

ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДНК ВИРУСА ЭПШТЕЙНА – БАРР В ЛЕЙКОЦИТАХ КРОВИ У ДЕТЕЙ ПРИ ИНФЕКЦИОННОМ МОНОНУКЛЕОЗЕ

М.И. Попкова¹, Е.Н. Филатова¹, Е.А. Соболева², Д.А. Брызгалова¹, Е.А. Кулова³, Н.А. Сахарнов¹, О.В. Уткин¹

¹Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия

²Нижегородский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями, Нижний Новгород, Россия

³«Тонус Кроха и семейная СТОМАТОЛОГИЯ», Нижний Новгород, Россия

Diagnostic value of Epstein – Barr virus DNA quantification in blood leukocytes in children with infectious mononucleosis

M.I. Popkova¹, E.N. Filatova¹, E.A. Soboleva², D.A. Bryzgalova¹, E.A. Kulova³, N.A. Sakharnov¹, O.V. Utkin¹

¹Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after academician I.N. Blokhina, Nizhny Novgorod, Russia

²Nizhny Novgorod Regional Center for the Prevention and Control of AIDS and Infectious Diseases, Nizhny Novgorod, Russia

³Tonus Krokh and family DENTISTRY, Nizhny Novgorod, Russia

Резюме

Цель: определение порогового значения вирусной нагрузки вируса Эпштейна – Барр в лейкоцитах крови для совершенствования лабораторной диагностики инфекционного мононуклеоза у детей.

Материалы и методы: в лейкоцитах крови детей 1–17 лет ($n=163$) проведено количественное определение ДНК ВЭБ методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Сравнительный анализ вирусной нагрузки выполнен в группах пациентов с инфекционным мононуклеозом ВЭБ-этиологии ($n=67$), не ВЭБ-этиологии ($n=25$) и здоровых доноров ($n=25$). Пороговое значение установлено на основе анализа данных вирусной нагрузки у детей с активной и латентной ВЭБ-инфекцией. Статистическая обработка данных проводилась с использованием языка программирования R и среды RStudio.

Результаты. Показано, что ДНК вируса Эпштейна – Барр обнаруживается в лейкоцитах крови при инфекционном мононуклеозе, не связанном с ВЭБ, и у здоровых вирусоносителей, однако вирусная нагрузка в этих группах значительно ниже, чем у пациентов с ВЭБ-мононуклеозом ($p<0,001$). Установлено пороговое значение вирусной нагрузки на уровне 41 копия/ 10^5 клеток (или $1,6 \lg$ ДНК ВЭБ/ 10^5 клеток). Применение такого порога позволяет достичь приемлемых значений специфичности и чувствительности (0,90 и 0,85 соответственно) лабораторной диагностики. Высокая вирусная нагрузка (равная или выше установленного порогового значения) ассоциирована с повышенным в 8,5 раз риском выявления активной ВЭБ-инфекции по сравнению с детьми, у кого определяется низкая вирусная нагрузка (ниже установленного порогового значения) (ОР 8,5; 95% ДИ: 3,7–19,7; $p<0,001$).

Заключение. Предложена диагностическая стратегия лабораторного подтверждения активной ВЭБ-

Abstract

Aim. To determine the threshold value of the Epstein-Barr virus (EBV) viral load (VL) in blood leukocytes to improve the laboratory diagnostics of infectious mononucleosis in children.

Materials and methods. EBV DNA quantification in blood leukocytes in children aged 1-17 years ($n=163$) was determined by real-time polymerase chain reaction. VL were compared in groups of EBV mononucleosis ($n=67$), non-EBV mononucleosis ($n=25$) and healthy donors ($n=25$). Threshold was determined based on VL data from children with active and latent EBV infection. The R program and the RStudio environment were used for statistic analysis.

Results. EBV DNA is found in blood leukocytes in infectious mononucleosis not associated with EBV and in healthy virus carriers, however VL in these groups is significantly lower than in patients with EBV mononucleosis ($p<0.001$). The threshold value was determined – 41 copies/ 10^5 cells (or $1.6 \lg$ of EBV DNA/ 10^5 cells), which was characterized by acceptable values of specificity and sensitivity (0.90 and 0.85, respectively) of laboratory diagnostics. High EBV VL (equal to or above the set threshold) is associated with an 8.5-fold increased risk of detecting active EBV infection compared to children who have a low VL (below a set threshold) (RR 8.5; 95% CI: 3.7–19.7, $p<0.001$).

Conclusion. In general, the results obtained create prerequisites for more intensive implementation of quantitative studies of EBV DNA in blood leukocytes, both in the context of improving the early diagnosis of infectious mononucleosis and its etiological interpretation, and in terms of detailing the features of the course of EBV infection.

инфекции, а также инфекционного мононуклеоза как ее основной клинической формы. В целом, полученные результаты создают предпосылки для более интенсивного внедрения количественных исследований ДНК ВЭБ в лейкоцитах крови как в контексте совершенствования ранней диагностики инфекционного мононуклеоза и его этиологической расшифровки, так и в разрезе детализации особенностей течения ВЭБ-инфекции.

Ключевые слова: вирус Эпштейна – Барр, ДНК ВЭБ, вирусная нагрузка, пороговое значение, инфекционный мононуклеоз, ВЭБ-инфекция, лейкоциты крови, ПЦР.

Введение

В настоящее время инфекционный мононуклеоз (ИМ) остается одной из актуальных проблем педиатрии и детской инфектологии. В российских клинических рекомендациях представлено определение ИМ как острого вирусного заболевания, которое характеризуется лихорадкой, поражением ротоглотки, лимфатических узлов, печени, селезенки и своеобразными изменениями состава крови [1]. В многочисленных исследованиях показано, что ИМ является полиэтиологическим заболеванием и характеризуется выраженным полиморфизмом клинических проявлений [2, 3]. Основным этиологическим агентом ИМ является вирус Эпштейна – Барр (ВЭБ) (76,6% случаев) [4]. В свою очередь, ИМ является наиболее частой нозологической формой проявления первичной ВЭБ-инфекции (99,8%) [5], реже встречается при реактивации вируса (18,2 – 84,6%) [2].

В Российской Федерации (РФ) система эпидемиологического надзора за ВЭБ-инфекцией отсутствует. ИМ, согласно форме № 2 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях» (приказ Росстата от 20.12.2021 г. № 932), подлежит официальной статистической регистрации под обобщающим кодом В27 (по МКБ-10). При этом этиологическая расшифровка случаев по кодам международной классификации В27.0, В27.1, В27.8, В27.9 до сих пор не проводится. В последнее десятилетие ИМ постоянно входит в рейтинг инфекционных болезней, представляющих наибольшую экономическую значимость (в 2020 г. экономический ущерб составил 2 299 817,4 тыс. рублей) [6], отмечается тенденция к росту заболеваемости [7]. По-прежнему в возрастной структуре ИМ преобладают дети до 14 лет, составляя 72,8 – 76,9% [7, 8]. Хотя максимальные показатели заболеваемости регистрируют в раннем детском и дошкольном возрасте, некоторые исследователи в последние годы отмечают эпидемиологическое неблагополучие в старших возрастных группах 7 – 17 лет [8]. К тому же среди них с большей частотой диагностируют тяжелые формы ИМ [9, 10].

Key words: Epstein-Barr virus, EBV DNA, viral load, threshold value, infectious mononucleosis, EBV infection, blood leukocytes, PCR.

Диагностика ИМ осуществляется на основе применения клинических, эпидемиологических, лабораторных, инструментальных и специальных (при наличии показаний) методов [1]. Типичный для данной нозологической формы симптомокомплекс достаточно четко охарактеризован (лихорадка, интоксикация, острый тонзиллит, лимфаденопатия, гепатоспленомегалия) [1, 2, 11]. Несмотря на это, клиническая диагностика ИМ, особенно в ранние сроки заболевания, на догоспитальном этапе сопряжена с ошибочным диагнозом в 27 – 36% случаев [12 – 14]. В отношении лабораторных критериев ИМ следует констатировать, что диагностическая значимость тестирования атипичных мононуклеаров в периферической крови или гетерофильных антител существенно варьирует [12]. Гематологические и биохимические показатели крови являются неспецифическими для диагностики ИМ, но они используются при оценке степени тяжести заболевания и его осложнений [9, 10].

Широкое внедрение в клиническую и лабораторную практику высокоспецифических и чувствительных методов, таких как иммуноферментный анализ (ИФА) и полимеразная цепная реакция (ПЦР), существенно расширяет диагностические возможности при ИМ. Анализ данных литературы свидетельствует о том, что эти методы получили неравнозначное развитие и применение в контексте диагностики ИМ. Так, на основе серологических исследований на антитела к капсидному (VCA), ранним (EA) и ядерным (EBNA) антигенам ВЭБ разработаны алгоритмы диагностики, которые позволяют проводить этиологическую верификацию, дифференцировать клиническую форму и стадию заболевания. Напротив, связь выявления ДНК ВЭБ в различных биологических субстратах с особенностями клинического течения ИМ остается мало изученным вопросом [4, 9, 15 – 17]. Основная часть научно-практических работ российских авторов, посвященных проблеме ИМ, до сих пор ориентированы на оценку частоты обнаружения ДНК вируса [1, 3, 4, 9]. При этом в современных зарубежных исследованиях убедительно показана необходимость использования

количественного варианта ПЦР, в том числе для дифференциальной диагностики активной и латентной ВЭБ-инфекции [16–21]. Четко определенные пороговые значения вирусной нагрузки, которыми мог бы руководствоваться врач, в настоящее время отсутствуют [4, 18, 22].

Эффективность обнаружения патогенов во многом определяется выбором исследуемого клинического материала. Хотя исследование слюны, особенно у детей, является перспективным направлением лабораторной диагностики, поскольку это доступный, неинвазивный клинический материал, а также основной фактор передачи ВЭБ-инфекции, выделение ВЭБ со слюной отличается выраженной нестабильностью во времени [23, 24]. При острой ВЭБ-инфекции ДНК вируса в плазме или сыворотке крови может быть обнаружена с индивидуальными вариациями в течение 2 недель после появления симптомов. После инициации иммунного ответа вирусная нагрузка быстро снижается вплоть до неопределяемых уровней. Таким образом, сложилось общее представление, что обнаружение ДНК ВЭБ в плазме крови является надежным индикатором первичной ВЭБ-инфекции или реактивации вируса [17–19]. Вместе с тем, в последние годы растут доказательства высокой информативности использования лейкоцитов крови для диагностики ИМ. По данным разных исследователей, при ИМ чувствительность и специфичность количественной ПЦР в плазме варьируют в пределах 56,3–98,3% и 80,6–97,9% соответственно [20, 25]. В ряде случаев при отрицательных результатах детекции ДНК ВЭБ в плазме пациентов вирус обнаруживается в мононуклеарных клетках периферической крови (МНПК) или цельной крови [16, 19]. При этом в клеточной части крови ВЭБ остается в течение длительного времени и выявляется там в более высокой концентрации по сравнению с плазмой [17, 18].

Цель исследования — определение порогового значения вирусной нагрузки ВЭБ в лейкоцитах крови для совершенствования лабораторной диагностики инфекционного мононуклеоза у детей.

Материалы и методы исследования

Проведено комплексное клинико-лабораторное обследование 163 детей в возрасте 1–17 лет, из них 103 человека — дети, госпитализированные в Детскую инфекционную больницу № 8 г. Нижнего Новгорода с предварительным диагнозом «Инфекционный мононуклеоз», и 60 детей сопоставимого пола и возраста без клинических признаков данного заболевания, проходивших диспансеризацию в ООО «Тонус Кроха и семейная Стоматология» (г. Нижний Новгород). Информированное согласие родителей или опекунов на проведение

исследовательской работы в соответствии с положениями Хельсинкской декларации (2013) было получено лечащими врачами медицинских организаций. Работа получила одобрение на заседании локального этического комитета Нижегородского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии (ННИИЭМ) им. академика И.Н. Блохиной (Протокол № 3 от 11.11.2021 г.).

При диагностике ИМ руководствовались критериями, изложенными в национальных клинических рекомендациях [1]. Во всех случаях была установлена среднетяжелая форма ИМ. Расшифровка этиологии заболевания проводилась методами ИФА (на базе клинико-диагностической лаборатории медицинской организации) и ПЦР (в лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной). Материалом для ПЦР-исследований послужила цельная периферическая кровь, стабилизированная КЗЭДТА. В работе использовались остаточные количества образцов, полученных в первые 3 дня госпитализации или в рамках диспансеризации детей, для проведения стандартных диагностических исследований в клинической практике.

ИФА. Серологические исследования для определения специфических антител к ВЭБ (анти-VCA IgM, анти-VCA IgG с оценкой авидности, анти-EA IgG), цитомегаловирусу (ЦМВ) (анти-ЦМВ IgM, анти-ЦМВ IgG с оценкой авидности) и вирусу герпеса человека 6 (ВГЧ6) (анти-ВГЧ6 IgG) выполнены с использованием ИФА-наборов производства НПО «Диагностические системы» (Россия).

ПЦР-диагностика. Для выделения фракции лейкоцитов крови использовали реагент «Гемолитик» (Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии, Россия). Экстракцию тотальной нуклеиновой кислоты проводили с помощью комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» (Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии, Россия). Выявление и количественное определение ДНК ВЭБ, ДНК ЦМВ, ДНК ВГЧ6 выполняли методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с применением коммерческого набора «АмплиСенс® EBV/CMV/HHV6-скрин-FL» (Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии, Россия) на амплификаторе Rotor-Gene Q 5plex HRM («Qiagen», Германия). Лабораторный протокол на всех этапах ПЦР соблюдался согласно инструкции производителя, что позволяло достичь заявленной им аналитической чувствительности тест-системы 5 копий ДНК на 10^5 клеток. При обнаружении ДНК ВЭБ результаты выражали в количественном формате (вирусная нагрузка – ВН) – в копиях ДНК ВЭБ на 10^5 клеток (копии/ 10^5 клеток) и дублировали в десятичных логарифмах копий ДНК ВЭБ на 10^5 клеток

(lg ДНК ВЭБ/10⁵ клеток) для расширения возможностей сравнительного анализа результатов, полученных другими исследователями.

Группы сравнения. Для количественной оценки ДНК ВЭБ были сформированы 3 группы сравнения: пациенты с ИМ ВЭБ-этиологии (ВЭБ-ИМ), ИМ другой или неустановленной этиологии (неВЭБ-ИМ), условно здоровые дети (здоровые доноры). Из общего числа госпитализированных детей в данном исследовании участвовали только те, у которых клиничко-лабораторные показатели соответствовали критериям включения/исключения, в лейкоцитах крови была обнаружена ДНК ВЭБ, а срок от начала заболевания до момента обследования не превышал 7 дней. Критерии включения в группу ВЭБ-ИМ (n=67): соответствие клиническим критериям ИМ, анти-VCA IgM(+), ДНК ВЭБ(+) у серонегативных лиц, а критериями исключения явились отсутствие клинических проявлений ИМ, анти-ЦМВ IgM(+), анти-ЦМВ IgG(+) низкой авидности, ДНК ЦМВ(+), >1 lg ДНК ВГЧ6/10⁵ клеток. Критерии включения в группу неВЭБ-ИМ (n=25): соответствие клиническим критериям ИМ, анти-VCA IgM(-), анти-ЦМВ IgM(+), ДНК ЦМВ(+), ДНК ВГЧ6(+), а критериями исключения стали наличие анти-VCA IgM(+), анти-VCA IgG(+) низкой авидности, ДНК ВЭБ(+) у серонегативных лиц. Группу здоровых доноров (n=25) составили дети, у которых в лейкоцитах крови была обнаружена ДНК ВЭБ на фоне отсутствия клинических признаков ИМ, атипичных мононуклеаров в периферической крови и анти-VCA IgM.

При определении порогового значения ВН были сформированы две новые группы участников: группа ВЭБ-ИМ характеризовала клинический вариант течения активной ВЭБ-инфекции (активная ВЭБИ, n=67), а неВЭБ-ИМ и здоровых доноров объединили в группу лиц с латентным течением ВЭБ-инфекции (латентная ВЭБИ, n=50).

Ретроспективно на основе данных 103 медицинских карт стационарного больного проведен анализ эффективности диагностики ИМ на догоспитальном и госпитальном этапах. При этом диагноз «Инфекционный мононуклеоз» от направившего учреждения фигурировал в 57 из них, при поступлении в стационар – в 93, а в качестве окончательного клинического диагноза – в 92 случаях. Для проведения сравнительной оценки диагноза направившего учреждения и при поступлении в стационар раздельно группировали на ошибочные (не совпавшие с окончательным диагнозом) и точные (совпавшие с окончательным диагнозом).

Статистическая обработка данных. Статистическая обработка данных проводилась с использованием языка программирования R версия 4.0.0 (The R Foundation for Statistical Computing, Inc)¹ и среды RStudio версия 1.4.1106 (RStudio, RVC)². Принадлежность выборок к нормальному распределению определяли с помощью критерия Шапиро – Уилка. Поскольку распределения показателя ВН в большинстве групп имели характеристики, отличные от нормального, результаты описывали в виде Me [Q1; Q3], где Me – медиана, а Q1 и Q3 – первый и третий квартиль соответственно. Долю описывали с указанием стандартного отклонения процентной доли ($P \pm \sigma_p$, в%).

Различия ВН ВЭБ в анализируемых группах оценивали с применением теста Краскелла – Уоллиса, для попарного сравнения использован U-тест Манна – Уитни. Рассчитанные значения «p» корректировали с применением поправки Холма – Бонферрони для множественных сравнений. Различия считали статистически значимыми при скорректированном $p < 0,05$. Различия ВН ВЭБ описывали с указанием Δ ($\Delta I = CI_{.ll} - CI_{.ul}$) и уровня статистической значимости (p), где Δ – разница положений распределений, $CI_{.ll}$ и $CI_{.ul}$ – нижняя и верхняя границы 95% доверительного интервала (ΔI) разницы.

Для оценки возможности применения показателя ВН в качестве лабораторного критерия, отражающего активность инфекционного процесса при ВЭБ-инфекции и, соответственно, подтверждающего роль ВЭБ как этиологически значимого возбудителя ИМ в каждом клиническом случае, строили модель бинарной логистической регрессии. При этом в качестве независимой переменной использовали показатель ВН, а в качестве зависимой – наличие активной/латентной ВЭБ-инфекции (1 – активная ВЭБИ, 0 – латентная ВЭБИ). Для оценки стабильности модели, ее предсказательной способности и воспроизводимости результата вначале проводили кросс-валидацию модели, случайным образом разделяя совокупность данных на тренировочную и тестовую выборки в отношении 7:3. С использованием тренировочной выборки строили логит-модель, а с применением тестовой – тестировали ее точность. Оценку качества модели производили на основании показателя площади под кривой ошибок (AUC, area under curve). Процедуру повторяли 100 раз. Модель считали применимой для описания исследуемых данных при медиане полученных значений AUC выше 0,750.

¹ <https://www.R-project.org/>

² <http://www.rstudio.com/>

Для построения предсказательной бинарной логистической модели использовали полный набор данных. Оценку качества модели производили на основании показателя AUC и значения коэффициента R^2 МакФаддена. Модель принимали при значениях AUC свыше 0,750 и коэффициента МакФаддена свыше 0,200.

Для определения порогового значения ВН, соответствующего активной ВЭБ-инфекции, строили ROC-кривую отношения специфичности и чувствительности теста. Максимальное значение индекса Юдена принимали как пороговое. Для полученного порогового значения вероятности активной ВЭБ-инфекции рассчитывали соответствующее пороговое значение ВН. Затем всех исследуемых лиц объединяли в две группы: с низкой ВН (ниже пороговой) и с высокой ВН (равной или выше пороговой). Оценивали взаимосвязь между выявлением активной ВЭБ-инфекции и наличием высокой ВН. Для этого использовали критерий хи-квадрат. Рассчитывали отношение шансов и отношение рисков (ОР) выявления активной ВЭБ-инфекции у лиц с высокой ВН по сравнению с пациентами с низкой ВН, а также их доверительные интервалы. В расчетах применяли метод максимального правдоподобия и метод Вальда.

Результаты исследования

Диагностическая эффективность существующих подходов к диагностике инфекционного мононуклеоза на догоспитальном и госпитальном этапах

Проведена оценка качества диагностики ИМ на догоспитальном и госпитальном этапах медицинской помощи детям. Результаты сравнения диагноза направившего учреждения, при поступлении в стационар и окончательного клинического заключения свидетельствуют, что наибольшие сложности, связанные с диагностикой ИМ, возникают у специалистов на догоспитальном этапе. Среди всех подтвержденных случаев ИМ несоответствие диагноза направившего учреждения (гиподиагностика) выявлялось у $45,7 \pm 5,2\%$ (42/92) заболевших, а при поступлении в стационар — в $15,2 \pm 3,7\%$ (14/92) случаев. На гипердиагностику ИМ на догоспитальном и госпитальном этапах приходился относительно небольшой процент предварительных диагнозов ($12,3 \pm 4,4\%$ (7/57) и $13,9 \pm 3,6\%$ (13/93) соответственно). Установлено, что все 3 формы диагноза ИМ совпали только у $52,2 \pm 5,2\%$ (48/92) госпитализированных пациентов.

В качестве возможных факторов, затрудняющих диагностику ИМ, нами были рассмотрены возраст

детей и день от начала заболевания на момент госпитализации. В возрастной структуре заболевших ИМ дети 1–6 лет составили $63,6 \pm 5,0\%$, 7–17 лет — $36,4 \pm 5,0\%$. Основная часть детей ($68,8 \pm 4,8\%$) были госпитализированы в течение 1-й недели заболевания, а треть пациентов ($31,2 \pm 4,8\%$) поступили в стационар на 2–3-й неделе от появления первых признаков ИМ. Результаты сравнительного анализа в двух основных возрастных группах показали, что дети в возрасте до 7 лет, как правило, поступали в стационар на 1-й неделе заболевания (медиана 5 [3; 7] дней), а в 7 лет и старше — в более поздние сроки после появления клинических признаков ИМ (медиана 7 [5; 11] дней) ($p = 0,011$).

Результаты U-теста Манна-Уитни продемонстрировали, что на догоспитальном этапе на точность постановки диагноза (совпадение или расхождение с окончательным клиническим диагнозом) возраст детей не влиял ($p = 0,082$). Однако при поступлении в стационар ошибочные диагнозы встречались преимущественно у детей раннего возраста (медиана 2 [1; 5] года), а совпадение предварительного и окончательного диагнозов наблюдалось в группе детей более старшего возраста ($p = 0,026$). Установлено, что на точность постановки диагноза существенно влияет время, прошедшее с момента появления первых клинических признаков ИМ. Ошибочные диагнозы фигурировали преимущественно в раннем периоде заболевания, в то время как точные — на 7-й (5; 9) день и позднее, как на догоспитальном, так и госпитальном этапах ($p = 0,001$ и $p = 0,002$ соответственно).

Количественная оценка ДНК ВЭБ у детей при инфекционном мононуклеозе и згоровом вирусоносительстве

Проведена количественная оценка выявления ДНК ВЭБ в лейкоцитах крови у детей. На первом этапе исследования выполнен сравнительный анализ уровня ВН ВЭБ в лейкоцитах крови у детей в 3 группах: ВЭБ-ИМ, неВЭБ-ИМ и здоровые доноры. Показано, что ВН у пациентов группы ВЭБ-ИМ характеризуется наиболее высокими значениями — 190 [80; 601] копий/ 10^5 клеток ($2,3$ [1,9; 2,8] lg ДНК ВЭБ/ 10^5 клеток). В группах неВЭБ-ИМ и здоровых доноров ВН была существенно ниже, чем при ВЭБ-ИМ и составляла 5 [2; 19] копий/ 10^5 клеток ($0,7$ [0,2; 1,3] lg ДНК ВЭБ/ 10^5 клеток) и 2 [1; 6] копии/ 10^5 клеток ($0,3$ [-0,2; 0,8] lg ДНК ВЭБ/ 10^5 клеток) соответственно ($p < 0,001$ в анализируемых группах) (рис. 1).

При этом ВН в группе ВЭБ-ИМ увеличивалась относительно таковой в группе неВЭБ-ИМ на 172

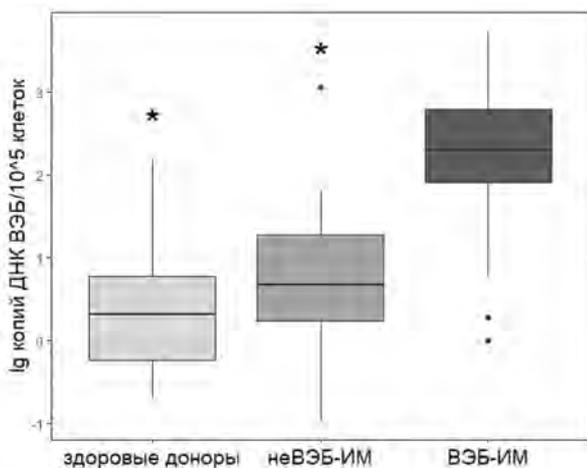


Рис. 1. Вирусная нагрузка у пациентов с инфекционным мононуклеозом ВЭБ-этиологии (ВЭБ-ИМ), другой или неустановленной этиологии (неВЭБ-ИМ) и здоровых доноров. Диаграммы размаха построены с использованием первого квартиля, медианы и третьего квартиля («коробка»), разности первого квартиля и полутора межквартильных расстояний, сумме третьего квартиля и полутора межквартильных расстояний («усы»). Точками обозначены «выбросы»; * – статистически значимые различия по сравнению с ВЭБ-ИМ, $p < 0,05$

(111 – 315, $p < 0,001$) копии/ 10^5 клеток (2,2 (2,0 – 2,5) lg ДНК ВЭБ/ 10^5 клеток), а относительно здоровых доноров на 182 (119 – 332, $p < 0,001$) копии/ 10^5 клеток (2,3 (2,1 – 2,5) lg ДНК ВЭБ/ 10^5 клеток). Различия показателя ВН в группах неВЭБ-ИМ и здоровых доноров не выявлены ($p = 0,794$).

Определение порогового значения вирусной нагрузки при ВЭБ-инфекции

Проведена оценка возможности применения показателя ВН в лейкоцитах крови у детей в качестве лабораторного критерия, отражающего активность инфекционного процесса при ВЭБ-

инфекции и подтверждающего роль ВЭБ в этиологии конкретного случая ИМ. В 2 группах (активная ВЭБИ и латентная ВЭБИ) построена модель зависимости вероятности активной ВЭБ-инфекции от ВН в лейкоцитах крови обследуемых лиц. Результаты кросс-валидации показали, что из 100 построенных моделей ни для одной показатель AUC не был ниже 0,750. Полученная медиана значений AUC 0,923 [0,888; 0,949] свидетельствует о том, что бинарная логистическая модель качественно описывает тестируемую зависимость и обладает хорошей воспроизводимостью результатов.

Для предсказания зависимости вероятности активной ВЭБ-инфекции от ВН построена модель бинарной логистической регрессии. Показатель AUC-модели составил 0,925, а значение коэффициента МакФаддена – 0,287, что свидетельствует о высоком качестве модели. Сама модель имела вид:

$$\text{Logit}(p) = \text{Log}_e(p/(1-p)) = -0,816 + 0,011 \cdot \text{ВН}$$

где ВН – вирусная нагрузка (копии ДНК ВЭБ/ 10^5 клеток), p – вероятность выявления активной ВЭБ-инфекции.

Для данной модели построена ROC-кривая и определено пороговое значение вероятности, соответствующее комбинации максимальных значений чувствительности и специфичности модели (рис. 2А). Пороговое значение вероятности составило 0,408, а соответствующие ему значения специфичности и чувствительности – 0,90 и 0,85. При указанных условиях пороговое значение ВН было эквивалентно 41 копии/ 10^5 клеток (1,6 lg ДНК ВЭБ/ 10^5 клеток). Также были рассчитаны вероятности выявления активной ВЭБ-инфекции в зависимости от показателя ВН (рис. 2Б). При этом уровень ложноположительных результатов составил 10% (5 из 50 случаев латентной ВЭБИ), ложноотрицательных – 15% (10 из 67 случаев активной ВЭБИ).

Проведено распределение всех детей в группах активной ВЭБИ и латентной ВЭБИ на 2 категории

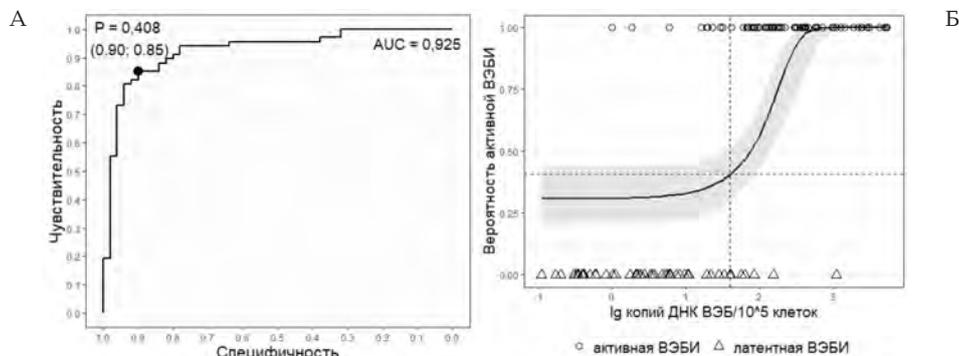


Рис. 2. Анализ предиктивной силы показателя вирусной нагрузки для выявления активной ВЭБ-инфекции: А – ROC-анализ; точкой обозначено пороговое значение вероятности и соответствующие ему значения специфичности и чувствительности; Б – предсказанные вероятности активной ВЭБ-инфекции. Закрашенная область соответствует доверительному интервалу вероятности. Пунктирными линиями обозначено пороговое значение вероятности 0,408 и соответствующее ему пороговое значение концентрации вирусной ДНК (41 копия/ 10^5 клеток = 1,6 lg ДНК ВЭБ/ 10^5 клеток). ВЭБИ – ВЭБ-инфекция

в зависимости от концентрации ДНК ВЭБ в лейкоцитах крови: с низкой ВН (ниже 41 копии/ 10^5 клеток или $1,6 \lg$ ДНК ВЭБ/ 10^5 клеток) и высокой ВН (41 копия/ 10^5 клеток или $1,6 \lg$ ДНК ВЭБ/ 10^5 клеток и выше). Установлено, что в категории лиц с низкой ВН доля детей из группы активная ВЭБИ, представленной пациентами с ИМ ВЭБ-этиологии, составила 18% (10 из 55 человек), а при высокой ВН 92% (57 из 62 человек) ($p < 0,001$). Рассчитанное отношение шансов выявления активной ВЭБ-инфекции среди детей с высокой ВН по сравнению с низкой ВН составило 51,3 (95% ДИ: 16,4 – 160,8). Рассчитанный вероятный риск активной ВЭБ-инфекции у детей при высокой ВН был в 8,5 раз выше (95% ДИ: 3,7 – 19,7), чем у детей с низкой ВН.

Обсуждение

Несмотря на широкий перечень существующих клинико-лабораторных критериев ИМ, доля ошибочных диагнозов остается относительно высокой (27 – 36%) [12 – 14, 26]. Результаты собственных исследований также свидетельствуют о недостаточно высокой точности диагностики ИМ преимущественно на догоспитальном этапе. Установлено, что расхождение диагнозов на всех этапах диагностики сопряжено, главным образом, с ранним периодом заболевания (в течение первой недели от начала клинических проявлений). У детей, поступивших в стационар позднее, предварительный диагноз на догоспитальном и госпитальном этапах поставлен значительно точнее. Более поздние сроки госпитализации от начала заболевания, несмотря на среднетяжелое течение инфекции, были характерны для детей 7 – 17 лет, что ранее также отмечалось в работах других отечественных авторов [10, 26]. Поздняя госпитализация детей может иметь неблагоприятные последствия. Кроме того, достижение ребенком возраста 5,5 лет на фоне ВЭБ-инфекции приводит к повышению риска развития гепатита с синдромом цитолиза в 1,5 раза [26]. Полученные результаты обуславливают необходимость продолжения исследований, направленных на совершенствование ранней диагностики ИМ у детей. Так, результаты одного из зарубежных исследований аргументируют необходимость сочетать определение антител к ВЭБ и ДНК вируса у детей в возрасте до 6 лет и на ранней стадии заболевания [20].

В России ПЦР является доступным и широко используемым в современной клинической практике диагностическим методом. Однако его значение в диагностическом процессе ИМ остается неопределенным, в частности, отсутствует четкий алгоритм выбора оптимального субстрата для исследования, а также интерпретации результатов, полученных в качественном или количественном варианте ПЦР. Например, согласно клиническим

рекомендациям (протокол лечения) [1], выявление ДНК ВЭБ методом ПЦР в крови и слюне является критерием лабораторного подтверждения диагноза и показано пациентам с клиническими симптомами ИМ для определения нозологии. Отметим, что детектировать ДНК ВЭБ можно как в цельной (нефракционированной) крови, так и ее отдельных компонентах (плазма, сыворотка, лейкоциты крови) [15, 17 – 19, 21]. Выделение ВЭБ со слюной отличается выраженной нестабильностью во времени [23, 24]. Кроме того, по данным разных исследователей, ДНК ВЭБ обнаруживается с разной частотой во всех перечисленных биосубстратах как при активной ВЭБ-инфекции, так и у здоровых вирусоносителей [21, 23, 24, 27]. Именно поэтому только качественное определение ДНК ВЭБ (обнаружено или нет) недостаточно информативно и диктует необходимость использования количественных вариантов ПЦР-анализа.

Так, после первичной ВЭБ-инфекции основным резервуаром вируса являются МНПК. Известно, что в латентной фазе, характерной для здоровых вирусоносителей, ВЭБ персистирует в 1 – 50 инфицированных клетках периферической крови на 1 000 000 В-лимфоцитов, тогда как в сыворотке или плазме крови вирус находится ниже предела обнаружения для одного и того же человека [15, 18, 28]. Следовательно, даже здоровые лица могут нести измеримую нагрузку ВЭБ в лейкоцитах периферической крови [19, 27]. Это может затруднять интерпретацию результатов, не давая возможности дифференцировать здоровое носительство от активной инфекции [4]. По данным литературы, у клинически здоровых индивидов ВН составляет менее 100 копий ДНК на 10^5 клеток [15]. Данные об уровне ВН ВЭБ при ИМ противоречивы. Одни авторы указывают на отсутствие диагностически значимого уровня ВН в МНПК при ИМ [4]. Другие исследователи свидетельствуют о том, что клинически значимая концентрация ДНК ВЭБ в лейкоцитах периферической крови определена и позволяет дифференцировать заболевания, ассоциированные и не ассоциированные с ВЭБ. Однако представленные ранее пороговые значения в виде $10^{2,5}$ копий генома ВЭБ/мкг ДНК [15] или $1,6 \times 10^4$ копий/ 10^6 клеток [22] трудно сопоставимы.

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что ДНК ВЭБ обнаруживается в лейкоцитах крови пациентов с ИМ, не связанным с ВЭБ, и у здоровых вирусоносителей, однако ВН в данных группах значительно ниже, чем у пациентов с ИМ ВЭБ-этиологии. На основе использованной в данной работе аналитической системы для ПЦР (описание приведено в разделе «Материалы и методы») установлено пороговое значение ВН ВЭБ на уровне 41 копия/ 10^5 клеток ($1,6 \lg$ копий ДНК ВЭБ/ 10^5 клеток). В диагностическом аспекте дан-

ный количественный критерий является приемлемым: чувствительность — 0,85; специфичность — 0,90; частота ложноположительных и ложноотрицательных результатов — 10% и 15%. Отметим, что полученные характеристики не уступают описанным ранее в литературе показателям чувствительности и специфичности определения ДНК ВЭБ в плазме крови. Рассчитанный относительный риск активной ВЭБ-инфекции у детей при высокой ВН (равной или больше указанного порогового значения) в 8,5 раз выше по сравнению с теми, у кого концентрация ДНК ВЭБ определяется на низком уровне (ОР 8,5; 95% ДИ: 3,7 — 19,7; $p < 0,001$).

В целом, по оценкам экспертов, измерение ВН ВЭБ демонстрирует высокую степень межлабораторной вариации для одной и той же пробы (до 5,66 lg копий/мл) [29]. В числе возможных причин таких различий отмечается отсутствие стандартных лабораторных протоколов подготовки образцов, широкий ассортимент наборов для ПЦР-РВ и оборудования, а также представление результатов количественного анализа в разных единицах измерения [18]. Таким образом, пороговые значения ВН, используемые для диагностики ВЭБ, могут различаться, о чем необходимо знать практикующим врачам [19]. Также отметим, что в российских публикациях, посвященных клинико-лабораторной характеристике и диагностике ИМ, включая метод ПЦР, встречаются работы, которые не содержат сведений об использованных материалах и реагентах для определения ДНК ВЭБ, лимитируя сравнительный анализ полученных данных [4, 9].

Несмотря на то, что ВОЗ разработан первый стандарт количественного теста на ДНК ВЭБ [29], в России этот анализ до сих пор остается не стандартизован. Следует отметить, что пороговые значения, хотя и представленные в настоящем исследовании в двух единицах измерения, все же могут иметь ограничения для общего использования. Требуется их валидация при работе с другими диагностическими наборами и реагентами для ПЦР-РВ.

В целом, по результатам проведенного исследования на основе количественного определения ДНК ВЭБ в лейкоцитах крови детей предложена диагностическая стратегия, которая может быть рекомендована к применению в лабораторной и клинической практике, а также научно-исследовательской работе для лабораторного подтверждения активной ВЭБ-инфекции, а также ИМ как ее основной клинической формы. Предлагаемый методический подход ориентирован на проведение дифференциальной диагностики латентной и активной ВЭБ-инфекции и этиологическую верификацию ИМ при выявлении ДНК вируса в лейкоцитах крови детей разных возрастных групп в ранние сроки от начала клинических проявлений заболевания.

Выводы

1. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости совершенствования ранней диагностики ИМ, в том числе с использованием новых лабораторных критериев. Выявлено, что гиподиагностика ИМ на догоспитальном этапе составляет $45,7 \pm 5,2\%$. У детей, поступивших в стационар позднее, предварительный диагноз на догоспитальном и госпитальном этапах поставлен значительно точнее. Дети в возрасте 7 — 17 лет, несмотря на среднетяжелое течение ИМ, поступают в стационар в более поздние сроки от начала клинических проявлений, чем дети 1 — 6 лет.

2. Показано, что в лейкоцитах крови пациентов с ВЭБ-ИМ ВН значительно выше таковой у пациентов с ИМ другой этиологии или здоровых доноров (190 [80; 601] копий/ 10^5 клеток (2,3 [1,9; 2,8] lg ДНК ВЭБ/ 10^5 клеток)).

3. Установлена взаимосвязь между ВН и вероятностью выявления активной ВЭБИ у пациента. Пороговым значением ВН является 41 копия/ 10^5 клеток (или 1,6 lg ДНК ВЭБ/ 10^5 клеток). Применение такого порога позволяет достичь высоких значений специфичности и чувствительности (0,90 и 0,85, соответственно).

4. ВН ≥ 41 копии/ 10^5 клеток (или 1,6 lg ДНК ВЭБ/ 10^5 клеток) ассоциирована с повышенным в 8,5 раз риском выявления активной ВЭБИ по сравнению с пациентами, у которых ВН < 41 копии/ 10^5 клеток (или 1,6 lg ДНК ВЭБ/ 10^5 клеток). Установленное пороговое значение может использоваться в клинической практике в качестве дополнительного лабораторного критерия при диагностике ИМ и его этиологической расшифровке в соответствии с МКБ-10. Возможным ограничением его использования является количественное определение ДНК ВЭБ с помощью реагентов и диагностических наборов, отличающихся от тех, которые применялись в данной работе.

5. На общенациональном уровне необходимо проведение стандартизации количественного определения ДНК ВЭБ для получения сопоставимых результатов ВН и установления ее диагностически значимых значений.

В целом, полученные результаты создают предпосылки для более интенсивного внедрения количественных исследований ДНК ВЭБ в лейкоцитах крови как в контексте совершенствования ранней диагностики ИМ и его этиологической расшифровки, так и в разрезе детализации особенностей течения ВЭБ-инфекции. В представленной работе содержится методология определения порогового значения вирусной нагрузки ВЭБ, которая может использоваться для решения сходных задач в отношении других социально-значимых заболеваний вирусной этиологии.

Литература

1. Мартынова, Г.П. Клинические рекомендации (протокол лечения) оказания медицинской помощи детям больным инфекционным мононуклеозом [Электронный ресурс] / Г.П. Мартынова [и др.]. Код протокола: 91500.11. B27.001-2013. Доступно по ссылке: <http://niidi.ru/dotAsset/a6816d03-b0d9-4d37-9b09-540f48e3ed43.pdf> (дата обращения 21.03.2022).
2. Демина, О.И. Инфекционный мононуклеоз у детей: клинико-лабораторная характеристика в зависимости от этиологии и фазы инфекционного процесса / О. И. Демина [и др.] // Инфекционные болезни. — 2020. — Т. 18, № 3. — С. 62–72.
3. Шамшева, О.В. Результаты многолетнего изучения герпесвирусной инфекции на кафедре инфекционных болезней у детей РНИМУ / О. В. Шамшева [и др.] // Детские инфекции. — 2017. — Т. 16, № 2. — С. 5–12.
4. Демина, О.И. Клиническая значимость вирусологических методов верификации этиологии инфекционного мононуклеоза / О. И. Демина [и др.] // Детские инфекции. — 2020. — Т. 19, № 2. — С. 29–37.
5. Yang Y, Gao F. Clinical characteristics of primary and reactivated Epstein-Barr virus infection in children. *J Med Virol.* 2020 Jul;92(12):3709-16.
6. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2020 году: Государственный доклад [Электронный ресурс]. — М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2021. — 256 с. — Доступно по ссылке: https://www.gospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=18266 (дата обращения 21.03.2022).
7. Михнева, С.А. Инфекционный мононуклеоз: пространственно-временное проявление эпидемического процесса / С.А. Михнева [и др.] // Здоровье населения и среда обитания. — 2018. — № 10. — С. 50–54.
8. Попкова, М.И. Особенности эпидемического процесса инфекционного мононуклеоза в Нижегородской области в современный период / М.И. Попкова, О.В. Уткин // Здоровье населения и среда обитания. — 2021. — № 4. — С. 79–86.
9. Тимченко, В.Н. ВЭБ-мононуклеоз на госпитальном этапе: клиническая характеристика и этиотропная терапия у детей различного возраста / В.Н. Тимченко [и др.] // Педиатр. — 2018. — Т. 9, № 6. — С. 77–82.
10. Хакизimana, Ж.К. ВЭБ-мононуклеоз у детей в современных условиях / Ж.К. Хакизimana [и др.] // Детские инфекции. — 2020. — Т. 19, № 2. — С. 23-28.
11. Демина, О.И. Клинические проявления инфекционного мононуклеоза при первичной или реактивированной герпесвирусной инфекции / О.И. Демина [и др.] // Рос. вестн. перинатол. и педиатр. — 2020. — Т. 65, № 1. — С. 37–44.
12. Никольский, М.А. Ошибки диагностики инфекционного мононуклеоза у детей / М.А. Никольский, Е.Д. Соколова, Д.А. Лиознов // *Consilium Medicum. Педиатрия (Прил.)*. — 2016. — № 3. — С. 24–28.
13. Михнева, С.А. Оценка качества клинической диагностики инфекционного мононуклеоза. / С.А. Михнева [и др.] // Практическая медицина. — 2019. — Т. 17, № 8. — С. 54–57.
14. Naughton P, Healy M, Enright F, Lucey B. Infectious Mononucleosis: diagnosis and clinical interpretation. *Br J Biomed Sci.* 2021 Jul;78(3):107-16.
15. Львов, Н.Д. Ключевые вопросы диагностики Эпштейна-Барр вирусной инфекции / Н.Д. Львов, Е.А. Дудукина // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. — 2013. — №3. — С. 24–32.
16. Kawada J, Kamiya Y, Sawada A, et al. Viral DNA Loads in Various Blood Components of Patients With Epstein-Barr Virus—Positive T-Cell/Natural Killer Cell Lymphoproliferative Diseases. *The Journal of Infectious Diseases.* 2019 Oct;220(8):1307–11.
17. Kedi W, Dongjiang X, Zhi L, et al. The rational specimen for the quantitative detection of Epstein-Barr virus DNA load. *Clin Chem Lab Med.* 2019 Apr;57(5):759-65.
18. Smatti MK, Al-Sadeq DW, Ali NH, et al. Epstein-Barr Virus Epidemiology, Serology, and Genetic Variability of LMP-1 Oncogene Among Healthy Population: An Update. *Front Oncol.* 2018 Jun;8:211.
19. Kimura H, Kwong YL. EBV Viral Loads in Diagnosis, Monitoring, and Response Assessment. *Front Oncol.* 2019 Feb;9:62.
20. Shi T, Huang L, Luo L, et al. Diagnostic value of serological and molecular biological tests for infectious mononucleosis by EBV in different age stages and course of the disease. *J Med Virol.* 2021 Jun;93(6):3824-34.
21. Meng LJ, Yu FY, Wang J, Zhang H. [The application of quantitative analysis of EBV DNA loads in plasma and peripheral blood mononuclear cells in Epstein-Barr Virus infection-related diseases in children]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi.* 2021 Sep;55(9):1083-8.
22. Yu S, Yang Q, Wu J, et al. Clinical application of Epstein-Barr virus DNA loads in Epstein-Barr virus-associated diseases: A cohort study. *J Infect.* 2021 Jan;82(1):105-11.
23. Holden DW, Gold J, Hawkes CH, et al. Epstein Barr virus shedding in multiple sclerosis: Similar frequencies of EBV in saliva across separate patient cohorts. *Mult Scler Relat. Disord.* 2018 Oct;25:197–9.
24. Byrne CM, Johnston C, Orem J, et al. Examining the dynamics of Epstein-Barr virus shedding in the tonsils and the impact of HIV-1 coinfection on daily saliva viral loads. *PLoS Comput Biol.* 2021 Jun;17(6):e1009072.
25. Kasifoglu N, Oz S, Dinleyici EC, et al. Comparison of Methods Used for the Diagnosis of Epstein-Barr Virus Infections in Children. *Pol J Microbiol.* 2018 Mar;67(1):81-8.
26. Пермякова, А.В. О возрастных особенностях инфекционного мононуклеоза / А.В. Пермякова, И.И. Львова, А.Ю. Дерюшева // Пермский медицинский журнал. — 2017. — Т. XXXIV, № 5. — С. 63–68.
27. Попкова, М.И. Методические основы дифференциальной детекции ВЭБ1/ВЭБ2 и ВГЧ6А/ВГЧ6В / М.И. Попкова [и др.] // Инфекция и иммунитет. — 2021. — Т. 11, № 6. — С. 1057–1066.
28. Babcock GJ, Decker LL, Volk M, Thorley-Lawson DA. EBV persistence in memory B cells in vivo. *Immunity.* 1998 Sep;9(3):395-404.
29. Hayden RT, Sun Y, Tang L, et al. Progress in Quantitative Viral Load Testing: Variability and Impact of the WHO Quantitative International Standards. *J Clin Microbiol.* 2017 Feb;55(2):423-30.

References

1. Martynova G.P., Kuznetsova N.F., Mazankova L.N., Sharipova E.V. Clinical recommendations (treatment protocol) for providing medical care to children with infectious mononucleosis [Internet]. 2013 [cited 2022 Mar 21]. Protocol code: 91500.11. B27.001-2013 (In Russian). Available from: <http://niidi.ru/dotAsset/a6816d03-b0d9-4d37-9b09-540f48e3ed43.pdf>
2. Demina O.I., Chebotareva T.A., Mazankova L.N., Tetova V.B., Uchaeva O.N. *Infektsionnye Bolezni.* 2020; 18(3): 62–72 (In Russian).
3. Shamsheva O.V., Kharlamova F.S., Egorova N.Yu., Molochkova O.V., Novosad E.V., Simonova E.V., et al. *Detskie Infektsii.* 2017; 16(2): 5-12 (In Russian).

4. Demina O. I., Tikhomirov D.S., Chebotareva T.A., Mazankova L.N., Tupoleva T.A. *Detskie Infektsii*. 2020; 19(2): 29-37 (In Russian).
5. Yang Y, Gao F. Clinical characteristics of primary and reactivated Epstein-Barr virus infection in children. *J Med Virol*. 2020 Jul;92(12):3709-16.
6. On the state of sanitary and epidemiological well-being of the population in the Russian Federation in 2020: State report [Internet]. Moscow: Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing; 2021 [cited 2022 Mar 21] (In Russian). Available from: https://www.rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=18266
7. Mikhneva S.A., Martinov Yu.V., Kukhtevich E.V., Grishina Yu.Yu. *Zdorov'e naseleniâ i sreda obitaniâ*. 2018; 10(307): 50-4 (In Russian).
8. Popkova M.I., Utkin O.V. *Zdorov'e naseleniâ i sreda obitaniâ*. 2021; (4): 79-86 (In Russian).
9. Timchenko V.N., Bannova S.L., Pavlova N.V., Pavlova E.B., Kaplina T.A., Fedorova A.V., et al. *Pediatr (St. Petersburg)*. 2018; 9(6): 77-82 (In Russian).
10. Hakizimana J.K., Timchenko V.N., Shakmaeva M.A., Kaplina T.A., Subbotina M.D., Bannova S.L., et al. *Detskie Infektsii*. 2020; 19(2): 23-8 (In Russian).
11. Demina O.I., Chebotareva T.A., Mazankova L.N., Tetova V.B., Uchaeva O.N. *Ros Vestn Perinatol i Pediatr*. 2020; 65(1): 37–44 (In Russian).
12. Nikolskiy M.A., Sokolova E.D., Lioznov D.A. *Consilium Medicum. Pediatrya (Pril.)*. 2016; (3): 24-8 (In Russian).
13. Mikhneva S.A., Martynov Yu.V., Popova T.I., Kukhtevich E.V., Grishina Yu.Yu. *Prakticheskaya meditsina*. 2019; 17(8): 54-7 (In Russian).
14. Naughton P, Healy M, Enright F, Lucey B. Infectious Mononucleosis: diagnosis and clinical interpretation. *Br J Biomed Sci*. 2021 Jul;78(3):107-16.
15. Lvov N.D., Dudukina E.A. *Infektsionnyye bolezni: novosti, mneniya, obucheniye*. 2013; (3): 24-32 (In Russian).
16. Kawada J, Kamiya Y, Sawada A, et al. Viral DNA Loads in Various Blood Components of Patients With Epstein-Barr Virus—Positive T-Cell/Natural Killer Cell Lymphoproliferative Diseases. *The Journal of Infectious Diseases*. 2019 Oct;220(8):1307–11.
17. Kedi W, Dongjiang X, Zhi L, et al. The rational specimen for the quantitative detection of Epstein-Barr virus DNA load. *Clin Chem Lab Med*. 2019 Apr;57(5):759-65.
18. Smatti MK, Al-Sadeq DW, Ali NH, et al. Epstein-Barr Virus Epidemiology, Serology, and Genetic Variability of LMP-1 Oncogene Among Healthy Population: An Update. *Front Oncol*. 2018 Jun;8:211.
19. Kimura H, Kwong YL. EBV Viral Loads in Diagnosis, Monitoring, and Response Assessment. *Front Oncol*. 2019 Feb;9:62.
20. Shi T, Huang L, Luo L, et al. Diagnostic value of serological and molecular biological tests for infectious mononucleosis by EBV in different age stages and course of the disease. *J Med Virol*. 2021 Jun;93(6):3824-34.
21. Meng LJ, Yu FY, Wang J, Zhang H. [The application of quantitative analysis of EBV DNA loads in plasma and peripheral blood mononuclear cells in Epstein-Barr Virus infection-related diseases in children]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*. 2021 Sep;55(9):1083-8.
22. Yu S, Yang Q, Wu J, et al. Clinical application of Epstein-Barr virus DNA loads in Epstein-Barr virus-associated diseases: A cohort study. *J Infect*. 2021 Jan;82(1):105-11.
23. Holden DW, Gold J, Hawkes CH, et al. Epstein Barr virus shedding in multiple sclerosis: Similar frequencies of EBV in saliva across separate patient cohorts. *Mult Scler Relat. Disord*. 2018 Oct;25:197–9.
24. Byrne CM, Johnston C, Orem J, et al. Examining the dynamics of Epstein-Barr virus shedding in the tonsils and the impact of HIV-1 coinfection on daily saliva viral loads. *PLoS Comput Biol*. 2021 Jun;17(6):e1009072.
25. Kasifoglu N, Oz S, Dinleyici EC, et al. Comparison of Methods Used for the Diagnosis of Epstein-Barr Virus Infections in Children. *Pol J Microbiol*. 2018 Mar;67(1):81-8.
26. Permyakova A.V., Lvova I.I., Deryusheva A.Yu. *Permskiy meditsinskiy zhurnal*. 2017; 34(5): 63–8 (In Russian).
27. Popkova M.I., Utkin O.V., Soboleva E.A., Sakharnov N.A., Bryzgalova D.A., Senatskaia A.O., Kulova E.A. *Infektsiya i immunitet*. 2021; 11(6): 1057–66 (In Russian).
28. Babcock GJ, Decker LL, Volk M, Thorley-Lawson DA. EBV persistence in memory B cells in vivo. *Immunity*. 1998 Sep;9(3):395-404.
29. Hayden RT, Sun Y, Tang L, et al. Progress in Quantitative Viral Load Testing: Variability and Impact of the WHO Quantitative International Standards. *J Clin Microbiol*. 2017 Feb;55(2):423-30.

Авторский коллектив:

Попкова Мария Игоревна — ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии Нижегородского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной, к.м.н.; тел.: 8(831)469-79-46, +7-906-352-60-15, e-mail: popmarig@mail.ru

Филатова Елена Николаевна — ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии Нижегородского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной, к.б.н.; тел.: 8(831)469-79-46, e-mail: filatova@nniem.ru

Соболева Евгения Ангреевна — врач-инфекционист Нижегородского областного центра по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями; тел.: 8(831) 214-0-214, e-mail: Fullofcarrot@rimunn.ru

Брызгалова Дарья Алексеевна — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии Нижегородского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной; тел.: 8(831)469-79-46, e-mail: moskvinadara7@gmail.com

Кулова Екатерина Александровна — врач-инфекционист, аллерголог-иммунолог «Тонуса Кроха и семейной стоматологии», к.м.н.; тел.: 8(831)411-11-55, e-mail: dr_kulova@mail.ru

Сахарнов Николай Александрович — научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии Нижегородского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной; тел.: 8(831)469-79-46, e-mail: saharnov@nniem.ru

Уткин Олег Владимирович — ведущий научный сотрудник — заведующий лабораторией молекулярной биологии и биотехнологии Нижегородского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной, к.б.н.; тел.: 8(831)469-79-45, e-mail: utkino2004@mail.ru