



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) UA

(11) 104383

(13) U

(51) МПК

G01N 33/53 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2015 07391**

(22) Дата подання заявки: **23.07.2015**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **25.01.2016**

(46) Публікація відомостей **25.01.2016, Бюл.№ 2**
про видачу патенту:

(72) Винахідник(и):

**Кліманський Руслан Петрович (UA),
Веселий Сергій Володимирович (UA),
Носова Інна Миколаївна (UA)**

(73) Власник(и):

**ДОНЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. М.
ГОРЬКОГО,
вул. Машинобудівників, 39, м. Краматорськ,
Донецька обл., 84313 (UA)**

(54) СПОСІБ РАННЬОЇ ДІАГНОСТИКИ ПЕРСИСТУЮЧИХ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННИХ ІНФЕКЦІЙ У НОВОНАРОДЖЕНИХ ДІТЕЙ

(57) Реферат:

Спосіб ранньої діагностики персистуючих внутрішньоклітинних інфекцій у новонароджених дітей, який полягає у виявленні дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) збудників інфекції з використанням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), причому для виявлення інфікованості й ідентифікації персистуючих внутрішньоклітинних збудників (ПВЗ) Herpes Simplex Virus 1, 2, Cytomegalovirus, Epstein-Barr Virus, Chlamydia Trachomatis, Toxoplasma gondii, використовується ПЛР Real-time, для виявлення ДНК збудників використовується біологічний інтраопераційний матеріал (слина, вміст стравоходу, шлунку, тонкої та товстої кишки) дітей з вродженими вадами розвитку (ВВР) шлунково-кишкового тракту (ШКТ), для цього матеріал для дослідження збирається в стерильні одноразові контейнери з кришками, що закручуються, центрифугується до отримання освітленого екстракту біоматеріалу, вноситься в пробірки з розчином для лізису, ретельно перемішується на вортексі. Центрифугується до осадження крапель, прогрівається 5 хвилин при температурі 65 °C і центрифугується при 13 тис. об./хв., виділена ДНК добавляється в пробірки з реакційною сумішшю, що вміщує видоспецифічні праймери і TaqF полімерази, і виконується ампліфікація з детекцією в режимі реального часу з визначенням кількісних і якісних показників з застосуванням комп'ютерної програми.

UA 104383 U

Корисна модель належить до галузі медицини, а саме до неонатології, і може знайти застосування для діагностики внутрішньоклітинних інфекцій у новонароджених дітей.

Відомий спосіб діагностики постнатальної цитомегаловірусної і токсоплазмової інфекції, який полягає у визначенні в крові дітей від серопозитивних матерів специфічних антитіл, при цьому у дітей декілька разів визначають наявність антитіл проти токсоплазм і цитометаловірусу і, якщо в перші шість місяців життя титр антитіл знижується аж до зникнення, а в наступні місяці життя знову появляються специфічні антитіла, діагностують відповідну постнатальну інфекцію [Пат. 2077056 Российская Федерация, МПК G01N33/53, Способ диагностики постнатальной цитомегаловирусной и токсоплазменной инфекции / Вольф В.Е., Левкович М.А.; заявитель и патентообладатель Ростовский науч.-исслед. ин-т акушерства и педиатрии. - № 93029220/14; заявл. 08.06.93; опубл. 10.04.1997].

Відомий також спосіб діагностики внутрішньоутробних вірусних інфекцій у дітей, який полягає в морфологічному дослідженні плаценти, визначенні в крові матері та дитини IgM і IgG антитіл, при цьому в реакції мРСК досліджують ретроплацентарну кров дитини та матері, додатково визначають вірусні антитіла, специфічні імунні комплекси з антигенами, специфічні низькоавидні антитіла IgG₃, IgG₁₋₂ і при значеннях в ретроплацентарній крові вірусного антигену >0,1 ОЕ, рівню специфічних імунних комплексів >0,06 ОЕ, титрів антитіл >1:20 виявляють конкретного збудника вірусного плацентиту, а при наявності в сироватці крові дитини антигену вірусу >0,1 ОЕ. ЦІК>0,06 ОЕ, IgM антитіл в титрі >1:20, одного з підкласів антитіл IgG₃, IgG₁₋₂, IgG₄ у титрах в 2-4 кратному збільшенні в порівнянні з титрами матері тих же підкласів IgG, при виявленні одного з підкласів антитіл - IgG₃, IgG₁₋₂, IgG₄ у титрі >1:20, а у матері з - IgG₃, IgG₁₋₂, IgG₄ ставлять дитині діагноз внутрішньоутробної вірусної інфекції [Пат. 2310851, МПК G01N33/53. Способ диагностики внутриутробных вирусных инфекций у детей / Аксенов О.А., Осипова З.А., Закина А.А., Тихомирова О.В.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное учреждение науч.-исслед. ин-т детских инфекций. -№ 2006109653/15; заявл. 27.03.2006; опубл. 20.11.2007].

Відомий також спосіб ранньої діагностики внутрішньоутробних інфекцій у новонароджених, вибраний нами як прототип, який полягає в діагностиці перинатальних інфекцій в посліді, шляхом використання полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), при якому проби плаценти розміром 1,0 × 1,0 см у місці розриву плідних оболонок і в міжворсинчатому просторі в центрі посліду, розміщуються в ємність зі стерильним фізіологічним розчином, зберігаються не більше 4 годин при температурі +4 °С, після цього проби подрібнюються, беруться 200 мкл і проводиться лужна екстракція, додаючи до суспензії 200 мкл розчину, який вміщує 1,5 М NaCl, 0,3 М Na OH, 0,1 % розчин саркозилу, 0,5 % додецилсульфату натрію, залишається проба на 16-18 годин при температурі +4 °С, потім суспензія струшується, центрифугується при 5000 об/хв. протягом 5 хвилин, отримана суспензія переноситься в пробірку об'ємом 1,5 мл і здійснюється хлороформно-фенольна екстракція і денатурація етанолом [Пат. 2292551, МПК G01N33/53. Способ ранней диагностики внутриутробных инфекций у новорожденных / Островская О.В., Ивахнишина Н.М., Наговицына Е.Б., Пуховская Н.М., Бутко Т.М., Кожарская О.В.; заявитель и патентообладатель Государственное учреждение Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. - № 2005129856/15; заявл. 26.09.2005; опубл. 27.01.2007].

Загальними суттєвими ознаками відомого способу й того, що заявляється, є виявлення дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) збудників інфекції з використанням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Недоліками відомого способу є відсутність можливості проводити комплексну, кількісну, інформативну та достовірну діагностику персистуючих внутрішньоклітинних інфекцій у новонароджених дітей в режимі реального часу.

В основу корисної моделі поставлено задачу створення способу, який дозволяє підвищити точність і специфічність діагностики активного інфекційного процесу в дитини за рахунок виявлення інфікованості та ідентифікації персистуючих внутріклітинних збудників (ПВЗ) і виявити випадки внутрішньоутробного зараження у дітей в режимі реального часу з виявленням кількісних показників.

Поставлена задача вирішується за рахунок того, що для виявлення інфікованості й ідентифікації ПВЗ Herpes Simplex Virus 1,2, Cytomegalovirus, Epstein-Barr Virus, Chlamydia Trahomatis, Toxoplasma gondii, використовується ПЛР Real-time, для цього виявляється ДНК збудників у біологічному інтраопераційному матеріалі (слина, вміст стравоходу, шлунка, тонкої та товстої кишок) дітей з вродженими вадами розвитку (ВВР) шлунково-кишкового тракту (ШКТ), для цього матеріал для дослідження збирається в стерильні одноразові контейнери з кришками, що закручуються, центрифугується до отримання освітленого екстракту біоматеріалу,

вноситься в пробірки з розчином для лізису, ретельно перемішується на вортексі, центрифугується до осадження крапель, прогривається 5 хвилин при температурі 65 °С і центрифугується при 13 тис. об/хв., виділена ДНК добавляється в пробірки з реакційною сумішшю, що вміщує видоспецифічні праймери і TaqF полімерази і виконується ампліфікація з детекцією в режимі реального часу з визначенням кількісних і якісних показників із застосуванням комп'ютерної програми.

Приклад здійснення способу.

Для виявлення інфікованості й ідентифікації ПВ3 Herpes Simplex Virus 1,2, Cytomegalovirus, Epstein-Barr Virus, Chlamydia Trahomatis, Toxoplasma gondii, використовували ПЛР Real-time, яка є високочутливою, що дозволяє верифікувати збудника навіть у малих дозах біоматеріалу. Для виявлення ДНК збудників, що досліджувалися, біологічний інтраопераційний матеріал (слина, вміст стравоходу, шлунка, тонкої та товстої кишок) збирали в стерильні одноразові контейнери з кришками, що закручуються, центрифугували при 10 000 об/хв. протягом 5 хвилин, до отримання освітленого екстракту біоматеріалу, вносили в пробірки з розчином для лізису, ретельно перемішували на вортексі, центрифугували до осадження крапель протягом 5 секунд, прогривали 5 хвилин при температурі 65 °С при 13 тис. об/хв., виділену ДНК добавляли в пробірки з реакційною сумішшю, що вміщує видоспецифічні праймери і TaqF полімерази, виконували ампліфікацію з детекцією в режимі реального часу на приладі "Rotor-Gene".

Для ампліфікації використовували комп'ютерну програму "АмплиСенс-1".

Дані досліджень наведені в таблиці.

Таблиця

Етап	Температура, °С	Тривалість етапу	Виміри флуоресценції	Кількість циклів
1	95	15 мин	-	1
2	95	5 с	-	5
	60	20 с	-	
	72	15 с	-	
3	95	5 с	-	40
	60	30 с	FAM, HEX	
	72	15 с		

Отримані дані-криві накопичення флуоресцентного сигналу по каналах FAM, HEX - аналізували за допомогою програмного забезпечення приладу "Rotor-Gene".

По каналу - FAM/Green - реєстрували накопичення продукту амплікації ділянки ДНК STI (внутрішній контрольний зразок), по каналу HEX/Yellow - ДНК пошукового агента.

Результати інтерпретували на основі наявності (або відсутності) перетину кривої флуоресценції з пороговою лінією (встановлювали всередині лінійної ділянки приросту флуоресценції позитивного контролю в логарифмічній шкалі), що відповідає наявності (або відсутності) значення порогового циклу в відповідній графі таблиці результатів.

Застосування пропонованого способу ранньої діагностики персистуючих внутрішньоклітинних інфекцій у новонароджених дітей дозволяє проводити комплексну, кількісну, інформативну й достовірну діагностику персистуючих внутрішньоклітинних інфекцій у новонароджених дітей в режимі реального часу, використовуючи біологічний інтраопераційний матеріал дитини.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб ранньої діагностики персистуючих внутрішньоклітинних інфекцій у новонароджених дітей, який полягає у виявленні дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) збудників інфекції з використанням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), який **відрізняється** тим, що для виявлення інфікованості й ідентифікації персистуючих внутрішньоклітинних збудників (ПВЗ) Herpes Simplex Virus 1, 2, Cytomegalovirus, Epstein-Barr Virus, Chlamydia Trahomatis, Toxoplasma gondii, використовується ПЛР Real-time, для виявлення ДНК збудників використовується біологічний інтраопераційний матеріал (слина, вміст стравоходу, шлунка, тонкої та товстої кишок) дітей з вродженими вадами розвитку (ВВР) шлунково-кишкового тракту (ШКТ), для цього матеріал для дослідження збирається в стерильні одноразові контейнери з кришками, що закручуються, центрифугується до отримання освітленого екстракту біоматеріалу, вноситься в пробірки з розчином для лізису, ретельно перемішується на вортексі, центрифугується до

осадження крапель, прогривається 5 хвилин при температурі 65 °С і центрифугується при 13 тис. об./хв., виділена ДНК добавляється в пробірки з реакційною сумішшю, що вміщує видоспецифічні праймери і TaqF полімерази, і виконується ампліфікація з детекцією в режимі реального часу з визначенням кількісних і якісних показників з застосуванням комп'ютерної програми.

5

Комп'ютерна верстка В. Мацело

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601