



УКРАЇНА

(19) UA (11) 26800 (13) U
(51) МПК (2006)
G01N 33/50МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ТЯЖКОСТІ ПЕРЕБІГУ ІНФЕКЦІЙНОГО МОНОНУКЛЕОЗУ У ДІТЕЙ

1

2

(21) u200704872

(22) 03.05.2007

(24) 10.10.2007

(46) 10.10.2007, Бюл. № 16, 2007 р.

(72) Ходак Лариса Анатоліївна, Ржевська Ольга
Олександрівна, Смілянська Майя Володимирівна,
Перемот Світлана Дмитрівна, Мартинов Артур
Вікторович, Волянський Андрій Юлійович(73) ХАРКІВСЬКА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ ПІСЛЯ-
ДИПЛОМНОЇ ОСВІТИ

(57) Спосіб діагностики тяжкості перебігу інфекцій-

ного мононуклеозу у дітей шляхом дослідження α -інтерферону крові, який **відрізняється** тим, що проводять імуноферментний аналіз сироватки крові, визначають кількісний показник α -інтерферону, при значенні показника α -інтерферону від 27 до 18 пкг/мл діагностують розвиток легкого перебігу інфекційного мононуклеозу, при α -інтерфероні від 18 до 10 пкг/мл - середню форму тяжкості, при α -інтерфероні від 10 до 4 пкг/мл діагностують розвиток важкого перебігу захворювання.

Корисна модель відноситься до медицини, а саме до дитячих інфекційних хвороб, і може бути використана для діагностики тяжкості перебігу інфекційного мононуклеозу у дітей.

Найбільш близьким є спосіб прогнозування тяжкості перебігу інфекційного мононуклеозу у дітей за допомогою м-РСК, а також клінічними ознаками та показниками α -інтерферону [В.В. Иванова, О.В. Родионова, А.А. Букина, О.А. Аксенов, Г.Ф. Железникова. Инфекционный мононуклеоз: клиника, новые подходы к диагностике и лечению. // Российский вестник перинатологии и педиатрии. - 2001, - №1, - С.43-48]. Спосіб полягає у прогнозуванні тяжкості перебігу інфекційного мононуклеозу за наступними показниками. Враховують виразність гепатоспленомегалії, показник кількості атипичних мононуклеарів, концентрацію імунних комплексів та вміст α -інтерферону в крові пацієнтів.

Недоліки способу пов'язані з тим, що таким способом прогнозування тяжкості перебігу інфекційного мононуклеозу відбувається за допомогою сумарного бала, який поєднує всі перераховані вище показники, проте не вказуються межі кількісних показників α -інтерферону, які відповідають тому чи іншому ступеню тяжкості інфекційного мононуклеозу. До того ж, етіологічна діагностика інфекційного мононуклеозу у зазначеному способі відбувалася за допомогою методу м-РСК, який в порівнянні з сучасними методами (ІФА, ПЛР, РНІФ) є низькоінформативним та важким у проведенні.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалення способу діагностики тяжкості перебігу інфекційного мононуклеозу у дітей, в якому за рахунок зміни проведеного дослідження досягається кількісна оцінка показників α -інтерферону, за рахунок чого досягається можливість діагностики розвитку відповідних форм тяжкості інфекційного мононуклеозу.

Поставлена задача вирішується в способі діагностики тяжкості перебігу інфекційного мононуклеозу у дітей шляхом дослідження α -інтерферону крові, згідно з корисною моделлю, проводять імуноферментний аналіз сироватки крові, визначають кількісний показник α -інтерферону, розвиток легкої форми інфекційного мононуклеозу діагностують при концентрації α -інтерферону від 27 до 18 пкг/мл, розвиток захворювання середньої форми тяжкості можливий при показниках α -інтерферону від 18 до 10 пкг/мл, і, відповідно, розвиток важких форм можливий при показниках α -інтерферону від 10 до 4 пкг/мл.

Відомо, що для розвитку вірусних інфекцій суттєве значення має стан системи інтерферону, а особливо α -інтерферону, який є фактором раннього неспецифічного захисту організму і виконує антивірусну функцію. Саме тому для прогнозування тяжкості перебігу інфекційного мононуклеозу використовували показники α -інтерферону. По даним Іванової В.В. (2001р.) нормальні показники α -інтерферону дорівнюють $24 \pm 3,03$ пкг/мл.

Виявлені результати пояснюють розвиток різ-

(19) UA (11) 26800 (13) U

них форм тяжкості інфекційного мононуклеозу. Розвиток легкого перебігу інфекційного мононуклеозу можливий при адекватному чи незначно зниженому вмісті у сироватці крові α -інтерферону (який має протівірусний ефект), тобто рання захисна реакція організму достатньо виражена, відбувається блокування внутрішньоклітинної репродукції вірусу, вірус не розмножується, і організм швидко самостійно звільняється від інфекції. Виникнення інфекційного мононуклеозу середньої форми важкості можливий при зниженій концентрації α -інтерферону у сироватці крові, тобто фактори раннього неспецифічного захисту організму самостійно не справляються, відбувається залучення факторів гуморального імунітету (утворення вірусспецифічних антитіл). Проте процес протівірусного гуморального захисту компенсований, і за більш тривалий час організм самостійно повністю справляється з інфекцією. Розвиток важких форм захворювання пояснюється значно низьким вмістом α -інтерферону у сироватці крові. Відбувається залучення факторів гуморального захисту, проте продукція вірусспецифічних антитіл занижена, всі антигени не будуть зв'язані з антитілами, тобто вірус повністю не елімінується з організму, і можлива повторна антигенна стимуляція з розвитком важкого затяжного перебігу захворювання, а, можливо, й ускладнень.

Етіологію інфекційного процесу встановлюють за допомогою імуноферментного аналізу (ІФА) (визначення вірусспецифічних антитіл: анти-EBV-VCA Ig M, анти-EBV-EA Ig G), ПЛР (виявлення ДНК вірусу Епштейна-Барр (ВЕБ) у крові та слині). Також у хворих поряд з вірусом Епштейна-Барр у крові та слині визначали маркери інших збудників - герпесвірусів, ВІЛ, віруси респіраторної групи (аденовірусну інфекцію, РС-інфекцію, парагрип тощо) - результати були негативні, що підтверджувало моноінфекцію ВЕБ.

Вміст α -інтерферону у сироватці крові пацієнтів визначався за допомогою методу ІФА.

Таблиця

Показники тяжкості перебігу інфекційного мононуклеозу у дітей.

Ступінь тяжкості	Значення показників α -інтерферону
Легкий	Від 27 до 18пкг/мл
Середньої тяжкості	Від 18 до 10пкг/мл
Важкий	Від 10 до 4пкг/мл

Спосіб, що заявляється, здійснюють таким чином.

Визначення фракцій сироваткового інтерферону альфа.

Рівень сироваткового інтерферона альфа визначають твердофазним методом імуноферментного аналізу з використанням набору реагентів ProCon IF2 plus виробництва ООВ «Протеїновий контур» (Росія).

В якості індикаторного фермента використовують пероксидазу хрому. Один тип моноклональ-

них антитіл був імібілізований на внутрішніх поверхнях лунок планшетів для мікротитрування. Інший тип моноклональних антитіл до незалежного епітопу молекули ІНФ перебував у наборі у вигляді кон'югату з біотином. Індикаторним компонентом був кон'югат пероксидази хрому зі стрептавидином, який мав високу схожість з біотином. Після інкубації і промивки у лунки додають кон'югат пероксидази хрому зі стрептавидином, знову інкубували, промивали, додавали субстрат і вимірювали активність зв'язаної пероксидази з використанням автоматичного фотометра для мікропланшетів.

У заздалегідь промиті 2 рази буфером лунки вносили розбавлений розчин моноклональних антитіл і добавляли у лунки одного ряду по 100мкл стандартів А, В, С, D, Е, а в інші - вносили по 100мкл відповідного зразка. Після інкубації планшетів зі зразками протягом 60хв. при 37°C у сухоповітряному термостаті при безперервному струшуванні, лунки тричі промивали буфером.

Потім відбувалося приєднання кон'югату: у кожну лунку вносили розбавлений кон'югат стрептавидину з пероксидазою хрому і інкубували планшет зі зразками 30хв. при 37°C при безперервному струшуванні, потім лунки тричі промивалися буфером.

Заключним етапом є проведення ферментативної реакції. У сухі лунки добавляють розчин субстрату з хромогеном, інкубували стрипи 10хв. при кімнатній температурі у темному місці на шейкері. Спостерігають розвиток блакитного забарвлення. Зупинка реакції проводиться шляхом додавання у кожну лунку стоп-реагента, при цьому блакитне забарвлення змінюється на жовте.

Результати ІФА реєструють спектрофотометрично при довжині хвилі 450нм. Концентрація ІНФ визначають по калібровочній кривій «оптична щільність/концентрація».

Приклад 1. (легкий перебіг) Пацієнтка Р., 5 років, звернулася до клініки на 4 день захворювання зі скаргами на підвищення температури тіла до 37,6°C, затруднення носового дихання, біль у горлі при ковтанні, слабкість. Захворіла гостро, коли заявили вище перераховані скарги. Об'єктивно при зверненні до клініки: самопочуття незначно порушене, шкіра звичайного кольору, чиста, носове дихання утруднене, слизова оболонка ротоглотки гіперемована, мигдалики збільшені I-II ступеню, на мигдаликах острівчата осуга, шийні лімфовузли незначно збільшені, рухомі, чутливі при пальпації. Печінка виступає з-під краю реберної дуги на 1см, селезінка не збільшена. З боку інших органів і систем змін не виявлено.

Проведене обстеження:

Аналіз крові клінічний - лімфоцитоз, наявність атипичних мононуклеарів.

Обстеження на віруси респіраторної групи методом РІФ: антигени аденовірусної, РС-інфекції, грипу, парагрипу не виявлені.

ІФА на ВІЛ - негативний.

ІФА на герпесвіруси:

ВПГ IgMTa IgG - негативні результати.

ЦМВ IgM та IgG - негативні результати.

ВЕБ VCA-IgM=0,37 (ОП кр=0,22), ВЕБ EA-IgG - 0,43 (ОП кр=0,22),

ПЛР слини: ДНК ВПГ, ЦМВ не виявлені, ДНК ВЕБ присутня.

ІФА на визначення інтерферону: концентрація α -ІФН дорівнювала 21 пкг/мл.

Дитині був поставлений діагноз: інфекційний мононуклеоз, легкий перебіг.

Пацієнт виписаний з лікарні на 8 день перебування з одужанням, всі симптоми хвороби регресували.

Приклад 2. (середньої тяжкості) Пацієнт В., 3 роки, поступив на 3 день хвороби зі скаргами на підвищення температури тіла до 39°C , значно затруднене носове дихання, дитина «хропить» уві сні, біль у горлі, що підвищується при ковтанні, зниження апетиту, слабкість. Об'єктивно при зверненні до клініки: самопочуття помірно порушене, шкіра бліда, чиста, носове дихання різко утруднене, дитина уві сні «хропить», слизове відділяєме з носа у невеликій кількості, слизова оболонка ротоглотки різко гіперемована, гіпертрофія мигдаликів II-III ступеня, у лакунах мигдаликів обширна біла осуга, шийні лімфовузли збільшені до 1,5-2 см у діаметрі, спаяні між собою, болючі при пальпації, пахвинні та пахові лімфовузли збільшені до 0,5 см, рухомі, чутливі при пальпації. Печінка виступає з-під краю реберної дуги на 3 см, селезінка збільшена на 2 см. З боку інших органів і систем змін не виявлено.

Проведене обстеження:

Аналіз крові клінічний - лімфоцитоз, наявність атипичних мононуклеарів.

Обстеження на віруси респіраторної групи методом РІФ: антигени аденовірусної, РС-інфекції, грипу, парагрипу не виявлені.

ІФА на ВІЛ - негативний.

ІФА на герпесвіруси: ВПГ IgM та IgG - негативні результати.

ЦМВ IgM та IgG - негативні результати.

ВЕБ VCA-IgM=0,68 (ОП кр=0,22), EA-IgG=0,8 (ОП кр=0,22) ПЛР крові: ДНК ВПГ, ЦМВ не виявлені, ДНК ВЕБ присутня.

ІФА на визначення інтерферону: концентрація α -ІФН дорівнювала 16 пкг/мл. УЗД органів черевної порожнини: паренхиматозна реакція печінки і селезінки. Консультація ЛОР-лікаря: Лакунарна ангіна. Гострий аденоїдит.

Дитині був поставлений такий діагноз: Інфекційний мононуклеоз, середньої важкості.

Пацієнт був виписаний з лікарні на 18 день перебування з одужанням, всі симптоми хвороби регресували, але залишилися незначно збільшеними шийні лімфовузли, печінка залишалася збільшеною до 1 см.

Приклад 3. (важкий перебіг). Пацієнт З., 4 роки, поступив на 4 день хвороби зі скаргами з боку батьків на підвищення у дитини температури тіла до $39,4^{\circ}\text{C}$, виключене носове дихання, дитина постійно дихає ротом, «хропить» уві сні, рот напіввідкритий, обличчя пастозне, набряклі повіки та перенісся, біль у горлі, що посилюється при ковтанні, біль у животі, висип на грудях та животі, відмова від їжі, слабкість. Лікувався вдома з при-

воду ангіни, був оглянутий дільничним педіатром, призначений ампіокс, після прийому якого з'явився геморагічний висип на тілі.

Об'єктивно при зверненні до клініки: самопочуття дуже порушене, шкіра бліда, геморагічний висип на тілі, носове дихання виключене, слизове відділяєме з носа у невеликій кількості, дитина постійно дихає ротом, рот напіввідкритий, дитина уві сні «хропить», обличчя пастозне, набряк повік та перенісся. Слизова оболонка ротоглотки різко гіперемована, мигдалики значно збільшені, торкаються один одного по середній лінії, на мигдаликах обширна біла осуга, шийні лімфовузли збільшені до 3,5 см у діаметрі, спаяні між собою, утворюють конгломерати, які змінюють конфігурацію шиї, різко болючі при пальпації, пахвинні та пахові лімфовузли збільшені до 0,7 см, рухомі, чутливі при пальпації. Печінка виступає з-під краю реберної дуги на 4 см, селезінка збільшена на 3 см. З боку інших органів і систем змін не виявлено.

Проведене обстеження:

Аналіз крові клінічний - лімфоцитоз, наявність атипичних мононуклеарів.

Обстеження на віруси респіраторної групи методом РІФ: антигени аденовірусної, РС-інфекції, грипу, парагрипу не виявлені.

ІФА на ВІЛ - негативний.

ІФА на герпесвіруси:

ВПГ IgM та IgG - негативні результати.

ЦМВ IgM та IgG - негативні результати.

ВЕБ VCA-IgM=1,25 (ОП кр=0,22), EA-IgG =1,47 (ОП кр=0,22)

ПЛР крові: ДНК ВПГ, ЦМВ не виявлені, ДНК ВЕБ присутня.

ІФА на визначення інтерферону: концентрація α -ІФН дорівнювала 8 пкг/мл.

УЗД органів черевної порожнини: ознаки гепатоспленіту.

Рентген-обстеження пазух носа: ознаки гаймориту з обох боків.

Консультація ЛОР-лікаря: Лакунарна ангіна. Гострий аденоїдит.

Генералізована лімфаденопатія.

Дитині був поставлений такий діагноз: Інфекційний мононуклеоз, важкий перебіг.

Пацієнт був виписаний з лікарні на 24 день перебування з одужанням, симптоми хвороби регресували, проте залишилися гіпертрофія мигдаликів II ступеня, збільшені шийні лімфовузли (до 1 см у діаметрі), печінка залишалася збільшеною до 1,5 см, селезінка до 0,5 см.

Обстеженню підлягали 86 дітей з інфекційним мононуклеозом віком від 2 до 14 років. З легким перебігом перебувало 14 дітей, з середньою формою тяжкості - 48, важкий перебіг мали 24 дитини. Обстеження проводили на 5-7 дні захворювання.

Запропонований спосіб простий у використанні, не потребує значних коштів і дозволяє вірогідно прогнозувати тяжкість перебігу інфекційного мононуклеозу, що дозволяє використовувати патогенетично спрямоване лікування.

