



УКРАЇНА

(19) UA (11) 58457 (13) A

(51) 7 A61B5/00, G01N30/90

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

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ АВТОІМУННИХ СТАНІВ ХВОРИХ НА ІНФЕКЦІЙНИЙ МОНОНУКЛЕОЗ, ВИКЛИКАНИЙ ВІРУСНОЮ ІНФЕКЦІЄЮ ЕПШТЕЙНА-БАРР

1

2

(21) 20021210486

(22) 24 12 2002

(24) 15 07 2003

(46) 15 07 2003, Бюл. №7, 2003 р

(72) Шостакович-Корецька Людмила Романівна,  
Маврутенков Віктор Володимирович, Недзвецкий  
Віктор Станіславович, Кириченко Світлана Васи-  
лівна(73) ДНІПРОПЕТРОВСЬКА ДЕРЖАВНА МЕДИЧНА  
АКАДЕМІЯ(57) Спосіб діагностики автоімунних станів у хво-  
рих на інфекційний мононуклеоз, викликаний гер-  
песвірусною інфекцією Епштейна-Барр, що вклю-

чає забір венозної крові, визначення автоантитіл в її сироватці та подальшу оцінку захворювання, який відрізняється тим, що заздалегідь отримують супернатант з людських тканин біопсійного матеріалу та лімфоцитів здорових донорів, виготовляють гомогенат на їх основі, а подальшу оцінку герпесвірусної інфекції Епштейна-Барр здійснюють за наявності специфічних автоімунних гуморальних реакцій, якщо виявляють автоантитіла до антигенів з молекулярними масами 23, 70, 120 та 140 кД, корелюючих з електрофоретичною рухомістю в SDS-гель електрофорезі

Винахід відноситься до медицини, зокрема до дослідження або аналізу матеріалів шляхом їх розділення на складові частини, імунохімічного аналізу біологічних матеріалів і може бути використаний у вірусології, імунології, терапії та клініці інфекційних захворювань дітей та дорослих

Відомий спосіб оцінки вірусних антитіл проти вірусу Епштейна-Барр шляхом імунохімічного дослідження сироватки крові [1]

До причини, що запобігає отриманню очікуваного технічного результату належить ігнорування механізмів клітинного цитолізу, що стримує ранню діагностику автоімунних ускладнень у хворих на інфекційний мононуклеоз (ІМ), викликаний вірусом Епштейна-Барр (ВЕБ)

Відомий також спосіб диференціальної діагностики різних форм ДНК-інфекцій, що містить імунохімічний аналіз, визначення субтипів загального IgG, диференціювання їх по мірі руйнування цистеїном і сорбції на стафілококах, і по мірі руйнування цистеїном і по різному рівню антитіл, що виявляються в цих підкласах діагностують гостру, хронічну або персистируючу форми інфекції [2]

Спосіб дозволяє діагностувати різні фази ДНК-вірусних інфекцій, але у відомому вигляді теж стримує оцінку ризику розвитку автоімунних ускладнень у вищезазначеного контингенту хворих, з поза не досить високої специфічності оціночних критеріїв

Поміж тим, обидва аналогі констатують лише

наявність інфекційного захворювання та не здатні до оцінки ризику розвитку ускладнення хворих на ІМ

Найбільш близьким об'єктом того ж призначення до винаходу, що заявляється, є спосіб діагностики автоімунних станів у хворих на інфекційний мононуклеоз, викликаний герпесвірусною інфекцією Епштейна-Барр, що містить забір венозної крові, визначення автоантитіл в її сироватці та подальшу оцінку захворювання, у відповідності з яким, забір венозної крові здійснюють після лабораторного підтвердження діагнозу, антивірусні антитіла виділяють з комплексів, що утримують ДНК-вірус, оцінку захворювання проводять шляхом розрахування коефіцієнта активності специфічних циркулюючих імунних комплексів (сЦІК) з подальшим їх диференціюванням відповідно до концентрації в крові [3]

Тож, використання імунохімічного аналізу у відомому рішенні задачі дозволило визначати в сироватці крові рівні сЦІК, а від того, сприяло оцінці важкості ІМ та непрямому прогнозуванню можливості розвитку його ускладнень

Однак, оцінка важкості захворювання не завжди корелює з розвитком його ускладнень, особливо, автоімунного генезу, що обмежує використання прототипу як більш об'єктивного засобу оцінки вищезгаданих ускладнень

В основу винаходу поставлено задачу розро-

(13) A

(11) 58457

(19) UA

бити такий спосіб діагностики аутоімунних станів у хворих на інфекційний мононуклеоз, викликаний герпесвірусною інфекцією Епштейна-Барр, який шляхом визначення в сироватці крові аутоантитіл до лімфоцитів, гладкої мускулатури та нервових тканин людини підвищує об'єктивність оцінки при використанні

Поставлена задача вирішується тим, що у способі діагностики аутоімунних станів у хворих на інфекційний мононуклеоз, викликаний герпесвірусною інфекцією Епштейна-Барр, що містить забір венозної крові, визначення аутоантитіл в її сироватці та подальшу оцінку захворювання, у відповідності з винаходом, заздалегідь отримують супернатант з людських тканин біопсійного матеріалу та лімфоцитів здорових донорів, виготовляють гомогенат на їх основі, а подальшу оцінку герпесвірусною інфекцією Епштейна-Барр здійснюють за наявністю специфічних аутоімунних гуморальних реакцій, якщо знаходять аутоантитіла до антигенів з молекулярними масами 23, 70, 120 та 140 кД, що корелюють з електрофоретичною рухомістю в SDS-гель електрофорезі

Запропоноване рішення задачі розширює уявлення про імунопатогенез ІМ та можливості ранньої лабораторної діагностики ускладнень на підставі тестування сироватки крові на аутоантитіла до антигенів лімфоцитів, гладкої мускулатури та нервової тканини людини

Це зумовлене тим, що в крові здорової людини аутоантитіла до антигенів лімфоцитів, гладкої мускулатури та нервової тканини не реєструються у вище означених технологічних умовах

Апелювання саме до антитіл проти антигенів нервової тканини, епітелію шлунка та лімфоцитів людини при використанні способу дозволяє уявити ймовірні механізми розвитку ускладнень з боку нервової, кістково-м'язової, кров'яної та інших систем

Дослідження аутоантитіл в сироватці крові у хворих на ІМ, що перебігає з ознаками ускладнень, обґрунтовує призначення імуносупресивної терапії, наприклад глюкокортикоїдів

Визначені значення молекулярних мас мають дискретний характер і є найбільш оптимальними. За даними експериментальних досліджень, саме цей діапазон білків 23, 70, 120 і 140 кД має забезпечити найбільш високу об'єктивність кінцевих результатів

Тож сукупність запропонованих ознак винаходу дозволяє констатувати такі динамічні риси ІМ, як поєднання імуносупресії з наявністю аутоімунної реакції, що обумовлює різноманітність ускладнень і дозволяє дійти висновку про підвищення об'єктивності оцінки ускладненого перебігу у хворих на ІМ, що викликаний ВЕБ

Інші ознаки винаходу мають уточнюючий характер і самостійного правового значення не мають

Додатково, запропонованому рішення задачі властиві підвищення результатів діагностики ще у ранньому доклінічному періоді можливих ускладнень аутоімунного характеру, забезпечення можливостей його використання як серед дітей, так і дорослих, виявлення нових аспектів імунопатогенезу ІМ, обґрунтування використання імунодепресантів в лікуванні цієї вірусної інфекції

Відомості, які підтверджують можливість здійснення способу діагностики аутоімунних станів у хворих на інфекційний мононуклеоз, викликаний герпесвірусною інфекцією Епштейна-Барр, з можливістю досягнення вищезазначеного технічного результату, полягають в наступному

Для здійснення запропонованого винаходу необхідні прилад для здійснення електрофорезу в вертикальних пластинах гелю (фірми LKB, Швеція), прилад для переносу білків з гелю до нітроцелюлозної мембрани «Блоттер» (Диа-М, РФ), джерело постійної напруги (ІПЕ-2000-02, РФ), акриламід («SIGMA», США), бісакриламід (N,N'-метален-бісакриламід) («SIGMA», США), (гліцин «SIGMA», США), трісоксиметил-амінометан («Fluka», Швеція), додецилсульфат натрію («FERRAK», Німеччина), персульфат амонію («SIGMA», США) тетраметилетілен-діамін («SIGMA», США), тритон X-100 («SIGMA», США), фізіологічний розчин («Фармак», Україна), антитіла проти імуноглобуліну людини помічені пероксидазою хрому (НДІ епідеміології і мікробіології ім. Н.Ф. Гамалеї, РФ), маркери молекулярної ваги для ДСН-гель електрофорезу («SIGMA», США)

Для оцінки аутоімунного стану хворого на ІМ, що викликаний ВЕБ, здійснюють забір венозної крові для визначення аутоантитіл в її сироватці та подальшої оцінки захворювання

Спосіб діагностики аутоімунних станів у хворих на інфекційний мононуклеоз, викликаний герпесвірусною інфекцією Епштейна-Барр включає забір венозної крові, визначення аутоантитіл в її сироватці та подальшу оцінку захворювання. Для цього заздалегідь отримують супернатант з людських тканин біопсійного матеріалу та лімфоцитів здорових донорів, виготовляють гомогенат на їх основі, а подальшу оцінку герпесвірусною інфекцією Епштейна-Барр здійснюють за наявністю специфічних аутоімунних гуморальних реакцій, якщо знаходять аутоантитіла до антигенів з молекулярними масами 23, 70, 120 та 140 кД, що корелюють з електрофоретичною рухомістю в SDS-гель електрофорезі

При цьому, лімфоцити здорових донорів отримують шляхом центрифугування у фіколоворографічному градієнті щільності 1,077, а гомогенат вищезазначених клітин центрифугують у трисбуфері рН 7,6 з 1% тритоном X-100 і 4М сечовиною. Фракції нерозчинних антигенів розділяють у пластинах поліакриламідного гелю з 0,1% SDS і градієнтом концентрації 7,5-17,5% і переносять на нітроцелюлозну мембрану електроблотом у 0,2М трисгліциновому буфері рН 8,3 з 20% метанолом протягом 120 хвилин. Нітроцелюлозну мембрану після переносу антигенів інкубують у 1% розчині бичачого сироваточного альбуміну при Т 37°C протягом 60 хвилин, «перший шар» антитіл формують шляхом його інкубації з розведеною сироваткою хворих, у співвідношенні 1:300 на ІМ при Т 37°C, протягом 60 хвилин. Нітроцелюлозну мембрану відмивають фізіологічним розчином з 0,1% тритоном X-100 і формують «другий шар» антитіл шляхом інкубації нітроцелюлозної мембрани з розчином антитіл проти мічених або кон'югованих імуноглобулінів людини пероксидазою хрому при Т 37°C, протягом 60 хвилин. Надалі відмивають ні-

роцелюлозу фізіологічним розчином і додають 0,05М трис-буфер при рН 7,4 з 0,01% діамінобензидином і 0,05% пероксидом водню, у технологічно сприятливих умовах перебігу реакції, а молекулярну масу поліпептидних сполук визначають за калібровочним графіком

Приклад Історія хвороби №167 Дитина Роман П., 11 років поступив в міську клінічну лікарню №21 ім. Є.Г. Попкова м. Дніпропетровська 10.01.02 з направленим діагнозом із ЦРЛ м. Нікополя "Гострий млявий параліч". Скарги при надходженні до шпиталю на загальну слабкість, кашель, біль та обмеження руху в нижніх кінцівках

З анамнезу захворювання відомо, що захворів гостро 30.12.01 року, коли виникли симптоми нежиті. На другий день хлопчика оглянув дільничний педіатр, який встановив діагноз «ГРВІ» і призначив лікування пеніциліном в амбулаторних умовах. 05.01.02 стан дитини різко погіршився за рахунок посилення кашлю, виникнення болю в м'язах обох стегон, що примусило педіатра направити хлопчика до ЦРЛ м. Нікополя з діагнозом «Правостороннє запалення легень? Менінгізм». В ЦРЛ м. Нікополя дитина одержала таке лікування: цефотоксим, циклоферон, імуноглобулін, лоратодин, амброксол, преднізолон, внутрішньовенну дезінтоксикаційну терапію. У зв'язку з зростанням неврологічної симптоматики, дитина була переведена до лікування в №21 міську клінічну лікарню ім. Є.Г. Попкова м. Дніпропетровська

З анамнезу життя дитини відомо, що на диспансерному обліку з приводу будь-яких захворювань вона не перебувала. Явищ алергії або несприятливих ліків не помічено

З даних епідеміологічного анамнезу наявність контакту дитини з хворим на будь-яку інфекцію не встановлена. Пацієнт з місця постійного проживання протягом місяця нікуди не виїжджав

При надходженні в шпиталь - стан середнього ступеню за рахунок неврологічних уражень. Дитина в свідомості, сон та апетит збережені. Ввечірній час спостерігається нетривале субфебрильне підвищення температури тіла. Шкіра та видимі слизові оболонки бліді, вологі і без висипки. Периферичні лімфовузли не збільшені. При огляді ротоглотки помірна гіперемія слизової задньої стінки глотки і мигдаликів, порушень ковтання або фонації немає. Дихання через ніс вільне. Функціональних ознак порушень дихання немає, при порівняльній перкусії і аускультативних патологічних симптомів не знайдено. Частота дихання 20 разів на хвилину. Серце в вікових межах, тони ритмічні і гучні, частота серцевих скорочень 85 ударів на хвилину. Живіт звичайної форми, доступний усім видам пальпації, безболісний. Печінка і селезінка не збільшені. Стіл один раз на добу, сечовипускання не порушено

Неврологічний статут: менінгальних симптомів немає, черепно-мозкові нерви не порушені, відмічається зниження м'язової сили в дистальних відділах рук і ніг, сухожильні рефлексивні на руках і ногах зжаві, періостальні - знижені, колінні, ахілові, подовженні не викликаються. Хитка хода, динамічні координаційні проби виконує правильно. В позі Ромберга виявляється хиткість

Висновки огляду фахівців суміжних спеціаль-

ностей були наступними

Невролог: гострий млявий параліч у вигляді попірадикулоневриту з явищами нижнього парапарезу переважно в дистальних відділах. Окуліст: патології органів зору немає

Лабораторні дослідження: у загальному аналізі крові відмічено лейкоцитоз (таблиця 1), сеча - без патологічних змін (таблиця 2), в протеїнограмі крові відмічені явища диспротеїнемії (таблиця 3)

Серологічні та вірусологічні дослідження від 10.01.02

Визначені маркери герпесвірусу Епштейна-Барр: гетерофільний тест методом Гоффа-Бауера - (+++), антитіла до капсидного антигену вірусу (VGA - Ig M) - сумнівні, антитіла до раннього антигену вірусу (EA - Ig G) - знайдені, антитіла до ядерного антигену вірусу (EBNA - Ig G) - знайдені, ДНК вірусу Епштейна-Барр в сироватці крові методом ПЛР - виявлено

Маркери поліовірусу: антигени поліовірусів в фекаліях не знайдено, дослідження крові методом «парних сироваток» зростання титру антитіл до вірусів поліомієліта не виявлено

Для ідентифікації збудника захворювання і виявлення аутоімунного механізму ураження нервової системи, було проведено дослідження на наявність аутоантитіл в сироватці крові по вищезгаданій методиці. Результати аналізу крові хворої дитини Романа П. (див. нижче) виявили гострофазові маркери ВЕБ-інфекції та аутоантитіла з молекулярною масою 23, 70, 120 і 140 кД до антигенів нерозчинних білків з нервової тканини, епітелію шлунка та лімфоцитів крові людини. Це обґрунтувало призначення комбінації противірусних та імуносупресивних ліків в терапії захворювання

Лікування: ліжковий режим на термін до початку регресії неврологічних уражень, дієта №15, лікувальна фізкультура по I етапі (масаж), преднізолон внутрішньо з поступовою відміною в залежності від клінічного перебігу хвороби, тропінозін внутрішньо на термін до двох тижнів, препарати калію внутрішньо на термін прийому преднізолону, цефтриаксон внутрішньом'язово, людський імуноглобулін внутрішньом'язово, прозерин і дібазол внутрішньом'язово, вітаміни В1, В6 та В12 внутрішньом'язово

Призначене лікування надало позитивний ефект, що призвело до поліпшення загального стану та регресії неврологічних уражень. Після чого хвора дитина для подальшого лікування була переведена в дитяче неврологічне відділення з діагнозом «Гострий млявий параліч, викликаний герпесвірусом Епштейна-Барр, нижній парапарез»

Тож, шляхом попереднього тестування крові на наявність аутоантитіл до антигенів нервової тканини, епітелію шлунка та лімфоцитів людини в крові у хворих на ІМ як у гострому періоді, так і стадії реконвалесценції, можливо прогнозувати перебіг хвороби і розвиток аутоімунних ускладнень, обґрунтувати призначення імуносупресивної терапії

Рання лабораторна діагностика аутоімунного стану, як предиката розвитку ускладнень, комплексна оцінка аутоімунних реакцій з уточненням ризику можливої органної патології, катamnестичне спостереження за вмістом аутоантитіл у хворих на

ІМ, створює алгоритм лабораторних досліджень, а від так, сприяє об'єктивній оцінці ефективності диспансерного спостереження та об'єктивізації обґрунтування використання протівірусної та імуносупресивної терапії в лікуванні ІМ, на разі розширення уявлень про патогенез ВЕБ-інфекції та ускладнень, що пов'язані з нею

Означені вище відомості інформують про можливість використання заявленого рішення задач в клінічній діагностиці, здебільшого у вірусології,

імунології та в клініці інфекційних захворювань. На прикладі конкретного використання доведена можливість відтворення об'єкта з високооб'єктивним визначенням аутоімунних реакцій, що спричинені вірусом Епштейна-Барр

Таким чином, розроблений спосіб діагностики аутоімунних станів у хворих на ІМ, викликаний ВЕБ-інфекцією відповідає умові «промислова придатність» і може бути кваліфікований винаходом України

Таблиця №1

Загальний аналіз крові

Дата	Нв Г/л	Ер Т/л	Лейк Г/л	П/я %	С/я %	Еоз %	Лим %	Мон %	Вир %	СОЕ мм/г
10.01.02	110	3,6	10,2	2	72	1	24	1	-	4
1.02.02	119	4,0	5,9	4	56	1	39	-	-	2

Таблиця №2

Загальний аналіз сечі

Дата	Кіпк (мл.)	Проз	рН	Щільність	Блок	Епіт п/зор	Лейк п/зор	Ерит п/зор	Бактер	Сіль
10.01.02	50	Проз	5,8	1005	-	Один	1-2	-	-	-
1.02.02	70	Проз	6,0	1020	-	3	1-2	-	-	-

Таблиця №3

Протеїнограма крові від 10.01.02

Загальний білок Г/л	С-реактивний білок (якістн.)	Альбуміни %	Глобуліни				Білковий коефіцієнт
			α-1%	α-2%	β%	γ%	
70	негативний	44	5	12	13	26	0,75

#### Джерела інформації

1 Enzyme immunofluorescent assay for anti-Epstein-Barr virus antibodies Патент США 4607008, МПКG01N33/58 / Coates Stephen R, Binder Walter L (США), Hoechst Co American (США) - №0586477, Заявл 05.03.84, Опубл 19.08.86 Патенти-аналоги EP0154917, JP60205367

2 Способ дифференциальной диагностики различных форм ДНК-вых инфекций Пат 2121683

России, МПКG01N33/53 /О А Аксенов, З А Осипова (Россия), НИИ детских инфекций (Россия) - №95119259/14, Заявл 13.11.95, Опубл 10.11.98

3 Способ диагностики тяжелых форм инфекционного мононуклеоза, вызванного вирусом Эпштейна-Барра, у детей Пат 2172956 России, МПК G01N33/536/ О А Аксенов, А А Букина, О В Родионова (Россия), НИИ детских инфекций (Россия) - №2000101936/14, Заявл 26.01.00, Опубл 27.08.01