



УКРАЇНА

(19) UA (11) 62759 (13) U
(51) МПК
G01N 33/48 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ КАШЛЮКУ

1

(21) u201102793

(22) 10.03.2011

(24) 12.09.2011

(46) 12.09.2011, Бюл.№ 17, 2011 р.

(72) РОМАНЕНКО ТАМАРА АНАТОЛІЇВНА, КОЛЕСНИКОВА ІРИНА ПАВЛІВНА, ТРУНОВА ОЛЬГА АРНОЛЬДІВНА

(73) ДОНЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. М. ГОРЬКОГО

(57) Спосіб діагностики кашлюку шляхом визначення в сироватці крові пацієнта з підозрою захворювання на кашлюк вмісту імуноглобулінів М, А та G, який **відрізняється** тим, що визначення вмісту імуноглобулінів проводять пацієнтам віком старше шести місяців з урахуванням тривалості захворювання та терміну останнього щеплення проти каш-

2

люку і при тривалості захворювання у нещеплених осіб 7-20 днів у їхній сироватці визначають вміст імуноглобуліну М та/або імуноглобуліну А один раз, при тривалості захворювання більше 20 днів у нещеплених осіб визначають вміст імуноглобуліну G один раз і в разі виявлення у сироватці крові імуноглобулінів М, А чи G у цих пацієнтів діагностують кашлюк, а у пацієнтів, щеплених більше одного року тому, незалежно від терміну захворювання, визначають рівні імуноглобуліну G в двох зразках сироватки крові, взятих з інтервалом 14 днів, причому кашлюк діагностують у цих пацієнтів, якщо рівень імуноглобуліну G в другому зразку перевищує його рівень в першому не менше, ніж у півтора рази.

Корисна модель належить до медицини, точніше до епідеміології (інфектології), і може бути використана для діагностики кашлюку методом імуноферментного аналізу (ІФА) для виявлення специфічних протикашлюкових антитіл класів імуноглобулінів (Ig) М, А, G у осіб з підозрою на кашлюк.

Кашлюк - це гостре інфекційне захворювання дихальних шляхів, збудником якого є грамнегативні бактерії *Bordetella pertussis*, з високою вірогідністю зараження. У дітей типовою ознакою захворювання є спазматичний кашель, напади судомного кашлю, які можуть закінчуватися блюванням, продовжуються декілька тижнів. Кашлюк характеризується високою захворюваністю та смертністю, особливо у дітей.

Щорічно у всьому світі реєструють близько 50 мільйонів випадків кашлюку, і близько 350000 людей гинуть в результаті захворювання. Захворюваність на кашлюк невинно зростає з 1980 року. В останнє десятиріччя в Україні показник захворюваності дітей віком 0-2 роки становив в середньому 64,7 випадку, 3-6 років - 22,9 випадку, віком 7-14 років - 8,5 випадку на 100 тис. населення даного віку. Імунітет, індукований вакцинацією, слабшає через 5-10 років, і людина стає вразливою до інфекції. Через відсутність виразних симптомів

інфекція часто залишається не діагностованою у дорослих і підлітків, котрі можуть стати резервуаром і джерелом інфекції для невакцинованих дітей.

Відомий спосіб діагностики кашлюку, який включає бактеріологічну (культуральну) ідентифікацію мікроорганізму, що спричинив захворювання (шляхом мікробіологічного дослідження мокротиння та підрахування кількості мікроорганізмів [Laboratory manual for the diagnosis of whooping cough caused by *Bordetella pertussis* / *Bordetella parapertussis* / World Health Organization Department of Immunization, Vaccines and Biologicals / Geneva, March 2007. - 54 p.].

Перевагою бактеріологічного (культурального) методу виявлення мікроорганізму є його найбільша специфічність (він вважається «золотим стандартом» лабораторного підтвердження діагнозу) та доступність у нашій країні.

Недоліками бактеріологічного методу є пізній термін отримання результату (через 5-7 днів, доки триває бактеріологічне дослідження) та низька чутливість, яка залежить від ряду причин (запізні строки обстеження хворого, вживання ним антибіотиків, неправильний добір матеріалу від хворих, недотримання умов транспортування та зберігання проб, низька якість використаних поживних се-

(19) UA (11) 62759 (13) U

редовищ та інші). Частота позитивних бактеріологічних знахідок кашлюку становить 6-15 % і звичайно не перевищує 60,0% [Зверякина Н.Н., Ценева Г.Я., Курова Н.Н. К вопросу о повышении эффективности бактериологического метода диагностики коклюшной инфекции / Клиническая лабораторная диагностика. - 2002. - № 2. - С. 44]. Відомий спосіб діагностики кашлюку шляхом ДНК-ідентифікації *Bordetella pertussis* методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) [Grimprel E., Begue P., Anjak I. et al. Comparison of polymerase chain reaction, culture, and Western immunoblot serology for diagnosis of *Bordetella pertussis* infection / J. Clin. Microbiol. - 1993. - V.31. - P.2745-50]. Перевагою ПЛР є висока специфічність, чутливість методу, швидкість проведення аналізу (кілька годин), простота методики, відсутність перехресних реакцій з гетерологічними штамами, можливість діагностики кашлюку на ранніх стадіях хвороби, до 4-5 тижнів після початку симптомів і деякий час від початку лікування антибіотиками.

Недоліками відомого способу є можливість одержання хибнопозитивних результатів при високій чутливості через контамінацію продуктами ампліфікації попередніх досліджень, обмежена доступність ПЛР для системи практичної охорони здоров'я нашої держави через високу вартість апаратурного обладнання та діагностичних наборів.

У дорослих, які, за статистикою, останнім часом все частіше хворіють на кашлюк, навіть явні клінічні ознаки цієї інфекції розцінюються як ГРВІ чи трахеобронхіт. Вони пізно звертаються за медичною допомогою, коли і культуральний метод, і ПЛР вірогідно мають бути негативними, проте негативний тест не виключає діагнозу кашлюку. Тому для дорослих та підлітків мають важливе значення серологічні методи діагностики.

Відомий спосіб діагностики кашлюку шляхом визначення антитіл в сироватці крові інфікованої особи в серологічних дослідженнях (наприклад, реакція аглютинації, реакція непрямой гемаглютинації), в яких визначають аглютинаційні антитіла до кашлюкового збудника [Москалец О.В., Машков А.Е., Е.З. Дружок и др. Сравнительная характеристика лабораторных методов диагностики инфекционной патологии в клинической практике / Педиатрия. - 2006. - № 5. - С. 32-35].

Недоліками відомого способу є його недостатня точність.

Відомий вибраний за прототип спосіб діагностики кашлюку, який є найближчим до способу, що заявляється, по суті та досягнутому технічному результату [Качественное определение специфических IgA и/или IgM антител к *Bordetella pertussis* в сыворотке крови человека методом ИФА / Инструкция к набору SeroPertussis Ig A/IgM (кат. №A233-01E) - Sanyon Diagnostics (Israel), 2001. - 6 с.].

Відомий спосіб-прототип є серологічним та включає визначення шляхом ІФА антитіл IgM, IgA, IgG в сироватці крові кожного пацієнта з підозрою на кашлюк та інтерпретацію результатів. Результат діагностування базується на наявності чи відсутності протикашлюкових антитіл різних класів (IgM, IgA, IgG) у сироватці. При негативному результаті визначення IgM, IgA і IgG діагностують відсутність інфекції кашлюку. При позитивному результаті визначення IgM та негативному чи позитивному результаті IgG і IgA або позитивному IgA, негативному чи позитивному IgG і негативному IgM діагностують наявність кашлюкової інфекції. Позитивний результат визначення IgG та негативний IgM і IgA свідчать про недавню або минулу інфекцію, або минулу вакцинацію (табл. 1).

Таблиця 1

Інтерпретація результатів, що базується на виявленні IgM, IgA, IgG класів антитіл *Bordetella pertussis* (за прототипом)

| № | IgG | IgM | IgA | Результат |
|---|--------------------------|------------|--------------------------|--|
| 1 | Негативний | Негативний | Негативний | Немає відомостей про присутність інфекції |
| 2 | Негативний чи позитивний | Позитивний | Негативний чи позитивний | Вказує на теперішню інфекцію |
| 3 | Негативний чи позитивний | Негативний | Позитивний | Вказує на теперішню інфекцію |
| 4 | Позитивний | Негативний | Негативний | Вказує на теперішню чи минулу інфекцію або минулу імунізацію |

Відомий спосіб-прототип діагностики кашлюку методом ІФА має такі недоліки:

він є неточним методом діагностики кашлюку, бо в залежності від виду антигену (вакцина чи мікроб), стану імунної системи, динаміки імунологічної відповіді результати ІФА свідчать про різні процеси в організмі, тому їх трактування є утрудненим без врахування додаткових ознак;

результати діагностики є недостатньо інформативними та низькодиференційованими через односторонність інтерпретації досліджень стану

протикашлюкового імунітету у пацієнта з підозрою на захворювання, а саме: враховується лише наявність чи відсутність протикашлюкових антитіл різних класів;

діагностичні дослідження високовартісні, бо кожному пацієнту сироватку крові аналізують на присутність всіх трьох антитіл до IgM, IgA, IgG, які не завжди несуть необхідну діагностичну інформацію;

реалізація відомого способу пов'язана з необхідними парентеральними втручаннями при

заборі крові у тих пацієнтів, щодо яких способів не є інформативним.

В основу корисної моделі поставлено задачу в способі діагностики кашлюку шляхом застосування комплексного підходу до призначення дослідження та інтерпретації результатів ІФА з урахуванням віку хворого, тривалості захворювання, наявності чи відсутності щеплення та терміну останнього щеплення проти кашлюку забезпечити підвищення інформативності діагностики. Спосіб, що заявляється, є високоточним (93,5 % співпадіння результатів за контрольним методом ПЛР, співпадіння за відомим способом-прототипом - 22,6 %) та безпечним, доступним, економічним, зручним для хворого і лікаря. При реалізації способу, що заявляється, кількість обстежуваних за методом ІФА осіб з підозрою на кашлюк зменшується порівняно з відомим способом-прототипом в 1,48 разу, тобто знижується ризик необґрунтованих парентеральних втручань і неінформативних високовартісних аналізів.

Поставлена задача вирішується тим, що створено спосіб діагностики кашлюку шляхом визначення в сироватці крові пацієнта з підозрою захворювання на кашлюк вмісту IgM, IgA, IgG.

Новим у створеному способі є те, що визначення вмісту імуноглобулінів проводять пацієнтам віком старше шести місяців з урахуванням тривалості захворювання та терміну останнього щеплення проти кашлюку і при тривалості захворювання у нещеплених осіб 7-20 днів у їхній сироватці визначають вміст IgM та/або IgA один раз, при тривалості захворювання більше 20 днів у нещеплених осіб визначають вміст IgG один раз і в разі виявлення у сироватці крові IgM, IgA чи IgG у цих пацієнтів діагностують кашлюк, а у пацієнтів, щеплених більше одного року тому, незалежно від терміну захворювання, визначають рівні IgG в двох зразках сироватки крові, взятих з інтервалом 14 днів, причому кашлюк діагностують у цих пацієнтів, якщо рівень IgG в другому зразку перевищує його рівень в першому не менше, ніж у півтора рази.

Між сукупністю ознак корисної моделі і технічним результатом, якого можна досягти при її реалізації, існує причинно-наслідковий зв'язок.

Причиною недостатньої інформативності відомого способу-прототипу діагностики кашлюку є складність формування імунної відповіді людини на антигени збудника кашлюку *Bordetella pertussis*, і тому відомий спосіб не охоплює визначення усіх ознак, що впливають на продукцію антитіл різних класів імуноглобулінів в процесі інфікування людини.

Загальновідомо, що протикашлюкові антитіла різних класів імуноглобулінів формуються у відповідь на проникнення збудника в організм людини, з часом відбувається їх продукція та накопичення в організмі, що лабораторно визначається збільшенням концентрації імуноглобулінів у динаміці інфекційного процесу. Під час гострої інфекції відбувається сероконверсія та зростають рівні IgM, IgA, IgG. Антитіла IgM до збудника кашлюку - показник первинного інфікування людини кашлюком. Вони з'являються в крові на початку захворювання

(як правило, з 5-7-го дня). При природному шляху інфікування стимулюється продукція секреторного, а потім і сироваткового IgA. Через це аналіз сироватки крові, взятої на початку захворювання, може дати помилково негативний результат на IgA, а взятої 7-10 днів пізніше - дає істинний результат. Антитіла класу IgG до антигенів *Bordetella pertussis* виявляють, починаючи з 4-го тижня захворювання. Інтенсивніше зростання титру специфічних антитіл відбувається на початку 2-го тижня періоду спазматичного кашлю. То ж, виявлення антитіл класів IgA та IgM до *Bordetella pertussis* в крові є серологічним підтвердженням діагнозу кашлюку в ранні строки, а IgG - в пізні строки захворювання.

Проти кашлюку вже тривалий час проводять загальну планову вакцинопрофілактику. Імунітет, індукований вакцинацією, слабшає через 5-10 років, і людина стає вразливою до інфекції. Тому в сучасний період випадки захворювань на кашлюк виникають як у нещеплених, так і у щеплених осіб, відбувається зростання захворюваності серед імунізованих дітей, підлітків та дорослих. Тому при серологічній діагностиці захворювання на кашлюк в першу чергу необхідно враховувати стан специфічного імунітету, на фоні якого виникло захворювання, виходячи із анамнезу щеплень (чи отримувач захворілий щеплення проти кашлюку і коли в останнє). На введення вакцини організм відповідає синтезом антитіл. Антитіла класу IgM з'являються в крові після нещодавньої вакцинації та зберігаються короткий час, антитіла класу IgG з'являються, починаючи з 4-го тижня після вакцинації, накопичуються протягом року і можуть циркулювати впродовж декількох років. У щеплених хворих вміст антитіл класу IgG слід оцінювати в динаміці без урахування діагностичного титру. Зважаючи на післявакцинальну імунну відповідь, тобто зростання концентрації специфічних післявакцинальних антитіл певний час після введення вакцини, серологічне дослідження парних сироваток для підтвердження діагнозу не буде інформативним для постановки діагнозу впродовж року після вакцинації проти кашлюку. Тому за способом, що заявляється, у пацієнтів, щеплених більше одного року тому, незалежно від терміну захворювання, визначають рівні IgG в двох зразках сироватки крові, взятих з інтервалом 14 днів. Клінічні дослідження показали, що інформативно буде діагностика кашлюку у цих пацієнтів, якщо рівень IgG в другому зразку перевищує його рівень в першому не менше, ніж у півтора рази.

У зв'язку з тим, що імунна система новонароджених та дітей до 6 місяців є незрілою, а також існує інтерференція з материнськими антитілами, ці особи не можуть дати повноцінної відповіді на зараження кашлюковим збудником. Тому чутливість серологічного дослідження у них невисока й існують обмеження для їх проведення серед дітей, що не досягли віку 6 місяців.

Діагностика за відомим способом-прототипом не враховує природу різних класів протикашлюкових імуноглобулінів, що і знижує інформативність методу. За рішенням, що заявляється, передбачено диференційований підхід до діагностики кашлюку методом ІФА, який залежить від анамнезу

попередніх протикашлюкових щеплень, від терміну з початку захворювання особи, що підлягає обстеженню, від віку захворюлої особи. Це дозволяє визначити протикашлюкові антитіла, пов'язані з хворобою, з більшим ступенем точності (у 93,5 % обстежених порівняно з 22,6 % за відомим способом), підвищити інформативність методу, а також знизити економічні затрати за рахунок виключення із обстеження осіб із заздалегідь негативним результатом, зменшити частоту їх травматизації від парентеральних втручань і неінформативних високовартісних аналізів.

Для клінічної перевірки точності способу діагностики кашлюку, що заявляється, було відібрано 46 пацієнтів з підозрою на кашлюк й обстежено їх на наявність протикашлюкових антитіл класів IgM, IgA, IgG методом ІФА за відомою методою з використанням набору SeroPertussis Ig A/IgM фірми Sanyon Diagnostics (Ізраїль). Паралельно для під-

твердження точності діагнозу усі 46 пацієнтів з підозрою на кашлюк були обстежені високочутливим методом ПЛР з використанням набору реагентів та обладнання для виявлення ДНК *Bordetella pertussis* виробництва науково-виробничої фірми "ДНК-Технологія" (Москва). Інтерпретацію результатів для оцінки за способом-прототипом провели в усіх обстежених осіб (група порівняння - 46 осіб) за співвідношенням виявлених класів антитіл (табл. 1). Інтерпретацію результатів для оцінки способом, що заявляється, провели за результатами обстеження 31 особи із 46 цієї ж вибірки (дослідна група). Із групи з 46 осіб були виключені 4 дитини віком до 6 місяців, 5 осіб, які хворіють менше ніж 7 днів, 6 осіб, які отримали щеплення раніше 1 року тому. При інтерпретації результатів у дослідній групі оцінювали результати визначення наявності тих класів імуноглобулінів, які є інформативними згідно зі способом, що заявляється.

Таблиця 2

Порівняльна ефективність заявленого (n = 31) та відомого (прототипу) (n = 46) способів діагностики кашлюку

| Спосіб діагностики | Число проведених тестувань | Діагностовано кашлюк у числа пацієнтів | Кашлюк підтверджено*** у числа пацієнтів | Точність діагностики, % |
|--------------------|----------------------------|--|--|-------------------------|
| заявлений, n=31 | 48 | 29* | у 31 з 31 | 93,5 |
| відомий, n=46 | 138 | 7** | у 31 з 46 | 22,6 |

Примітки: * у 2 пацієнтів із 31 не виявлено протикашлюкових антитіл

** у 31 пацієнта з 46 виявлено IgG (графа 4 табл. 1)

*** діагноз підтверджено за ПЛР та клінічним спостереженням

Результати співставлення (табл. 2) свідчать, що у групі порівняння було виконано 138 аналізів. У дослідній групі щодо 31 пацієнта проведено 48 аналізів. На кожного пацієнта в групі порівняння припадає 3 тестування (виявлення антитіл класів IgM, IgA та IgG), а в дослідній - 1,55, що майже вдвічі (точніше - в 1,93 разу) менше (економічна ефективність). При діагностуванні за способом, що заявляється, кількість обстежених осіб була в 1,48 разу менша, ніж за відомим, що знижує кількість необґрунтованих парентеральних втручань при діагностиці. В групі порівняння (46 пацієнтів) кашлюк було діагностовано за відомим способом-прототипом у 7 осіб з підозрою на захворювання, а підтверджено за ПЛР та подальшим клінічним спостереженням у 31, а в дослідній групі (31 пацієнт) за способом, що заявляється, кашлюк діагностовано у 29 пацієнтів, і діагноз підтверджено також у 31 пацієнта. У 31 пацієнта з 46 групи порівняння за відомим способом виявлено тільки IgG (графа 4 табл. 1), що означає або інфекцію кашлюку або минулу імунізацію, тобто діагноз підтвердити не можна. Отже, точність діагностики кашлюку у 4,14 разу вища, коли її проводити за способом, що заявляється, а не за відомим (93,5 % проти 22,6 %).

Спосіб діагностики кашлюку, що заявляється, реалізують таким чином.

Перш за все, у пацієнта з підозрою на кашлюк визначають вік, тривалість захворювання, наявність щеплення та термін останнього щеплення від

кашлюку. Тестуванню підлягають пацієнти, що мають вік старше 6 місяців, які хворіють не менше 7 днів, яким проведено щеплення не раніше, ніж 1 рік тому. Вранці натщесерце беруть пробу капілярної крові з пальця в об'ємі 1 мл, готують з неї сироватку та за відомою методикою з використанням набору SeroPertussis IgA/IgM фірми Sanyon Diagnostics (Ізраїль) проводять ІФА. При тривалості захворювання у нещеплених осіб 7-20 днів у них визначають вміст IgM та/або IgA один раз, при тривалості захворювання більше 20 днів у нещеплених осіб визначають вміст IgG один раз. В разі виявлення у сироватці крові IgM, IgA чи IgG у цих пацієнтів діагностують кашлюк. У пацієнтів, щеплених більше одного року тому, незалежно від терміну захворювання, визначають рівні IgG в двох зразках сироватки крові, взятих з інтервалом 14 днів, причому діагностують кашлюк у цих пацієнтів в тому випадку, якщо рівень IgG в другому зразку перевищує його рівень в першому не менше, ніж у півтора рази.

Конкретні приклади реалізації способу, що заявляється.

Приклад 1. Дитина Аделіна Н., віком 4 роки, захворіла 10 вересня. Педіатр запідозрив кашлюк і направив до лабораторії для ІФА за способом, що заявляється, на 24 вересня, тобто на 14 день від початку захворювання. Проти кашлюкової інфекції Аделіна Н. щеплена не була. За результатом ІФА отримали позитивну відповідь на наявність у си-

роватці крові протикашлюкових антитіл класу IgM та IgA, що свідчить про первинне захворювання на кашлюк.

Приклад 2. Хвора Т., 37 років, з діагнозом "гострий трахеобронхіт, кашлюк" була діагностована за способом, що заявляється. Шляхом ІФА сироватку крові хворої Т. дослідили 6 червня - через 23 дні від початку захворювання. Були виявлені антитіла класу IgG -16,9 УО/мл, що свідчить про перебіг у жінки кашлюкової інфекції.

Приклад 3. Дитина Едуард К., 5 років, захворів 1 червня. З підозрою на кашлюк дитина була обстежена шляхом ІФА за способом діагностики, що заявляється, при першому зверненні до лікаря - 19 червня, тобто на 18 день від початку хвороби. ІФА дав позитивний результат на вміст IgG - 12,7 УО/мл. В анамнезі він мав повний курс профі-

лактичних щеплень проти кашлюку, проведений згідно з Національним календарем щеплень, останнє - у віці 18 місяців, тобто 4 роки тому. Виявлені антитіла IgG можуть вказувати як на інфекційне захворювання, так і на минулу імунізацію. Другий забір крові було проведено 3 липня, тобто через 14 днів після першого обстеження. За результатом ІФА концентрація IgG зросла до 21,3 УО/мл, тобто в 1,68 разу, що свідчить про зростання специфічних антитіл в результаті інфікування *Bordetella pertussis*.

Паралельно для перевірки точності результатів досліджень за прикладами 1-3 було проведено обстеження хворих шляхом ПЛР, результати у цих хворих виявились позитивними, що підтверджує діагноз: кашлюк.