейших лечебных мероприятий (табл. 5).

Таблица 5 - Цитокиновый профиль у детей реконвалесцентов через 3 месяца после перенесенного инфекционного мононуклеоза в зависимости от способа лечения (пг/мл), (M±m)

Показатели, пг/мл	Исследуемые группы детей			Показатель достоверности различий (p)
	Группа здоровых детей, n = 30	Дети с инфекционным мононуклеозом, n=35		
		Группа детей с применением виферона, n = 20	Группа детей с применением симптоматической терапии, n = 15	
Интерлейкин - 1β	46,1 ±3,9	37,6 ±5,6	79,21 ±8,7	p 1,3<0,01 p 2,3<0,001
Интерлейкин - 6	40,9 ±2,60	73,2 ±11,3	103,5 ±19,1	p 1,2<0,05 p 1,3<0,01
Интерлейкин - 8	19,9 ±0,4	36,1 ±6,6	82,8 ±9,9	p 1,2<0,05 p 1,3<0,001 p 2,3<0,001
Интерферон - гамма	43,6 ±1,1	25,3 ±5,8	71,9 ±11,6	p 1,3<0,05 p 2,3<0,01 p 1,2<0,01
Фактор некроза опухоли - α	42,1 ±2,2	33,7 ±3,8	60,2 ±9,4	p 2,3<0,05

Все вышеизложенное делает особенно важной точную постановку диагноза инфекционного мононуклеоза в ранние сроки наблюдения.

Традиционным способом лабораторной диагностики инфекционного мононуклеоза является выявление атипичных мононуклеаров в периферической крови. В настоящее время широко используется иммуноферментный анализ: выявление специфических антител к ВЭБ, основанное на обнаружении антител острого периода (IgM к капсидному белку VCA и IgG к раннему антигену ВЭБ (EA)).

Результаты анализа данных выявляемости атипичных мононуклеаров и серодиагностики свидетельствовали о невысокой диагностической значимости изучен-

ных методов для верификации диагноза инфекционный мононуклеоз. Так, атипичные мононуклеары выявлялись лишь в 50% (35 из 70) случаев наблюдения; антитела острого периода ВЭБ-инфекции выявлялись в 58,8% (41 из 70) случаев.

Более того, была выявлена связь чувствительности ИФА-диагностики с тяжестью течения инфекционного мононуклеоза. У детей со средней тяжестью течения инфекционного мононуклеоза антитела выявлялись у большинства обследованных уже в конце первой недели заболевания – 85,7% (30 из 35). Тогда как у детей с тяжелой формой заболевания диагностически значимые антитела выявлялись лишь в 26,6% (4 из 15) ($\chi^2 = 14,22$, $p = 0.0008$). Низкая выявляемость антител при тяжелом течении инфекционного мононуклеоза объясняется особенностью иммунного реагирования, сопровождающегося угнетением антителообразования, в том числе и специфического.

Результаты ПЦР-диагностики (выявление ДНК ВЭБ в слюне больных детей) были положительными у 97,1% (68 из 70) вне зависимости от тяжести течения заболевания. Кроме того, ДНК ВЭБ выявлялось в слюне с первых дней наблюдения (табл.6).

Таблица 6 - Сравнительная оценка эффективности различных методов диагностики ВЭБ-инфекции у детей больных инфекционным мононуклеозом (выявляемость, абс. ч., %).

Лабораторные методы диагностики	Среднетяжелая группа (n=35)	Тяжелая группа (n=15)	Контрольная группа (n=30)
Атипичные мононуклеары	13 (55%)	7 (45%)	0
Иммуноферментный анализ	30 (85,7%)	4 (26,6%)	1 (3,3%)
ПЦР-диагностика	34 (97,1%)	15 (100%)	0

Следовательно, применение ПЦР диагностики в острый период инфекционного мононуклеоза у детей значительно (с 26,6% до 100%) повышало возможность верификации диагноза у больных с тяжелым течением заболевания ($p < 0,001$).

Повторные результаты через 1 месяц после лечения были отрицательны в большинстве случаев при ПЦР-диагностике – 97,1% (68 из 70).

Расчет показателей чувствительности и специфичности ИФА и ПЦР-диагностики свидетельствовали о высокой диагностической значимости генодиагно-

стики – соответственно 58,8% (41 из 70) и 57,4% (40 из 70) по сравнению с 97,1% (68 из 70) ($\chi^2= 28,01$ при $p=0,0005$) и 98,9% (69 из 70) ($\chi^2= 32,48$ при $p=0,0005$).

Следовательно, лабораторными маркерами прогноза тяжести течения инфекционного мононуклеоза у детей являются: гиперпродукция (более 100 пг/мл) провоспалительных цитокинов (ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- α , ИФ- γ , ИЛ-1 β); наличие отрицательных результатов ИФА-диагностики при выявлении ДНК ВЭБ в слюне методом ПЦР у детей больных инфекционным мононуклеозом.

Таким образом, формирование иммунного ответа при инфекционном мононуклеозе у детей характеризуется активацией Т-клеточного звена по Th1 –пути (клеточному) иммунного ответа и системы провоспалительных цитокинов, более выраженной при тяжелом течении заболевания. Высокие уровни цитокина ИФ- γ способствуют «блокировке» процессов антителообразования, вследствие этого становится невозможным проведение ИФА-диагностики ВЭБ-инфекции на основе определения антител (в 42% случаев неэффективно), что затрудняет постановку точного диагноза. Предложенный способ выявления ДНК вируса Эпштейн-Барра в слюне методом ПЦР-диагностики позволяет повысить точность верификации диагноза инфекционного мононуклеоза у детей с 58,8% до 97,1%, что делает метод ПЦР-диагностики наиболее значимым для раннего и достоверного установления диагноза. Сочетание отрицательных результатов ИФА и выявления возбудителя ВЭБ методом ПЦР выступает в качестве неблагоприятного прогностического маркера в отношении развития тяжелого течения инфекционного мононуклеоза у детей.

ВЫВОДЫ

1. Формирование иммунного ответа у детей с инфекционным мононуклеозом характеризуется активацией Th1-клеточного пути с повышением CD3+, CD8+ лимфоцитов при среднетяжелом течении и увеличением CD3+, CD4+, CD8+, CD95+ клеток - при тяжелом течении с подавлением антителообразования, в том числе продукции специфических антител к вирусам Эпштейн-Барра (ВЭБ).

2. Выявлены особенности цитокиновой регуляции иммунного ответа в зависимости от степени тяжести течения инфекционного мононуклеоза. Среднетяжелое течение заболевания характеризуется незначительным повышением ИЛ-6 и ИЛ-8 (менее 100 пг/мл) в сыворотке крови; тяжелая форма заболевания - гиперпродукцией ФНО- α , ИФ- γ , ИЛ-1 β (более 100 пг/мл), способствующих развитию токсико-инфекционных эффектов.

3. Использование метода полимеразной цепной реакции для выявления возбудителя ВЭБ-инфекции в слюне у детей с инфекционным мононуклеозом повышает эффективность верификации диагноза в ранние сроки наблюдения с 58,8% (ИФА) до 97,1% (ПЦР), а при тяжелом течении заболевания - с 26,6% до 100%.

4. Лабораторными критериями прогнозирования тяжести течения инфекционного мононуклеоза у детей является высокий уровень провоспалительных цитокинов в сыворотке крови (ФНО- α , ИФ- γ , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8 и отрицательные данные выявляемости ВЭБ-инфицированности методом иммуноферментного анализа при положительном результате ПЦР-диагностики (биологический материал - слюна).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При обследовании детей с мононуклеозоподобными заболеваниями для верификации вируса Эпштейн-Барра в слюне необходимо проводить ПЦР-диагностику с первых дней заболевания.

2. Комплексное обследование детей с инфекционным мононуклеозом методами ИФА и ПЦР-диагностики позволяет выявить группу больных с риском развития тяжелого течения инфекционного мононуклеоза в ранние сроки наблюдения. Наличие отрицательных данных выявляемости ВЭБ-инфицированности методом иммуноферментного анализа при положительном результате ПЦР-диагностики является неблагоприятным признаком развития тяжелого течения заболевания.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Фирсова Н.В. (Турукина Н.В.) Полимеразная цепная реакция в диагностике инфекционных заболеваний / Сборник трудов Московского НИИ им. Ф.Ф. Эрис-

мана «Среда обитания и охрана здоровья населения регионов России в условиях реформирования здравоохранения». - Москва, 1999. – С. 259.

2. Фирсова Н.В. (Турукина Н.В.) Перспективы применения методов ДНК-диагностики в лабораторной службе / Сборник трудов Самарского государственного медицинского университета, Федерального научного центра гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана «Гигиенические проблемы охраны здоровья населения». - Москва, 2000. – С. 181.

3. Фирсова Н.В. (Турукина Н.В.) К вопросу об организации генодиагностики инфекционных заболеваний / Материалы научно-практической конференции «Гигиена на рубеже XXI века». - Воронеж, 2000. - С. 325.

4. Фирсова Н.В. (Турукина Н.В.) Лабораторная диагностика инфекционного мононуклеоза у детей / **Нижегородский медицинский журнал.** - 2004. – С. 190-192.

5. Турукина Н.В. Инфекционный мононуклеоз, особенности течения и диагностики у детей / Сборник трудов Самарского государственного медицинского университета «Достижения научной педиатрии – основа здоровья детей», Самара, 2007. – С. 171.

6. Турукина Н.В. Инфекционный мононуклеоз у детей: особенности генодиагностики и клинико-иммунологических показателей./ Материалы XII конгресса педиатров России «Актуальные проблемы педиатрии». - Москва, 2008. – С. 352-353.

7. Турукина Н.В. Клинико-иммунологические особенности инфекционного мононуклеоза у детей/ Материалы Поволжской региональной научно-практической конференции «Современные проблемы диагностики и лечения в педиатрии». - Ульяновск, 2009. – С.178-179.

8. Турукина Н.В., Захарова Л.И. Клинико-иммунологические особенности ВЭБ-инфекции у детей / Труды Всероссийского ежегодного конгресса «Инфекционные болезни у детей: диагностика, лечение и профилактика». - Санкт-Петербург, 2010. – С. 170-171.