



УКРАЇНА

(19) UA (11) 26749 (13) U  
(51) МПК (2006)  
G01N 33/50

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ МОЖЛИВОСТІ УРАЖЕННЯ ЦНС У ХВОРИХ НА ВІРУСНУ ІНФЕКЦІЮ ЕПШТЕЙНА-БАРР

1

2

(21) u200703849

(22) 06.04.2007

(24) 10.10.2007

(72) ХОДАК ЛАРИСА АНАТОЛІЇВНА, UA,  
РЖЕВСЬКА ОЛЬГА ОЛЕКСАНДРІВНА, UA,  
СМІЛЯНСЬКА МАЙЯ ВОЛОДИМИРІВНА, UA,  
ПЕРЕМОТ СВІТЛАНА ДМИТРІВНА, UA,  
МАРТИНОВ АРТУР ВІКТОРОВИЧ, UA,  
ВОЛЯНСЬКИЙ АНДРІЙ ЮЛІЙОВИЧ, UA

(73) ХАРКІВСЬКА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ  
ПІСЛЯДИПЛОМНОЇ ОСВІТИ, UA

(56)

(57) Спосіб діагностики можливості ураження ЦНС у хворих на вірусну інфекцію Епштейна-Барр шляхом дослідження сироватки крові методом імуноферментного аналізу і визначення антитіл до вірусу Епштейна-Барр (ВЕБ), який **відрізняється** тим, що додатково визначають показники реакції непрямой імунофлюоресценції (РНІФ) і при значенні показника РНІФ від 20 до 30 %, відсутності або виявленні антитіл до ВЕБ від 0,24 до 0,6 г/л або від 1,3 до 2,5 г/л діагностують можливий розвиток енцефалічної реакції, при значенні РНІФ більше 30 % і вище діагностують можливість розвитку ВЕБ-енцефаліту.

Корисна модель відноситься до медицини, а саме до дитячих інфекційних хвороб, і може бути використана для прогнозування розвитку ускладнень з боку ЦНС у хворих на вірусну інфекцію Епштейна-Барр.

Відомим є спосіб прогнозування хронізації ВЕБ-інфекції у дітей з інфекційним мононуклеозом [В.В. Иванова, О.В. Родионова, Г.Ф. Железникова, Н.В. Александрова, Л.И. Васякина, Н.Е. Монахова, Е.В. Новожилова, Н.А. Попова. Пролонгированная иммуносупрессия и возможная хронизация инфекции у детей с инфекционным мононуклеозом. // Российский вестник перинатологии и педиатрии. - 2003. - №4. - С.50-54]. Спосіб полягає у виявленні показників, асоційованих з виникненням тривалої імуносупресії, розвитком важких форм захворювання і можливим переходом гострої ВЕБ-інфекції у хронічну. Враховувалися клінічні показники (генералізована лімфаденопатія, гіпертрофія мигдаликів III ступеня, збільшення печінки та селезінки більше, ніж на 3см нижче реберної дуги, підвищення активності трансаміназ у крові) та імунологічні показники (пригнічення відповіді Т-лімфоцитів на фітогемагглютинин, гіперпродукція IgE, накопичення циркулюючих імунних комплексів (ЦІК)).

Недоліки способу пов'язані з тим, що таким способом можливе лише визначення важких та

затяжних форм ВЕБ-інфекції з переходом у хронічну форму, проте неможливе прогнозування розвитку ускладнень з боку ЦНС.

Найбільш близьким є спосіб діагностики уражень ЦНС у хворих на ВЕБ-інфекцію [В.В. Кононенко. Ураження нервової системи вірусом Епштейна-Барр. // Лікарська справа. - 2001. - №4. - С.107-111]. Діагностика включала дослідження методом ІФА (виявлення вірус специфічних антитіл до ВЕБ), метод ПЛР (визначення ДНК ВЕБ у крові та лікворі), МРТ, ЕЕГ. У хворих поряд з вірусом Епштейна-Барр у крові та лікворі визначали також маркери інших збудників - герпесвірусів (ВПГ 1/2, ЦМВ, VZV, ВГЛ 6 типа, ВГЛ 8 типа). Але по виявленим показникам не роблять прогноз відносно можливостей розвитку ускладнень, а лише про їхню наявність або відсутність. Крім того не враховані кількісні показники специфічних антитіл.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалення способу діагностики можливості ураження ЦНС у хворих на вірусну інфекцію Епштейна-Барр, в якому за рахунок визначення додаткового показника, досягається визначення індексу флюоресценції та числових показників віруссpezifічних антитіл до ВЕБ з метою діагностики можливого розвитку ускладнень з боку ЦНС при ВЕБ-інфекції.

(19) UA (11) 26749 (13) U

Поставлена задача вирішується в способі діагностики можливості ураження ЦНС у хворих на вірусну інфекцію Епштейна-Барр шляхом дослідження сироватки крові методом ІФА і визначенні антитіл до ВЕБ, згідно з корисною моделлю, що додатково визначають показники реакції непрямой імунофлюоресценції (РНІФ) і при значенні показника РНІФ від 20 до 30%, відсутності або виявленні антитіл до ВЕБ від 0,24 до 0,6г/л, або від 1,3 до 2,5г/л діагностують можливий розвиток енцефалічної реакції, при відсутності або виявленні антитіл до ВЕБ від 0,24 до 0,6г/л і значенні РНІФ більше 30% і вище, діагностують можливість розвитку ВЕБ-енцефаліту.

РНІФ-коливання індексу флюоресценції (відношення кількості уражених лейкоцитів до неуражених, помножене на 100%) від 20 до 30%, ІФА - пригнічення антитілоутворення (вірусспецифічні антитіла або не визначалися, або мали мінімальні значення від 0,24 до 0,6г/л) або, що зустрічалося значно рідше, визначення підвищеного антитілоутворення (показники антитіл коливалися від 1,3 до 2,5г/л) разом з високими показниками ІФ. Виявлені результати пояснюють розвиток ускладнень з боку ЦНС при ВЕБ-інфекції. Так, пригнічення антитілоутворення при високих показниках вмісту ВЕБ-антигену свідчить про імуносупресію. Антитіл виробляється недостатньо, щоб зв'язати всі антигени і елімінувати вірус з організму, тому вірус активно розмножується, розвивається масивна вірусемія з проникненням ВЕБ через гематоенцефалічний бар'єр і ураженням центральної нервової системи. Другий варіант перебігу ВЕБ-інфекції з ускладненням з боку ЦНС - масивна продукція антитіл при великому вмісті антигену у крові пацієнта. Антитіла приєднуються до антигенів з утворенням циркулюючих імунних комплексів, які у великій кількості можуть мати уражуючу дію на різні органи і системи.

Обстеженню підлягали 37 дітей з ВЕБ-інфекцією віком від 2 до 14 років. Серед них 12 пацієнтів були з ВЕБ-енцефалітом, у 25 дітей ВЕБ-інфекція була ускладнена енцефалічною реакцією у вигляді судомного синдрому на фоні підвищеної температури тіла. Обстеження проводили на 5-10 дні захворювання.

Етіологію інфекційного процесу встановлювали за допомогою ІФА (визначення вірусспецифічних антитіл: анти-EBV VCA IgM, анти-EBV EA IgG), ПЛР (виявлення ДНК ВЕБ у крові, слині та лікворі), РНІФ (визначення антигену ВЕБ у лейкоцитах крові). Також у хворих поряд з вірусом Епштейна-Барр у крові та лікворі визначали маркери інших збудників - герпесвірусів (ВПГ 1/2, ЦМВ, VZV, ВГЛ 6 типа, ВГЛ 8 типа) - результати були негативні, що підтверджувало моноінфекцію ВЕБ.

Показники можливого розвитку ураження ЦНС як ускладнення ВЕБ-інфекції

Значення	Значення анти-EBV-VCA-IgM та анти-EBV-EA-IgG г/л
----------	--

РНІФ, ІФ	
20-30%	1,3-2,5г/л, або вірусспецифічні антитіла не визначаються мінімальні значення від 0,24 до 0,6г/л
30% і вище	вірусспецифічні антитіла не визначаються чи мають значення від 0,24 до 0,6г/л

Спосіб, що заявляється здійснюють таким чином.

Виявлення антитіл класу IgM і IgG до вірусу Епштейна-Барр методом імуноферментного аналізу.

Спосіб полягає у створенні комплексу "антиген-антитіло" на твердій фазі полістирольних планшет і подальша трансформація ферментної позначки у відповідний сигнал, який реєструється за допомогою спектрофотометра. Метод імуноферментного аналізу проводять на тест-системах "Вектор-Бест" (Росія), показники ІФА визначають на обладнанні фірми "Тесан" (Австрія).

Для проведення цього тесту взяту у пацієнтів венозну кров відстоюють, проводять ретракцію згустку і центрифугують при 2000об/хв. Сироватку наливають у стерильні пластикові пробірки і зберігають у замороженому стані при температурі -20°C до проведення аналізу.

Спочатку проводять гідратацію пептидів, відбувається зв'язування антитіл. Потім проводять приєднання кон'югата (розчину кролячих антитіл до імуноглобулінів людини, помічених пероксидазою хрому.) Заключним вирішальним етапом було проведення ферментативної реакції. Результати ІФА реєструють спектрофотометрично при довжині хвилі 450нм. Проводять розрахунок середнього значення оптичної щільності в лунках з негативною контрольною сироваткою (ОП<sub>кр</sub> К). Якість тест системи вважається задовільною, якщо значення оптичної щільності негативного контролю не перевищувало 0,300, а середнє значення оптичної щільності позитивної контрольної сироватки не менше, ніж у 3 рази перевищувало оптичну щільність негативного контролю. Для оцінки результатів аналізу вираховують критичний рівень оптичної щільності (ОП<sub>крит</sub>):

$$ОП_{крит} = 0,3 + ОП_{кр.К}$$

Проби вважаються позитивними, якщо значення ОП дорівнює чи перевищує ОП<sub>крит</sub>.

Визначення антигену ВЕБ за допомогою реакції імунофлюоресценції.

Для постановки РНІФ використовують тест системи "ЦИТОМЕГА-тест" ("ФІНІСТ", Москва). Виявлення антигену ВЕБ здійснюють за допомогою використання моноклональних флюорисуючих антитіл. Визначають індекс флюоресценції, який дорівнює (кількість уражених лейкоцитів поділена на кількість неуражених лейкоцитів і помножена на 100%).

Приклад 1 (без ускладнень)

Пацієнтка М., 7 років, звернулася до клініки на 5 день захворювання зі скаргами на підвищення температури тіла до 37,8С, кашель, <sup>Таблиця</sup>затруднення носового дихання, зниження апетиту, слабкість. Захворіла гостро, коли <sup>з</sup>заявилися вище перераховані скарги. Об'єктивно при зверненні до клініки: самопочуття помірно порушене, температура тіла 37,8С, частота серцебиття 100/хв, частота дихання 20/хв, тиск крові 100/60 мм.рт.ст.

бліда, чиста, носове дихання утруднене, слизове відділяєме з носа, слизова оболонка ротоглотки гіперемована, мигдалики не збільшені, шийні лімфовузли мілкі, рухомі, неbolючі при пальпації. З боку інших органів і систем змін не виявлено.

Проведене обстеження:

Аналіз крові клінічний - лімфоцитоз.

ІФА на герпесвіруси:

ВПГ IgM та IgG - негативні результати.

ЦМВ IgM та IgG - негативні результати

ВЕБ VCA-IgM=0,86 (N=0,22), EA-IgG=0,98 (N=0,22)

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

РНІФ ВЕБ-ІФ=10%

Дитині був поставлений такий діагноз: ВЕБ-інфекція, активна форма, середньої важкості, не ускладнена.

Приклад 2 (енцефалічна реакція)

Пацієнт У., 3,4 роки, поступив на 2 день хвороби зі скаргами на підвищення температури тіла до 38,2°C, кашель, нежить, отримувач симптоматичну терапію. Через 2 дні температура тіла підвищилась до 39°C, завилися короточасні тонічні судоми без втрати свідомості. Об'єктивно при зверненні до клініки: самопочуття помірно порушене, шкіра бліда, чиста, носове дихання утруднене, слизове відділяєме з носа, слизова оболонка ротоглотки гіперемована, гіпертрофія мигдаликів II ступеня, шийні лімфовузли збільшені до 0,5-0,7см у діаметрі, рухомі, чутливі при пальпації. З боку інших органів і систем змін не виявлено.

Проведене обстеження:

Аналіз крові клінічний - лімфоцитоз.

ІФА на герпесвіруси:

ВПГ IgM та IgG - негативні результати.

ЦМВ IgM та IgG - негативні результати

ВЕБ VCA-IgM=1,349 (N=0,22), EA-IgG=1,52 (N=0,22)

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

РНІФ ВЕБ-ІФ=30%

Дитині був поставлений такий діагноз: ВЕБ-інфекція, активна, важка форма. Ускладнена енцефалічною реакцією.

Приклад 3 (енцефаліт)

Пацієнт М., 3 роки, поступив на 10 день хвороби зі скаргами з боку батьків на підвищення у дитини температури тіла до 38,7°C, слабкість у правій руці і нозі (дитина відмовляється ставати на праву ногу), напади локальних судом мимічної мускулатури справа.

Anamnesis morbi: захворів 10 днів тому, коли появилися вищевказані скарги. За 3 дня до звернення заявили локальні судоми мимічних м'язів справа. Дитина була доставлена до ОДІКЛ, звідки направлена на проведення МРТ головного мозку.

Данні МРТ: набряк коркових відділів лівої полусфери, переважно у скронево-теменних відділах. Шлуночкова система помірно розширена. Лікворовідток не порушений. Гіпоплазія медіобазального відділу лівої скроневої долі з дефектом, вивпненим ліквором.

Була виключена нейрохірургічна патологія, і дитина з діагнозом енцефаліт була переведена до ОДІКЛ.

Неврологічний статус при поступленні: Опущений правий кут рота, язик по середній лінії. Явно виражений правосторонній геміпарез, більше у руці. Ліву руку піднімає, у правій руці різко обмежені. М'язовий тонус в руках D більше S за спастичним типом, рефлекс з рук D більше S. В ногах тонус без чіткої різниці, рефлекс D більше S, симптом Бабинського справа. Атаксія у положенні стоячи. Таким чином, має місце правостороннє ураження VII пари ЧМН за центральним типом, правосторонній геміпарез.

LP - ліквор інтактний.

ІФА на ВІЛ - негативний.

ІФА на герпесвіруси:

ВПГ IgM та IgG - негативні результати.

ЦМВ IgM та IgG - негативні результати

ВЕБ VCA-IgM=0,34 (N=0,22), EA-IgG=0,42 (N=0,22)

ПЛР ліквора: ДНК ВПГ, ЦМВ не виявлені, ДНК ВЕБ присутня. РНІФ - ІФ=60%

Дитині був поставлений такий діагноз: Гострий вірусний енцефаліт, обумовлений ВЕБ, важка форма. Ураження VII пари ЧМН за центральним типом. Ускладнення: Симптоматична епілепсія з поліморфними нападами.

Був проведений курс протівірусної терапії вальтрексом, ацикловіром. Стан стабілізувався, практично регресував геміпарез справа.

Запропонованим способом було досліджено 37 хворих. Спосіб простий у використанні, не потребує значних коштів і дозволяє вірогідно прогнозувати розвиток ускладнень із боку ЦНС, що дозволяє використовувати патогенетично спрямоване лікування.