



УКРАЇНА

(19) UA (11) 63754 (13) U

(51) МПК

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 33/49 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ТЯЖКОСТІ ЗАХВОРЮВАННЯ НА ГРИП

1

2

(21) u201101030

(22) 31.01.2011

(24) 25.10.2011

(46) 25.10.2011, Бюл. № 20, 2011 р.

(72) ТКАЧЕНКО ВАЛЕНТИНА ДМИТРІВНА, МАВРУТЕНКОВ ВІКТОР ВОЛОДИМИРОВИЧ, УШАКОВА ГАЛИНА ОЛЕКСАНДРІВНА, МАВРУТЕНКОВА ТЕТЯНА ВІКТОРІВНА

(73) ТКАЧЕНКО ВАЛЕНТИНА ДМИТРІВНА, МАВРУТЕНКОВ ВІКТОР ВОЛОДИМИРОВИЧ, УШАКОВА ГАЛИНА ОЛЕКСАНДРІВНА, МАВРУТЕНКОВА ТЕТЯНА ВІКТОРІВНА

(57) Спосіб визначення тяжкості захворювання на грип, що включає відбір проби венозної крові, виділення сироватки, дослідження концентрації маркера та оцінку перебігу захворювання, який **відрізняється** тим, що як маркер крові досліджують астроцит-специфічний кальцій-зв'язуючий білок S-100 β , а під час оцінки визначають легкий або середньо-тяжкий ступінь перебігу, якщо концентрація S-100 β в сироватці сягає $0,085 \pm 0,004$ або $0,091 \pm 0,005$ мкг/мл, відповідно.

Корисна модель належить до дослідження або аналізу матеріалів шляхом визначення їхніх хімічних властивостей, переважно біологічних, наприклад крові, та може бути використаною в медицині, насамперед, у клінічній інфектології для імунокомпетентних дорослих, позбавлених уражень центральної нервової системи (ЦНС).

Відомий спосіб визначення тяжкості захворювання на грип, переважно, у дорослих без попередніх уражень ЦНС і ознак імунодефіциту, що ґрунтується на визначенні клінічних симптомів та ознак [1]. До причин, які запобігають досягненню вищевказаного технічного результату є низька специфічність (співвідношення між наявністю симптомів та ознак при легкому й важкому перебігах грипу, а також при виникненні ускладнень) та/або чутливість окремих клінічних симптомів, що стримує можливість відмежовування важкості захворювання, спричинених грипом та ГРІ у імунокомпетентних дорослих пацієнтів без ознак попередніх уражень ЦНС [2].

Інший відомий спосіб визначення тяжкості захворювання на грип включає відбір проби венозної крові, виділення сироватки, дослідження та оцінку вмісту розчинної форми рецептора-1 до фактору некрозу пухлин (pФНПР, soluble tumor necrosis factor receptor, sTNFR), інтерлейкіну-6, інтерлейкіну-4, гамма-інтерферону та клінічних ознак [3].

Також відомий спосіб визначення тяжкості захворювання на грип, що включає, окрім оцінки клінічних ознак, відбір проби венозної крові, виділення сироватки, дослідження в ній концентрацій цитокінів і хемокінів, які продукуються у відповідь на інфекцію вірусу грипу через звичайний цитокіновий каскад. Однак, за умов гіперпродукції цитокінін призводять до незворотних серйозних ушкоджень, включаючи шок, ДВЗ, респіраторний дистрес-синдром та поліорганні недостатності, що спричиняє розвиток енцефалопатії. Тому патогенність вірусу грипу може бути визначена лише шляхом визначення кількості прозапальних цитокінів [4].

Суттєвим недоліком наведених аналогів [3, 4] є відсутність дискретних показників, які б чітко відокремлювали тяжкість хвороби і дозволяли б точно діагностувати ризик виникнення ускладнень з боку ЦНС.

В основу дійсної корисної моделі поставлена задача вдосконалити спосіб визначення тяжкості захворювання на грип, застосування котрого сприяло б шляхом селекції інформативних маркерів крові збільшенню точності діагностування, переважно у імунокомпетентних хворих, позбавлених ознак попереднього ураження ЦНС.

Вищезазначений технічний результат досягається тим, що при використанні у способі визначення тяжкості захворювання на грип, що включає

(19) UA (11) 63754 (13) U

відбір проби венозної крові, виділення сироватки, дослідження концентрації маркера та оцінку перебігу захворювання, відповідно до корисної моделі, як маркер крові досліджують астроцит специфічний кальцій-зв'язуючий білок S-100 β , а під час оцінки визначають легкий або середньо-тяжкий ступінь перебігу, якщо концентрація S-100 β в сироватці сягає $0,085 \pm 0,004$ або $0,091 \pm 0,005$ мкг/мл, відповідно.

Причинно-наслідковий зв'язок сукупності істотних ознак заявленої корисної моделі зі збільшенням точності діагностування полягає в наступному.

Проведені заявником дослідження інформують про те, що залучений астроцит специфічний кальцій-зв'язуючий білок S-100 β як маркер крові має 100% специфічність та 45% інформативність, що, поряд з можливістю отримання дискретних проміжків його концентрації в сироватці та диференціювання останніх допускає збільшення точності у 1,8-2,5 рази, відносно попередніх аналогів.

Дослідження вмісту протеїну S-100 β у сироватці крові за умов інфікування на грип розширює клінічні уявлення щодо механізмів інфекційного процесу, які виникають внаслідок зараження цими патогенами, саме у імунокомпетентних хворих без ознак попереднього ураження ЦНС. Це зумовлене тим, що у людини під час розвитку важкого інфекційного процесу відбувається ураження компонентів ЦНС, саме за рахунок прямої цитотоксичної дії вірусів грипу й ГРВІ на астрогліальні клітини, що є притаманним для цих інфекційних агентів. Визначуваний протеїн S-100 β є специфічним маркером астроцитів, його вміст починає зростати у сироватці крові лише за умов ушкодження астроцитів та зниження проникності гемато-енцефалічного бар'єру [5].

Запропонований спосіб здійснюється за стандартних умовах, не має протипоказань та вікових або тендерних обмежень.

Тому сукупність запропонованих відмітних ознак заявленої корисної моделі при вирішенні поставленої задачі і досягненні технічного результату є суттєвою, характеризує затребуваний обсяг її правового захисту "новим" і поширюється на усі випадки її багаторазової реалізації.

Відомості, які підтверджують можливість здійснення способу визначення тяжкості захворювання на грип, з можливістю перевершення заявленої технічного результату полягають в наступному.

Для здійснення корисної моделі залучають: спектрофотометр планшетного типу ІФА ("Antos 2010", Фінляндія), плоскі планшети для ІФА ("Nunc", Данія), кролячі моноспецифічні поліклональні антитіла проти S-100 β ("Sigma", США), антитіла проти IgG кроля, мічені пероксидазою хрому ("Sigma", США), білок S-100 β ("Sigma", США), забуферений фізіологічний розчин, твін-20 ("Sigma", США), ортофенілєндіамін (Sigma, США), цитрат, H₂O₂, HCl-2M.

Суть. Відбирають пробу венозної крові, виділяють сироватку, досліджують в ній астроцит специфічний кальцій-зв'язуючий білок S-100 β під час захворювання, а під час оцінки визначають легкий або середньо-тяжкий ступінь перебігу, якщо концентрація S-100 β в сироватці сягає $0,085 \pm 0,004$

або $0,091 \pm 0,005$ мкг/мл, відповідно. За цих умов збільшують точність у 1,8-2,5 рази, відносно попередніх аналогів.

Кількість астроцит специфічного білка S-100 β у сироватці крові визначають шляхом твердофазного імуноферментного аналізу [6], на основі специфічної взаємодії антигену з антитілом. Кількість білка знаходять згідно зі стандартними умовами конкурентного імуноферментного аналізу, з використанням моноспецифічних поліклональних антитіл проти S-100 β , стандартного чистого білка та антитіл проти IgG кролів, мічених пероксидазою хрому.

Концентрацію S-100 β у сироватці знаходять таким чином: сорбція до полістиролу в лунках плоского планшета для ІФА чистого S-100 β , розведеного на фосфатному буфері (50 мМ, рН 7,0) до кінцевої концентрації 0,4 мкг/100 мкл, протягом 18 год. при +4°C; промивання лунок забуференим фізіологічним розчином (ЗФР) з додаванням твіну-20-0,05%, рН 7,4-3 рази по 5 хв., по 200 мкл в лунку; блокування вільних місць зв'язування на полістиролі 1% розчином бичачого сироваткового альбуміну (БСА) на ЗФР по 200 мкл в лунку, протягом 1 год. при +37°C; одночасно проводять преінкубацію у пробірках антитіл до S-100 β (кінцеве розведення 1:1000) та антигену з дослідних зразків сироватки крові (100 мкл), впродовж години при +37°C; паралельно проводять преінкубацію для стандартних розчинів з відомою концентрацією S-100 β (1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,062; 0,031; 0,015 мкг/мл); по закінченню блокування лунки відмивають ЗФР, з додаванням твіну-20-0,05%, рН 7,4, 3 рази по 10 хв. Надалі в лунку вносять преінкубовану суміш та проводять інкубацію протягом 18 год. при +4°C, промивають ЗФР з твіном-20, 3 рази по 5 хв.; інкубують з вторинними антитілами проти IgG кролів (розведення 1:2000), міченими пероксидазою хрому, по 100 мкл в лунці, протягом 1,5 год. при +37°C. Промивають ЗФР з твіном-20, 3 рази по 5 хв. Фарбують розчином ортофенілєндіаміну -0,05%, що містить H₂O₂ 0,015% й цитрат -0,2% рН 5,5 (до розвинення стабільного жовтого кольору). Зупиняють реакцію розчином HCl-2 M, вимірюють оптичну щільність на спектрофотометрі при довжині хвилі 492 нм (для ІФА "Antos" 2010). Вміст протеїну S-100 β у сироватці крові розраховують згідно з калібрувальним графіком, побудованим за значеннями показників оптичної щільності для стандартних розчинів з відомою концентрацією чистого S-100 β .

Приклад. Історія хвороби № 197. Пацієнт Н-ов К. А., 28 років, перебував на шпитальному лікуванні з 12.01.10 по 22.01.10 в МПК № 21 ім. проф. О. Г. Попкової м. Дніпропетровська з направленим діагнозом: ГРВІ, тяжкий перебіг. Двостороння бронхопневмонія? Скарги при надходженні до шпиталю на: слабкість, озноб, лихоманку, першіння в горлі, утруднення носового дихання, сухий кашель.

З анамнезу захворювання відомо, що захворів гостро 11.01.2010, коли вперше заявили вище перераховані скарги та симптоми. Самостійно приймав жарознижуючі препарати, але стан не покращився і хворий звернувся в поліклініку за

місцем проживання. Після огляду в поліклініці пацієнт був направлений до шпиталю в МПК № 21 ім. проф. О. Г. Попкової.

З анамнезу життя пацієнта відомо, що на диспансерному обліку з приводу будь-яких хронічних захворювань не перебував. Вживання алкоголю або наркотичних сполук категорично заперечує. Алергічних реакцій на фармакологічні препарати або харчі немає.

Дані епідеміологічного анамнезу: протягом тижня перебуває в контакт з хворими на ГРВІ за місцем роботи. Пацієнт з постійного місця проживання протягом останнього місяця не виїжджав. Від грипу не щеплювався.

Загальний стан хворого при надходженні в шпиталь середнього ступеня тяжкості за рахунок загальної інтоксикації та помірних ознак дихальної недостатності. Свідомість відповідно до шкали Глазго (Glasgow) 15 балів. Шкіра звичайного забарвлення, висипка відсутня. Відмічається яскравість та гіперемія склер. Температура тіла в аксілярній області після вживання нестероїдних протизапальних засобів 38,7°C. Периферичні лімфатичні вузли не збільшені. При огляді ротоглотки відмічається яскрава гіперемія та зернистість задньої стінки горла. Відмічаються серозно-слизові виділення з носових ходів. Функціональні ознаки розладів дихання у спокої відсутні. Відмічається малопродуктивний кашель та охриплість голосу. Ознак ціанозу немає. Сатурація крові за даними пульсоксиметрії складає 96%. Частота дихання - 24 рази на хвилину. Перкуторний звук над легеньми вкорочений в нижніх відділах з обох сторін. Рухливість легеневого краю не обмежена. При аускультатії дихання жорстке, послаблене з обох сторін, більше з правої сторони. Зліва прослуховуються вологі хрипи, які не змінюють своєї локалізації після кашлю. Межі серця за даними перкусії не розширені. Тони серця за даними аускультатії ритмі-

чні, гучні, частота серцевих скорочень - 92 удари на хвилину. Симптом капілярного наповнення ногового ложа <2 секунд. Артеріальний тиск складає 150/100 мм рт. ст. Живіт м'який, звичайної форми, активно приймає участь в акті дихання. При пальпації брюшна порожнина безболісна і доступна усім видам фізичного огляду. Ознак подразнення брюшини немає. Верхня межа печінки за результатами перкусії розташована у IV міжреберному проміжку. Нижній край печінки, як за даними перкусії, так і пальпації, - біля реберної дуги. Селезінка не збільшена. Сечовипускання не порушене, добовий діурез складає ≈500 мл, сеча світлого кольору. Дефекація 1 раз за добу, екскременти контейнерного типу, фізіологічного кольору.

Неврологічний статус: ознак неврологічного "дефіциту" немає, менингеальні та вогнищеві ознаки відсутні.

На тлі застосованої терапії на другу добу перебування в шпиталі значно покращилось самопочуття, знизилась температура тіла до нормальних позначень, значно зменшилися катаральні явища та кашель. З боку респіраторної системи зникли ознаки дихальної недостатності, нормалізувалась частота дихання, пульс та артеріальний тиск, але за даними аускультатії легень зберігалось жорстке дихання, та сухі хрипи.

Лабораторні методи дослідження: у загальному аналізі крові відмічено відносний нейтрофіліоз (табл. 1), у загальному аналізі сечі (табл. 2) суттєвих патологічних змін немає.

Бактеріологічне дослідження ротоглотки на флору від 13.01.10. - патогенна мікрофлора відсутня.

Серологічні дослідження від 13.01.10. методом РТГА у сироватці крові визначено титр антитіл (1:10) до вірусу грипу А (H₁N₁).

Таблиця 1

Загальний аналіз крові

Дата	Нв Г/л	Ер. Т/л	Лейк. Г/л	П/я%	С/я%	Еоз%	Лім%	Мон%	ШОЕ мм/г
13.01.10	150	4,9	5,0	10	56	-	33	1	7
19.01.10	Не ви-кон.	Не ви-кон.	4,0	3	60	3	32	2	3

Таблиця 2

Загальний аналіз сечі

Дата	Кіл-ть (мл)	Проз.	pH	Щільн.	Білок	Епіт. п/зр	Лейк. п/зр	Ерит. п/зр	Бакт.
13.01.10	130	Мутн.	6,0	1004	немає	1-2	1-2	немає	немає

За даними рентгенографії легень у прямій проекції від 14.01.10 у нижніх відділах правої легенеї має місце інфільтрація, на тлі посилення бронхіального малюнку.

З метою об'єктивного визначення тяжкості захворювання застосовували запропонований спосіб визначення тяжкості захворювання на грип: відбирали пробу венозної крові, виділяли сироватку,

досліджували в ній шляхом твердофазного імуноферментного аналізу [6] концентрацію астроцит специфічний кальцій-зв'язуючого білка S-100β. За даними концентрації останнього констатували середньо важкий ступінь перебігу, адже концентрація S-100β в сироватці крові становила 0,099 мкг/мл у порівнянні з контрольним значенням - 0,07 мкг/мл.

Лікування: режим напівпостільний, дієта № 15, загальний обсяг калорій (рідини) розраховувався з розрахунку 30 ккал/кг маси тіла, що у даному випадку склало ≈ 2700 ккал/добу. Інфузійної терапії хворий не потребує, розрахований обсяг рідини надавати ентерально. як етіотропне лікування було застосовано осельтамівір (таміфлю®) у дозі 75 мг двічі на добу протягом 5 днів, а також азитроміцин у дозі 500 мг один раз на добу, строго у вибраний час, протягом 5 днів. як допоміжну терапію використовувались: ацетилцистеїн (АЦЦ®) у дозі 200 мг тричі на добу, мефенамінова кислота у дозі 500 мг тричі на добу, аскорутин у дозі 50 мг тричі на добу, фарингосепт у дозі 10 мг тричі на добу.

Призначене лікування привело до регресії симптомів та ознак хвороби і відновило стан пацієнта, який був виписаний в задовільному стані на 8-у добу від початку захворювання на грип з діагнозом: "Грип А (H₁N₁), типова середньо-тяжка форма. Ускладнення - позашпитальна лівостороння бронхопневмонія, дихальна недостатність 0 ст.»

Тож, вищенаведений приклад клінічного використання способу на основі засобів, які були відомі за подією пріоритету, підтверджує можливість його відтворення в клінічній діагностиці, здебільшого в клініці дитячих інфекційних захворювань, з перевіршенням технічного результату, що інформує

про відповідність критерію "промислова придатність" і допускає можливість кваліфікації об'єкта як корисної моделі процесу.

Джерела інформації:

1. Ebell M. H. Diagnosing and treating patients with suspected influenza/ M. H. Ebell // Am. Fam. Physician.-2005. - Vol.72, № 9. - P. 1789-1792.
2. Diagnosing influenza: the value of clinical clues and laboratory tests/ T. D. Hulson, J. W. Mold, D. Scheid [et al.] //J. Fam. Pract.-2001. - Vol. 50, № 12. - P. 1051-1056.
3. Lee N. L. Role of cytokines and chemokines in severe and complicated influenza infections/ N. L. Lee // Hong Kong Med J.-2009. - Vol. 15, Suppl 8. - P. 38-41.
4. Sato M., Hosoya M., Wright P. F. Differences in serum cytokine levels between influenza virus A and B infections in children// Cytokine.-2009. - V. 47(1). - P. 65-68.
5. Elevated serum levels of S-100beta protein and neuron-specific enolase are associated with brain injury in patients with severe sepsis and septic shock/ D. N. Nguyen, H. Spapen, F. Su [et al.] // Crit. Care Med.-2006. - Vol. 34, № 7. - P. 1967-1974.
6. Иммуноферментный анализ/ под ред. Т. Т. Гро, Г. Ленхоффа. - М.: Мир, 1988.-444 с.