



УКРАЇНА

(19) UA (11) 35316 (13) A

(51) 6 A61B10/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВІНАХІДВидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ІНФЕКЦІЙ

(21) 99095224

(22) 21.09.1999

(24) 15.03.2001

(46) 15.03.2001, Бюл. № 2, 2001 р.

(72) Ніколенко Юрій Іванович, Домашенко Ольга
Миколаївна, Дубяга Володимир Володимирович,
Ніколенко Віктор Юрійович(73) ДОНЕЦЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІ-
ВЕРСИТЕТ ІМ. М. ГОРЬКОГО(57) Спосіб діагностики інфекцій, який включає змі-
шування сироватки крові з боратним буфером рН
8,4, а для виділення антигену додають розчин по-
ліетиленгліколю з м.м.6000, проводять інкубацію

на холоді, центрифугують, відмивають преципітат
поліетиленгліколь-боратним буфером і іденти-
фікують антиген в імунохімічній реакції, і відрізня-
ється тим, що для виділення антигену у вигляді
імуних комплексів додають поліетиленгліколь до
кінцевої концентрації 3,75 %, а після відмивання
преципітату його дисоціюють 0,1N розчином
NaOH, нейтралізують 0,1 N розчином HCl, вносять
в лунки полістиролового планшету з адсорбо-
ваним специфічним антигеном і антитілами, після
інкубації відмивають забуференим фізіологічним
розчином, після чого визначають зв'язаний анти-
ген і антитіла класів JgG або JgM за допомогою
імунохімічної реакції.

Вінахід відноситься до області медицини, а
саме до імунології інфекційних захворювань і мо-
же бути використаний для діагностики інфекцій
бактеріальної та іншої етіології, наприклад, для
диференціювання гострої та хронічної ієрсиніоз-
ної інфекції.

Відомий спосіб визначення специфічності
імуних комплексів [1; А.с. № 1323959. СССР, МКИ
G 01 N 33/53. Способ определения специфичности
иммунных комплексов / Ю.А. Кузьмин, Б.В. Ка-
ралиник (СССР). - № 4024572/28-14; Заявлено
18.02.86; Опубл. 15.07.87. Бюл. № 2. - 2 с.], шля-
хом титрування дослідної проби, її підкислення до
рН 2,4-2,8, додавання антигенного або антитільно-
го еритроцитарного діагностикуму (наприклад,
ехинокозового еритроцитарного діагностикуму),
нейтралізації суміші і при збільшенні титру в порів-
нянні з контролем без підкислення взірця визна-
чають присутність імуних комплексів.

Недоліком цього способу є перед усім те, що
дисоціація імуних комплексів проводиться у кис-
лому середовищі в присутності еритроцитарних
діагностикумів, що може викликати неспецифічну
гемаглютинацію, а наступна нейтралізація не вик-
лючає цього феномену, тим паче, що реакція про-
водиться в присутності антигенів і антитіл імуних
комплексів

Відомий також спосіб прогнозування перебі-
гу запального процесу в легенях [2; А.с. №
1478123. СССР, МКИ G 01 N 33/53. Способ прог-

нозирования течения воспалительного процесса в
легких / А.К. Абрамовская, С.В. Савельева, Л.К.
Суркова, И.В. Коваленко (СССР) - № 4218637/28-
14; Заявлено 25.02.97; Опубл. 07.05.99. Бюл. №
17. - 3 с.], шляхом визначення рівня циркулюючих
імуних комплексів і титру антитіл до бактерій, ви-
ділених з мокротиння кількісним мікробіологічним
методом, і по їх рівню визначають затяжну або сп-
риятливу течію запального процесу.

Недоліком цього способу є те, що визна-
чається рівень тільки неспецифічних імуних комп-
лексів, а антитіла визначаються до мікробів, які ви-
ділені кількісним мікробіологічним методом, який є
дуже трудомістким і прогноз ставиться тільки за
одним специфічним показником - рівнем антитіл.
За цим способом неможливо диференціювати це
гострий, або це хронічний процес у стадії загост-
рення.

Найближчим по суті до способу, що заяв-
ляється, є спосіб діагностики хронічної інфекції [3;
А.с. № 1690691. СССР, МКИ A 61 B 10/00. Способ
диагностики хронической инфекции / Л.Г. Горина,
Ю.В. Вульфвич, А.Г. Гаврилова, С.А. Гончарова
(СССР). - № 4196596/83; Заявлено 19.02.87;
Опубл. 15.11.91. Бюл. № 42. - 2 с.], який включає
послідовне додавання до сироватки крові піддос-
лідного боратного буферу, поліетиленгліколю з
м.м. 6000 до кінцевої концентрації 3,5%, інкубацію
на холоді, центрифугування, відмивання преципі-
тату 3,5 %-ним поліетиленгліколь-боратним бу-

фером, нанесення на скло, фіксування етанолом і дослідження в імунохімічній реакції.

Недоліком відомого способу являється те, що циркулюючі імунні комплекси (ЦІК), які виділяються, не піддаються дисоціації. Тому визначення в них антигену за допомогою реакції імунофлюоресценції (РІФ), особливо в умовах надлишку антитіл, які утворюються при хронічних інфекціях, може бути неможливим. Цим способом не визначаються специфічні антитіла і неможливо віднести їх до конкретного класу імуноглобулінів, що не дозволяє диференціювати гостру інфекцію від хронічної.

В основу винаходу покладена задача діагностики бактеріальних і іншої етіології інфекцій шляхом виділення із крові хворих циркулюючих імунних комплексів, їх дисоціацію, визначення за допомогою ІФА специфічного антигену, специфічних антитіл, а також їхній клас - JgM, або JgG, що дає можливість диференціювати, гостру і хронічну ієрсинозну інфекцію у хворих.

Суть винаходу є в тому, що сироватку крові хворого змішують з боратним буфером рН 8,4, а для виділення антигену додають розчин поліетиленгліколю з м.м. 6000, проводять інкубацію на холоді, центрифугування, відмивання преципітату поліетиленгліколь-боратним буфером і ідентифікування антигену в імунохімічній реакції, відмінний тим, що для виділення антигену додають поліетиленгліколь до кінцевої концентрації 3,75 %, а після відмивання преципітату його дисоціюють 0,1 N розчином NaOH, нейтралізують 0,1 N розчином HCl, вносять в лунки полістиролової планшети з адсорбованими в них специфічним антигеном і антитілами, після інкубації відмивають забуференим фізіологічним розчином, визначають зв'язаний антиген і антитіла класів JgM і JgG за допомогою імуноферментного аналізу (ІФА), або радіоімунного аналізу (РІА) (імунохімічної реакції).

Новим в способі, який заявляється, є те, що виділення антигену здійснюють додаванням поліетиленгліколю до кінцевої концентрації 3,75 %, а після відмивання преципітату його дисоціюють 0,1 N розчином NaOH, нейтралізують 0,1 N розчином HCl, вносять в лунки полістиролової планшети з адсорбованими в них специфічним антигеном і антитілами, після інкубації відмивають забуференим фізіологічним розчином, визначають зв'язаний антиген і антитіла класів JgM і JgG в імунохімічній реакції.

Кінцевий діагноз, наприклад, ієрсинозу може бути встановлений тільки після проведення досліджень, спрямованих на визначення специфічного антигену ієрсинії і специфічних антитіл. При перебігові ієрсинозної інфекції в крові утворюються циркулюючі імунні комплекси (ЦІК), які включають специфічні антигени і антитіла. Вміст антитіл і антигенів в імунних комплексах утруднює їх визначення. Ті способи, що існують зараз, не дають можливості гарантованого їх визначення.

Ця задача може бути вирішена розробленим способом діагностики, який дозволяє одночасно в ЦІК визначати специфічний антиген і специфічні антитіла, а також визначати належність їх до конкретного класу імуноглобулінів JgM чи JgG. При наявності антигену і антитіл класу JgM визначають

гостру інфекцію, а антигена і антитіл класу JgG - хронічну інфекцію.

Реалізують спосіб наступним чином. Кров хворого беруть з ліктьової вени, ставлять в термостат при 37°C на три години для згортання і відокремлення сироватки від згортку, а також для попередження випадіння імунних комплексів, що мають властивості і криоглобулінів. Після чого центрифугують 5 хвилин при 3000 об/хв. Отриману сироватку розводять у три рази боратним 0,1 M буферним розчином рН 8,4 (наприклад 0,3 мл сироватки + 0,6 мл боратного буферу) і відбирають 0,33 мл суміші у центрифужну пробірку, куди додають 3 мл 4,166 % розчину поліетиленгліколю 6000 в боратному буфері. Інкують 1 годину при кімнатній температурі і ніч у холодильнику при +4°C, центрифугують при 3000 об/хв 20 хвилин, потім відмивають ЦІК 3,75 % ПЕГ в боратному буфері. Після цього дисоціацію ЦІК проводять в 0,165 мл 0,1 N розчину NaOH протягом години, нейтралізують 0,165 мл 0,1 N розчину HCl. Отриманий розчин вносять у три мікролунки полістиролової планшети, в яких адсорбовано в одній специфічний антиген, а в двох інших - специфічні антигени, і інкують при 4°C протягом 16 годин, після цього відмивають забуференим фізіологічним розчином (рН - 7,2-7,4), після чого за допомогою імуноферментного аналізу (ІФА) в першій лунці визначають специфічний антиген, в другій - антитіла класу JgM, в третій - антитіла класу JgG з моноспецифічними антиімуноглобуліновими сироватками.

При наявності специфічного антигену і антитіл класу JgM визначають гостру інфекцію, а при наявності специфічного антигену і антитіл класу JgG визначають хронічну інфекцію, а при наявності тільки антитіл класу JgG визначають перенесену раніше інфекцію.

Приклади реалізації способу.

Приклад 1. Хворий П., 22 роки, надійшов в інфекційне відділення з діагнозом ієрсиноз, хронічний перебіг з вторинними вогнищевими ураженнями (гепатит, артрит, дерматит) у стадії субкомпенсації. РПГА з ієрсинозним ОЗ діагностиком 1:200, з псевдотуберкульозним діагностиком 1:200, що менше діагностичного титру (1:400). Сироватку крові хворого розвели у 3 рази боратним буфером і до 0,33 мл суміші долили 3 мл 4,166 % розчину поліетиленгліколю ММ 6000 в боратному буфері, інкубували 1 годину при кімнатній температурі і 16 годин при температурі 4°C, центрифугували при 3000 об/хв 20 хвилин, відмивали ЦІК 3,75 % ПЕГ у боратному буфері, дисоціацію ЦІК проводили 0,1 N розчином NaOH 1 годину, нейтралізували 0,1 N розчином HCl. За допомогою ІФА визначили наявність антигену ієрсинії ентероколітика ОЗ, антитіла класу JgG до ієрсинії ентероколітика та ієрсинії псевдотуберкульозіс. Таким чином підтвердили діагноз хронічна інфекція, викликана ієрсинією ентероколітика ОЗ.

Приклад 2. Хворий О., 18 років, надійшов в інфекційне відділення з діагнозом ієрсиноз, генералізована форма, середньої важкості. Хворіє протягом місяця. РПГА з еритроцитарним ієрсинозним діагностиком ОЗ 1:200, що менше діагностичного титру - 1:400. Кров на аналіз взяли у хворого на 35-й день після захворювання. Дослід-

ження проводили як у прикладі 1. Визначили наявність в ЦІК антигену ієрсинія до ентероколітіка ОЗ, а також антитіла до нього класів JgM та JgG. Діагностовано ієрсиніоз, викликаний ієрсинія ентероколітіка ОЗ, затяжний рецидивний перебіг.

Приклад 3. Хвора Б., 25 років, надійшла в інфекційне відділення з діагнозом ієрсиніоз. Захворіла тиждень тому. РПГА з еритроцитарним ієрсиніозним діагностиком ОЗ - 1:100, що менше діагностичного титру - 1:400. Кров на аналіз взяли у хворої на 10-й день після захворювання. Дослідження проводили як у прикладі 1. Визначили наявність в ЦІК антигену ієрсинія ентероколітіка ОЗ, а також антитіла до нього класу JgM. Діагностовано ієрсиніоз, викликаний ієрсинія ентероколітіка ОЗ (третього серовару), гостра форма.

Спосіб забезпечує велику інформативність, бо виявляються специфічні антигени в ЦІК, специфічні антитіла, а також визначається клас імуноглобулінів, що дозволяє своєчасно диференціювати гострі, затяжні і хронічні форми інфекції, а це дозволяє призначати відповідне лікування і зни-

зити кількість випадків переходу ієрсиніозу у хронічну форму, а також проводити відповідне лікування хронічних форм.

Джерела інформації:

1. А.с. № 1323959. СССР, МКИ G 01 N 33/53. Способ определения специфичности иммунных комплексов / Ю.А. Кузьмин, Б.В. Каральник (СССР). - № 4024572/28-14; Заявлено 18.02.86; Опубл. 15.07.87. Бюл. №2. - 2 с. (аналог).

2. А. с. № 1478123. СССР, МКИ G 01 N 33/53. Способ прогнозирования течения воспалительного процесса в легких / А.К. Абрамовская, С.В. Савельева, Л.К. Суркова, И.В. Коваленко (СССР). - № 4218637/28-14; Заявлено 25.02.87; Опубл. 07.05.89. Бюл. № 17. - 3 с. (аналог).

3. А.с. № 1690691. СССР, МКИ А 61 В 10/00. Способ диагностики хронической инфекции / Л.Г. Горина, Ю.В. Вульфвич, А.Г. Гаврилова, С.А. Гончарова (СССР). - № 4196596/83; Заявлено 19.02.87; Опубл. 15.11.91. Бюл. № 42. - 2 с. (прототип).

Тираж 50 экз.

Відкрите акціонерне товариство «Патент»

Україна, 88000, м. Ужгород, вул. Гагаріна, 101

(03122) 3 - 72 - 89 (03122) 2 - 57 - 03

