



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **58447** (13) **U**
(51) МПК (2011.01)
A61B 10/00
G01N 33/48 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/535 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ КЛІНІКО-ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ АКТИВНИХ ФОРМ ЦИТОМЕГАЛОВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ У ВІЛ-ІНФІКОВАНИХ ОСІБ

1

2

(21) u2010111922

(22) 08.10.2010

(24) 11.04.2011

(46) 11.04.2011, Бюл.№ 7, 2011 р.

(72) ДИКИЙ БОГДАН МИКОЛАЙОВИЧ, ГРИЖАК ІГОР ГНАТОВИЧ, МАТЕЙКО ГАЛИНА БОГДАНІВНА, НІКІФОРОВА ТЕТЯНА ОЛЕКСІЇВНА, ГРИЖАК ЛІЛЯ РОМАНІВНА

(73) ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД "ІВАНО-ФРАНКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ", ДИКИЙ БОГДАН МИКОЛАЙОВИЧ, ГРИЖАК ІГОР ГНАТОВИЧ, МАТЕЙКО ГАЛИНА БОГДАНІВНА, НІКІФОРОВА ТЕТЯНА ОЛЕКСІЇВНА, ГРИЖАК ЛІЛЯ РОМАНІВНА

(57) Спосіб клініко-лабораторної діагностики активних форм цитомегаловірусної інфекції у ВІЛ-інфікованих осіб здійснюють шляхом комплексу клініко-лабораторних досліджень, який **відрізняється** тим, що проводиться у два етапи: на першому відбувається попередній відбір осіб з імовір-

ною активною цитомегаловірусною інфекцією за клінічними симптомами чи за результатами серологічного дослідження та осіб з підвищеним ризиком її активації (жінок на етапі прегравідарної підготовки, вагітних і новонароджених їхніх дітей), на другому - проведення у них одномоментного комплексу підтверджуючих досліджень (цитоскопічне дослідження осаду слини, сечі, біосубстрату із піхви, на виявлення цитомегалічних клітин, полімеразно-ланцюгової реакції на виявлення ДНК цитомегаловірусів тільки в крові); орієнтовними серологічними критеріями ймовірної активної цитомегаловірусної інфекції в одномоментному дослідженні визначається рівень антицитомегаловірусних IgG 0-20 МО/мл, або >100 МО/мл, або наявність IgM; за наявності позитивного хоча б одного підтверджуючого аналізу діагноз активної цитомегаловірусної інфекції вважається верифікованим.

Заявляється корисна модель, яка стосується медицини, зокрема інфекційних хвороб, проблем ВІЛ-інфекції та СНІДу і може бути використана для діагностики реплікативних форм цитомегаловірусної інфекції (ЦМВІ) у ВІЛ-інфікованих осіб жінок, чоловіків і дітей різного віку.

ЦМВІ характеризується як ко-вірусна опортуністична інфекція, активація якої можлива в умовах наростаючого імунodefіциту і сама вона спричинює прогресування ВІЛ-інфекції [1,2]. З наростанням ступеня імунodefіциту, який корелює зі зниженням рівня CD4+T-лімфоцитів, прогресуванням клінічної стадії захворювання, зростають ризики реактивації ЦМВІ. При первинному інфікуванні цитомегаловірусом (ЦМВ) виникає мононуклеозоподібне захворювання. На 1- 3-й стадії ВІЛ-інфекції характерний безсимптомний перебіг, що не виключає реплікацію вірусів у різних органах і виражається у підвищенні титрів антитіл до ЦМВ класу IgG. Маніфестація латентної ЦМВ-інфекції у

вигляді важких захворювань відбувається на 4 стадії ВІЛ-інфекції (СНІД) при глибокій імуносупресії (рівень CD4+T-лімфоцитів становить 50-100/мкл крові). Характерними є різноманітні ураження: хоріоретиніт, енцефаліт, менінгоенцефаліт, полірадикулопатія, пневмонія, гепатит, міокардит, нефрит, езофагіт, гастрит, ентерит, коліт. ЦМВІ є частою причиною смерті у хворих з глибоким імунodefіцитом. Верифікація діагнозу активної ЦМВІ, має вирішальне значення. Вона дозволяє скорегувати терапевтичні заходи, провести адекватне лікування, яке забезпечить контроль над реплікацією вірусів та усуне прогресування опортуністичного захворювання [1-4]. У вагітних вона може бути причиною перинатального інфікування плода і новонародженого, акушерської патології, ембріо- і фетопатій [5-8,14].

Сучасна діагностика активної ЦМВІ ґрунтується на виявленні антитіл класу IgM до цитомегаловірусу в крові, низькоавідних специфічних IgG,

(13) **U**

(11) **58447**

(19) **UA**

наростанні титру сумарних антитіл або антитіл класу IgG, детекції ДНК збудника методом полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) у біологічному матеріалі від хворого [8-10]. Використовують також цитологічні дослідження центрифугату сечі, слини, спинно-мозкової рідини, харкотиння, лаважної бронхіальної рідини, гістологічних зрізів пунктів органів, лімфатичних вузлів, секційного матеріалу, де можна побачити цитомегалічні клітини типу "совине око". Особливістю ЦМВІ є персистенція збудника в організмі упродовж всього життя, демактом якої є наявність специфічних IgG. Однак, виявлення анти-ЦМВ IgG при серологічному дослідженні не є свідченням активної інфекції, а чотириразове наростання титрів IgG в парних сироватках у ВІЛ-позитивних осіб не спостерігається. Рівні IgG-антитіл у ВІЛ-позитивних не завжди відображають активність інфекційного процесу - реплікативні форми ЦМВІ виявляються у пацієнтів із низькими і високими титрами, а також у хворих серонегативних [1-3, 8].

Специфічні антитіла класу IgM до певної міри втратили роль показника активної інфекції, оскільки визначаються у крові після первинного інфікування впродовж 12-18 тижнів і співпадають з реплікативною фазою інфекції менше, ніж у 50 % випадків. У ВІЛ-позитивних при свіжому інфікуванні цитомегаловірусом IgM часто не виробляються, а поява IgG очікується через 3-4 тижні. Отже, відсутність специфічних антитіл класів IgM і IgG не виключає наявності гострої ЦМВІ. За відсутності IgM про гостре інфікування можуть свідчити низькоавідні специфічні антитіла класу IgG. Однак, при активізації хронічної ЦМВІ авідність антитіл буде високою, а тому даний тест для діагностики хронічної активної інфекції неінформативний. Крім того, у хворих на СНІД відсутність антитіл ще не може заперечити наявності активної ЦМВІ. Аналізуючи значимість серологічних лабораторних методів діагностики ЦМВІ, можна зробити висновок про неоднозначність трактування їх результатів, виникає необхідність виконувати велику кількість різноманітних тестів із повторюванням у динаміці, що підвищує вартість обстежень і не завжди гарантує їх інформативність [8]. Для діагностики реплікативної форми ЦМВІ найчастіше застосовують метод ПЛР, за допомогою якого досліджують кров або інший матеріал від хворого (слину, сечу, ліквор, зішкріби із цервікального каналу) в залежності від локалізації уражень. Однак, через тропність збудника до багатьох тканин організму, локалізація збудника і зумовленого ним патологічного процесу в організмі невідома. У таких випадках для верифікації діагнозу ЦМВІ необхідно досліджувати методом ПЛР всі біологічні рідини, в яких може знаходитись вірус, що також значно підвищує вартість дослідження і робить його малодоступним для контингенту ВІЛ-позитивних (такі дослідження не належать до обов'язкових протокольних обстежень).

Найближчим за суттю до корисної моделі є спосіб діагностики активної ЦМВ у жінок репродуктивного віку шляхом використання серологічних маркерів та цитоскопічних методів виявлення цитомегалічних клітин у біосубстраті [11]. Однак, не-

долік методу в тому, що він не використовувався для діагностики ЦМВІ у ВІЛ-інфікованих осіб обох статей та дітей, зорієнтований переважно на безсимптомні форми захворювання, не поєднує серологічні та цитологічні і молекулярно-біологічні дослідження у певному алгоритмі.

Спосіб, що заявляється, вперше застосовується з метою оптимізації діагностичного процесу ЦМВІ у ВІЛ-інфікованих осіб.

В основу корисної моделі, що заявляється, поставлено завдання оптимізації процесу діагностики ЦМВІ у ВІЛ-інфікованих осіб різного віку і статі з мінімальною затратою матеріальних засобів і часу, використовуючи комплекс одномоментних скринінгових клінічних та лабораторних серологічних досліджень та одномоментних підтверджуючих аналізів.

Суть корисної моделі полягає в дотримуванні певного способу клініко-лабораторної діагностики активних форм цитомегаловірусної інфекції у ВІЛ-інфікованих осіб, який полягає в двоетапній послідовності. Перший етап - це виділення осіб із серологічними або клінічними ознаками ймовірної активної ЦМВІ та осіб з підвищеним ризиком її активації. Другий етап - це проведення комплексу одномоментних підтверджуючих лабораторних досліджень. До клінічних ознак ймовірної активної ЦМВІ належать: субфебрилітет чи фебрильна температура, лімфаденопатія, схуднення, проблеми із репродукцією, активний гепатит, цироз печінки, ураження сітківки ока, енцефалопатія, ентеропатія. Серологічні ознаки активності ЦМВІ: наявність високого рівня антицитомегаловірусних IgG (>100 МО/мл) чи низького (0-20 МО/мл), або IgM у сироватці крові. До осіб із підвищеним ризиком реактивації ЦМВІ належать ВІЛ-інфіковані жінки на етапі прегравідарної підготовки, вагітні, та діти, народжені від матерів із діагностованою активною ЦМВІ.

Наявність суттєвих ознак у корисній моделі - обґрунтована необхідність двоетапного способу діагностики ЦМВІ. На першому етапі відбувається відбір пацієнтів із клінічними та серологічними ознаками ймовірної активної ЦМВІ, а на другому етапі відбувається підтвердження або заперечення діагнозу на підставі наявності чи відсутності цитомегалічних клітин в біосубстраті та ДНК ЦМВ в крові. Серологічними ознаками ймовірної активної ЦМВІ визначаються рівні специфічних антитіл класу IgG >100 МО/мл чи в межах 0-20 МО/мл.

Спосіб здійснюють наступним чином. Всім ВІЛ-інфікованим пацієнтам проводяться серологічні дослідження на TORCH-групу інфекцій із визначенням специфічних антитіл класів IgG та IgM, в тому числі щодо ЦМВ, згідно з протоколом (Наказ МОЗ України від 13.04.2007 р., № 182). Серед них виділяють осіб із серологічними ознаками ймовірної активної ЦМВІ (рівень антицитомегаловірусних IgG >100 МО/мл чи в межах 0-20 МО/мл, або наявність IgM). Незалежно від наявності даних серологічних ознак, статі й віку відбирають ВІЛ-інфікованих осіб, що мають один або більше симптомів: тривалий субфебрилітет нез'ясованого походження чи фебрильна температура, полілімфаденопатія, невмотивоване схуднення, активний

гепатит, цироз печінки, запальні вогнища на сітківці ока, енцефалопатія чи проноси невстановленого походження. Відбирають жінок репродуктивного віку із безпліддям, викиднями, передчасними пологам, мертвонародженнями, природженими вадами в їхніх дітей в анамнезі та новонароджених дітей у ВІЛ-інфікованих матерів. Відбирають жінок, які бажають завагітніти. Цим групам пацієнтів проводиться комплекс верифікаційних одномоментних тестів на активну ЦМВІ: цитологічні дослідження осаду слини, сечі, біосубстрату із піхви (в жінок) на наявність цитомегалічних клітин та ПЛР на ДНК вірусів тільки в крові. За наявності хоча б однієї цитомегалічної клітини в будь-якому біологічному середовищі або якісного виявлення ДНК ЦМВ в крові діагностуємо активну форму ЦМВІ. За

негативних результатів активна ЦМВІ заперечується.

Застосування способу, що заявляється, базується на клініко-лабораторних дослідженнях 42 ВІЛ-інфікованих осіб (29 жінок, 10 чоловіків і 3 новонароджених дітей) із верифікованою активною ЦМВ-інфекцією. Встановлено, що основними проявами ЦМВІ в хворих із 1-2-ю стадіями ВІЛ-інфекції були (див. табл.): незначне схуднення, слабкість, полілімфаденопатія, періодичний субфебрилітет. В хворих із 3-ю стадією ВІЛ-інфекції додатково виявлявся субфебрилітет (за умов виключення інших причин) і помірне схуднення. В пацієнтів із 4-ю стадією ВІЛ-інфекції спостерігався мікст-гепатит (В+С+ЦМВ) з вираженою тенденцією до фіброзу і формування цирозу печінки (3 особи), у термінальній фазі СНІДу.

Таблиця.

Клінічні прояви і лабораторна діагностика цитомегаловірусної інфекції у ВІЛ-інфікованих осіб

Стадія ВІЛ-інфекції	Клінічні прояви ЦМВ	Рівень анти-ЦМВ IgG (МО/мл)	ДНК ЦМВ в крові абс/%	Цитомегалічні клітини в біосередовищі абс/%
I-II (n=12)	Субфебрилітет, слабкість, полілімфаденопатія	В межах 100-200	2/16,67 %	11/91,67 %
III (n=18)	Субфебрилітет постійний, схуднення	В межах 100-200 (n=10) 0-20 (n=4)	4/100,0 %	18/100,0 %
IV (n=9)	Фебрильна гарячка, енцефалопатія, цироз печінки, ентеропатія, пневмоніт, тривала фебрильна гарячка, кахексія	В межах 100-200 (n=2) 0-20(n=5)	9/100,0%	6/66,67%
Діти новонароджені (n=3)	Знижена маса тіла, збільшення слинних залоз, збільшення печінки	В межах 100-200 (n=2)	2/75%	3/100%
ВІЛ-Інфіковані особи без активної ЦМВІ (n=23)	Полілімфаденопатія (n=15) Збільшені розміри печінки (n=14)	В межах 20-100	0/0	0/0

(CD4+T клітини менше 50/мкл крові) виявлені поліоргани ураження: енцефалопатія, ентеропатія з профузними проносами, декомпенсований цироз печінки, пневмоніт, тривала фебрильна гарячка, кахексія. У дітей з перинатальним контактом на ВІЛ і ЦМВІ виявлені зменшена маса тіла, збільшення слинних залоз і розмірів печінки. Стосовно IgG, то в пацієнтку з активною ЦМВІ виявляли або відносно високі титри антитіл (>100 МО/мл) - у 20-ти осіб або дуже низькі (<20 МО/мл) - у 9-ти, а IgM спостерігався тільки у 3-х осіб - 10,34 %. В жодному разі не виявлено наростання титру антитіл IgG в динаміці через 2-3 тижня. Рівень антитіл класу IgG вищий від середнього (>100 МО/мл) вказував на можливу реплікацію ЦМВ, яка в умовах ВІЛ-індукованого імунodefіциту підтримувала титр антитіл на високому рівні. Рівень антитіл 0-20 МО/мл вказував на глибокий імунodefіцит, який створив умови для реплікативного вибуху ЦМВ. Виявлено маркери активної ЦМВІ: цитомегалічні клітини у біологічних середовищах (в 38 осіб - 88,37 %), ДНК ЦМВ в крові (17 осіб - 39,53 %). Одноразово обстежено 23 ВІЛ-інфіковані особи (14 жінок, 6 чоловіків і 3 дитини) в яких рівень анти-ЦМВ IgG був у межах 20-100 МО/мл, а клінічно

виявлено полілімфаденопатію - у 15, гепатоспленомегалію - у 14 дорослих. В біосередовищах специфічних цитомегалічних клітин не знайдено, ПЛР на ДНК ЦМВ в крові - від'ємна. Таким особам заперечено діагноз активної ЦМВІ. Отже, використовувати методи верифікації активної ЦМВІ (цитоскопію мазку на наявність цитомегалічних клітин та ПЛР для виявлення ДНК ЦМВ) слід в тих осіб, які мають титр специфічних антитіл високий (>100 МО/мл) або мінімально низький.

Як видно з проведеного дослідження спосіб демонструє високу ефективність у відборі груп осіб з імовірною активною ЦМВІ та високу інформативність цитоскопії на виявлення цитомегалічних клітин і реакції ПЛР. Причому у ВІЛ-інфікованих хворих на 1-3-й стадіях спостерігається вища діагностична цінність цитоскопічних методів дослідження, коли переважно спостерігається епітеліальна реплікація вірусу, а на 4-й стадії переважаюче значення має метод ПЛР, який виявляє ДНК вірусу в крові (переважають генералізовані форми ЦМВІ: енцефаліт, ретиніт, гепатит тощо). Впровадження способу діагностики активної ЦМВІ у ВІЛ-інфікованих осіб дозволяє вчасно виявляти реплікативні маніфестні і безсимптомні

форми ЦМВІ з мінімальною кількістю одномоментних обстежень, що зменшує вартість діагностичного процесу.

Спосіб простий, не вимагає спеціальних пристосувань, додаткового лабораторного обладнання, спеціальної підготовки персоналу, доступний центрам профілактики ВІЛ-інфекції та боротьби зі СНІДом.

Література

1. Бабій Н.О., Щербинська А.М. Ко-інфекції вірусного генезу у хворих на ВІЛ-інфекцію/інфекційні хвороби. - 2007. - №2. - С. 23-26.

2. Визначення авідності антитіл класу IgG до цитомегаловірусу у фазі реплікації / О.С. Прилуцький, Д.О. Лесніченко, Е.А. Майлян, та ін., О.О. Прилуцька, О.В. Садовніченко/Лабораторна діагностика - 2004.-№3.-С.47-50.

3. Дикий Б.М., Грижак І.Г., Щербинська А.Д., Воляк М.Н., Нейко Н. Медико-профілактичні аспекти ВІЛ-інфекції та СНІДу в лікарській практиці. - Івано-Франківськ, Видавництво ІФДМУ, 2007. - 236 с

4. Запорожан В.М., М.Л. Аряєв ВІЛ-інфекція і СНІД. 2-ге видання перероб. і доп. - Київ: "Здоров'я", 2004 р. - 636с.

5. Кистенева Л.Б. Цитомегаловірусная инфекция как проблема перинатальной патологии: этиология, патогенез, диагностика // Российский вестник перинатологии и педиатрии. - 2003. - №4. - С. 55-59.

6. Матейко Г.Б. Цитомегаловірусна інфекція у вагітних: особливості перебігу, ризик інфікування плода // Інфекційні хвороби. - 2004. - №4. - С. 41-43.

7. Матейко Г.Б. Вплив герпетичної та цитомегаловірусної інфекції на перебіг вагітності і пологів // Галицький лікарський вісник. - 2004. - №3. - С. 57-59.

8. Матейко Г.Б. Значимість серологічних і вірусологічних маркерів в діагностиці цитомегаловірусної інфекції у вагітних жінок // Вісник Вінницького національного медичного університету. - 2004. - Т.8, №2. - С. 513-514.

9. Прилуцький О.С. Діагностика цитомегаловірусної інфекції у вагітних жінок, плода, новонароджених // Лабораторна діагностика. - 2003. - №2. - С. 3-7.

10. Смілянська М.В. Лабораторна діагностика цитомегаловірусної інфекції // Інфекційні хвороби. - 1998. - №2. - С 50-51. 11.Спосіб діагностики реплікативних безсимптомних форм цитомегаловірусної інфекції у жінок репродуктивного віку, вагітних та новонароджених /Г.Б. Матейко, Р.С. Остяк, Л.Й. Погоріла/ Деклараційний пат. Україна, № 21854 UA, МКВ А61В5/00 (2006).

12. Спосіб діагностики цитомегаловірусної інфекції у вагітних/Патент України UA 65390 А, (А 61В 10/00, G01N 1/00, G01N 33/483)/ О.В.Гріщенко, С.В. Коровай, І.В. Полторацька, Г.А. Літкевич./ Заявка 24.07.2003 р., опубліковано 15.03.2004, бюл. №3/2004.

13.Спосіб діагностики цитомегаловірусної інфекції /Патент України UA 24583 (А 61В 10/00)/ І.В. Гомоляко, К.П. Тумасова, Л.С.Донцова, Г.В.Самсонова./ Заявка 17.01.2007 р., опубліковано 10.07.2007, бюл. №10/2007.

14. Усачова О.В. Роль цитомегаловірусів у патології вагітності, плоду та дітей раннього віку / Інфекційні хвороби. - 2008.- №2. - С. 18-23.