



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **106487** (13) **U**
(51) МПК (2016.01)
A61B 5/02 (2006.01)
G01N 33/48 (2006.01)
G01N 21/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2015 10987	(72) Винахідник(и): Бень Ірина Ігорівна (UA), Білецька Галина Вацлавівна (UA), Лозинський Ігор Миколайович (UA), Козловський Михайло Михайлович (UA)
(22) Дата подання заявки: 09.11.2015	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.04.2016	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.04.2016, Бюл.№ 8	(73) Власник(и): ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ЛЬВІВСЬКИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ІНСТИТУТ ЕПІДЕМІОЛОГІЇ ТА ГІГІЄНИ МОЗ УКРАЇНИ", вул. Зелена, 12, м. Львів, 79005 (UA)

(54) СПОСІБ РАННЬОЇ ЕКСПРЕС-ДІАГНОСТИКИ ГРАНУЛОЦИТАРНОГО АНАПЛАЗМОЗУ ЛЮДИНИ

(57) Реферат:

Спосіб експрес-діагностики гранулоцитарного анаплазмозу людини на ранніх етапах захворювання шляхом виявлення морул *A. phagocytophilum* при мікроскопії мазків периферичної крові хворих, пофарбованих за методом Романовського-Гімзи. При перегляді мазка периферичної крові з об'єктивом 40х в нейтрофілах у вигляді включень виявляються морули анаплазм темно-блакитного або пурпурового кольору та при мікроскопії з об'єктивом 100х (80х) при масляній імерсії здійснюється диференціювання морул анаплазм від токсичної зернистості лейкоцитів.

UA 106487 U

Корисна модель належить до галузі медицини, а саме лабораторної діагностики гранулоцитарного анаплазмозу людини (ГАЛ).

Гранулоцитарний анаплазмоз людини представляє собою нову для України проблему інфекційної патології та медичної акарології, яка становить серйозну небезпеку для її населення [1]. Це трансмісивне природно-вогнищеве захворювання, що викликається анаплазмами *Anaplasma phagocytophilum* і передається через укуси іксодових кліщів (Acari, Ixodidae) [2, 3]. Клінічна діагностика ГАЛ утруднена внаслідок відсутності патогномонічних симптомів. Наявність вираженого інфекційного синдрому у гострому періоді хвороби і поліморфізм клінічних проявів при ГАЛ є характерними й для багатьох інших інфекцій.

Встановлено також, що, крім моноінфекції ГАЛ, широке розповсюдження мають різні види поєднаних (мікстів) кліщових інфекцій, у першу чергу - ГАЛ-Лайм бореліоз (ЛБ), які обтяжують перебіг хвороби і ще більше утруднюють її діагностику. У зв'язку з цим основним критерієм встановлення діагнозу ГАЛ є результати лабораторних досліджень клінічних матеріалів.

На даний час лабораторна діагностика ГАЛ може здійснюватись з використанням методів полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та імуно-ферментного аналізу (ІФА) [3, 5]. Однак на ранньому етапі захворювання метод ІФА малоефективний, його рекомендують застосовувати на 2-4 тижні захворювання при достатньому накопиченні діагностичних титрів антитіл. Недоліком застосування ПЛР служить висока вартість її постановки та довготривалість обстеження [4].

У зв'язку з недостатнім забезпеченням лікувально-профілактичних закладів України необхідним для проведення ПЛР, ІФА устаткуванням та відповідно підготовленим персоналом [5-7], а також відсутністю вітчизняних тест-систем для їх постановки, в абсолютній більшості регіонів України лабораторна діагностика ГАЛ відсутня, тому її налагодження і впровадження у масштабах всієї країни є вкрай актуальним завданням вітчизняної системи охорони здоров'я [4].

Тому, особливу увагу привертає доступний метод мікроскопії, який дає змогу виявляти збудник (скупчення анаплазм - морули) у мазках периферичної крові, пофарбованих за методом Романовського-Гімзи [5]. Цей метод використовується при проведенні загального аналізу крові (дослідженні лейкоцитів) [8].

Враховуючи вищенаведене, задачею корисної моделі є вдосконалення методу мікроскопії периферичного мазка крові для експрес-діагностики ГАЛ серед хворих з підозрою на "кліщові" інфекції (КІ).

Поставлена задача вирішується шляхом мікроскопії елементів периферичної крові, фарбованих за методом Романовського-Гімзи, з використанням мікроскопа з об'єктивом 40х для виявлення морул *A. phagocytophilum* на ранній стадії захворювання, які фарбуються в цитоплазмі лейкоцитів у вигляді включень в темно-блакитний або пурпуровий колір та мікроскопією з об'єктивом 100х при масляній імєрсії для диференціювання морул анаплазм від токсичної зернистості лейкоцитів.

На першому етапі розробка вказаного способу діагностики включає визначення оптимального терміну відбору матеріалу (крові) від хворих.

Для цього було проведено обстеження трьох груп хворих з підозрою на КІ з різними термінами захворювання. До першої групи належали пацієнти (27) з терміном захворювання до 7 днів, до другої групи - хворі (20), обстежені в межах 7-14 днів від початку хвороби, до третьої (22) - пацієнти, у яких захворювання виникло в період більше ніж 14 днів. У першій групі кількість позитивних результатів становила $(48,1 \pm 5,7) \%$, у другій і третій $-(30 \pm 5,3) \%$ та $(27,3 \pm 5,1) \%$ відповідно.

Достовірно ($p > 0,05$) вищий рівень позитивних результатів виявлено у хворих у першій групі $(48,1 \pm 5,7) \%$ у порівнянні з другою $(30 \pm 5,3) \%$ ($t > 2$) та третьою $(27,3 \pm 5,1) \%$ ($t > 2$) групами. Таким чином, підтверджена вища результативність (доцільність) застосування мікроскопії мазка периферичної крові в період з 7 до 14 днів від початку захворювання.

Пропонований спосіб експрес-діагностики ГАЛ включає наступні етапи роботи, що здійснюються таким чином:

1. Мазки периферичної крові фіксують етиловим спиртом 96 % (15-20 хвилин).

2. Після висушування мазки фарбують робочим розчином фарби за методом Романовського-Гімзи впродовж 30-40 хв. при кімнатній температурі.

3. Після фарбування мазки промивають у проточній воді, висушують при кімнатній температурі і досліджують в світловому мікроскопі.

4. Норма перегляду - 800-1000 лейкоцитів.

5. Анаплазми шукають всередині нейтрофілів у вигляді скупчень бактерій (морул).

6. При фарбуванні заражених клітин методом Романовського-Гімзи морули фарбуються в темно-блакитний або пурпуровий колір.

7. У лейкоциті звичайно буває по одній морулі, хоча може бути декілька. Виявлення морул в препараті крові є показником масивної інфекції і, зазвичай, прямим підтвердженням діагнозу.

8. Перегляд мазка периферичної крові з об'єктивом 40x - для виявлення включення в нейтрофілах та з об'єктивом 100x (80x) при масляній імерсії, щоб диференціювати морули анаплазм від токсичної зернистості лейкоцитів.

На другій стадії даної розробки було проведено порівняльне вивчення вказаного способу діагностики ГАЛ із іншими лабораторними методами - ПЛР та ІФА, що продемонстровано на наступних прикладах.

Приклад 1. Порівняльне вивчення чутливості та специфічності методів мікроскопії та ПЛР проведено серед 112 хворих з підозрою на КІ. Позитивні результати мікроскопії (20 із 57) були підтверджені в ПЛР для 35,1 % випадків, сумнівний результат - у 14,8 % (4 з 27). Негативні результати дослідження на ГАЛ методом мікроскопії у 76 % (19 з 25) співпали з результатами ПЛР.

Таблиця

Розрахунки результатів порівняльного вивчення ефективності методу мікроскопії щодо ПЛР для лабораторної діагностики ГАЛ

Характеристика методу	Визначення	Показник (%)
Чутливість	кількість позитивних результатів мікроскопії, які підтвердились в ПЛР / кількість позитивних результатів ПЛР = 23/24	95,8 %
Специфічність	кількість від'ємних результатів мікроскопії, які підтвердились в ПЛР / кількість від'ємних результатів ПЛР = 22/87	25,3 %

Згідно з цими даними, між результатами діагностики ГАЛ методом прямої мікроскопії морул у лейкоцитах і детекції специфічної ДНК у крові методом ПЛР виявлено прямий сильний зв'язок: коефіцієнт кореляції (r) = 0,92 ($p < 0,5$).

Приклад 2. Порівняльне вивчення чутливості та специфічності методів мікроскопії та ІФА проведено серед 32 хворих з анамнезом, що не виключає ГАЛ. Морули виявлені у 13 (40,6 %) хворих, специфічні антитіла - у 8 (25,0 %), співпадіння результатів двох методів отримано для 6 (18,8 %). Таким чином, позитивні результати мікроскопії були підтверджені в ІФА для 46,2 % (6 із 13) випадків. Негативні результати дослідження на ГАЛ методом мікроскопії отримані для 19 (59,4 %), методом ІФА - для 24 (75,0 %) хворих, результати обох методів співпали у 17 (53,1 %) випадках.

Чутливість і специфічність методу мікроскопії у порівнянні з показниками для ІФА дорівнювали 75 % (кількість позитивних результатів мікроскопії, які підтвердились в ІФА/ кількість позитивних результатів ІФА = 6/8) та 71 % (кількість від'ємних результатів мікроскопії, які підтвердились в ІФА/ кількість від'ємних результатів ІФА = 17/24) відповідно. В наших дослідженнях виявлено прямий сильний зв'язок результатів вивчення морул методом прямої мікроскопії взірців крові і детекції специфічних антитіл в ІФА: коефіцієнт кореляції (r) = 0,8 ($p < 0,5$).

Для практичної оцінки можливості застосування методу описаної мікроскопії для ранньої експрес-діагностики ГАЛ в 2011-2014 рр. було обстежено взірці крові 235 хворих з підозрою на КІ із інфекційних стаціонарів Львівської (200) та Волинської (35) областей. Морули анаплазм виявлено у 90 (38,3±3,2) % обстежених мазків. Відсоток позитивних результатів узгоджується з даними аналогічних досліджень на ГАЛ у дослідників з інших регіонів Європи (0,5 %-73,0 %).

Виходячи із результатів проведених досліджень, можна зробити наступні висновки щодо виражених переваг використання даної корисної моделі із застосуванням методу мікроскопії:

- Достатня чутливість і специфічність:
у порівнянні з методом ІФА: чутливість методу мікроскопії - 75 %, специфічність - 71 %
у порівнянні з методом ПЛР: чутливість методу мікроскопії - 95,8 %, специфічність - 25,3 %.
- Можливість застосування у безсимптомному періоді захворювання - доведено доцільність застосування для ранньої діагностики - до 7 днів з початку хвороби та його достатня інформативність - у період 7-14 днів.

3. Низька вартість дослідження і практично відсутні ризики для пацієнта - ціна реактивів відповідає-затратам при загальному аналізі крові, не потребує високовартісного спеціалізованого обладнання та імпортованих тест-систем, провести дослідження можна в умовах клінічної лабораторії ЦРЛ; проведення дослідження є безпечним для пацієнта і не спричиняє

5 значного дискомфорту або негативних наслідків;

4. Мінімальний час для проведення дослідження (60-90 хв.) у порівнянні з методом ІФА (3,5-4 год.) та ПЛР (4,5-6 год.), що винятково важливо для способів експрес-діагностики.

Відносно низька специфічність методу компенсується використанням мікроскопа з двома об'єктивами 40x та 100x при масляній імерсії.

10 З огляду на те, що виконання мікроскопії мазка периферичної крові має ряд економічних переваг, запропонований спосіб діагностики може бути рекомендований для широкого застосування в клініко-діагностичній практиці для виявлення ГАЛ. Впровадження цього економічного і доступного методу в якості стандартного скринінгу сприятиме здійсненню

15 Джерела інформації:

1. Клініко-епідеміологічна характеристика гранулоцитарного анаплазмозу людини у західному регіоні України /І.І. Бень, Г.В. Білецька, О.В. Корольок, О.Б. Семенишин // Профілактична медицина. - 2013. - № 3-4 (21). - С. 41-45.

20 2. Clair K. St. Erlichiosis: anaplasmosis and human ehrlichiosis / K. St. Clair, C F. Decker // Dis. Mon. - 2012. - № 58 (6). - P. 346-354.

3. Nahed I. Human Ehrlichiosis and Anaplasmosis /I. Nahed, K. C.Bloch, J. W. McBride // Clin. Lab. Med. - 2010. - Vol. 30, № 1. - P. 261-292.

4. Білецька Г.В. Лабораторна діагностика гранулоцитарного анаплазмозу людини / Білецька Г.В., Бень І.І. // Лабораторна діагностика. - 2013. - № 4. (66) - С. 26-33.

25 5. Comparison of a real-time PCR method with serology and blood smear analysis for diagnosis of human anaplasmosis: importance of infection time course for optimal test utilization / A. M. Schotthoefer, J. K. Meece, L. C Ivacic, P. D. Bertz [at all] //J. Clin. Microbiol. - 2013. - Vol. 51. - № 7. - P. 2147-2153.

30 6. Иммуноферментный анализ и полимеразная цепная реакция в лабораторной диагностике гранулоцитарного анаплазмоза человека / В.Ю. Тетерин, Э.И. Коренберг, В.В. Нефедова, Н.Н. Воробьева, В.И Фризен // Ж. инфектологии. - 2012. - Т. 4. - № 2. - С. 33-39.

7. Нафеев А.А. Лабораторные исследования в диагностике природно-очаговых инфекций / А.А. Нафеев, Н.В. Савельева, Э.И. Сибеева // Клиническая лабораторная диагностика. - 2011. - № 5. - С. 52-53.

35 8. Семенова Ю.М. Методы клинических лабораторных исследований. / Ю.М. Семенова // М.: Издательство "Медицина", 1967. - 444 с.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

40 Спосіб експрес-діагностики гранулоцитарного анаплазмозу людини на ранніх етапах захворювання шляхом виявлення морул *A. phagocytophilum* при мікроскопії мазків периферичної крові хворих, пофарбованих за методом Романовського-Гімзи, який

45 **відрізняється** тим, що при перегляді мазка периферичної крові з об'єктивом 40x в нейтрофілах у вигляді включень виявляються морули анаплазм темно-блакитного або пурпурового кольору та при мікроскопії з об'єктивом 100x (80x) при масляній імерсії здійснюється диференціювання морул анаплазм від токсичної зернистості лейкоцитів.

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