



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **105990** (13) **U**
(51) МПК (2016.01)
A61B 10/00
G01N 33/50 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2015 10479	(72) Винахідник(и): Вовк Ірина Борисівна (UA), Горбань Наталія Євгенівна (UA), Нетреба Нелі Іванівна (UA), Кондратюк Валентина Костянтинівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 27.10.2015	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 11.04.2016	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 11.04.2016, Бюл.№ 7	(73) Власник(и): ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ПЕДІАТРІЇ, АКУШЕРСТВА І ГІНЕКОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ", вул. Платона Майбороди, 8, м. Київ, 04050 (UA)

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ЦИТОМЕГАЛОВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ У ЖІНОК

(57) Реферат:

Спосіб діагностики цитомегаловірусної інфекції у жінок включає імуноферментне дослідження крові на наявність специфічних антитіл до ЦМВ (IgM, IgG). Додатково здійснюється вірусологічне обстеження мазків-відбитків оперативного матеріалу (ендометріальна тканина), що дозволить не тільки виявити наявність специфічного антигену ЦМВ у клітинах, але і його локалізацію в структурних елементах, у разі виявлення одного або декількох позитивних результатів продовжується обстеження пацієнтки в динаміці.

UA 105990 U

Корисна модель належить до галузі медицини, а саме до акушерства та гінекології, може бути використана для оцінки вірусологічного навантаження ендометрія та удосконалення діагностики активності цитомегаловірусної інфекції у жінок з порушенням репродуктивної функції.

За визначенням Всесвітньої організації охорони здоров'я, цитомегалія - "нова та таємнича інфекція" (Європейське регіональне бюро ВООЗ - 1984). За даними науково-практичних досліджень антитіла до цитомегаловірусної інфекції (ЦМБІ) в крові дорослого населення виявляються у 60-85 %, але у здорових людей інфекція перебігає безсимптомно, за типом вірусоносійства (Demmler G. What is CMV? 2010 [webpage] [cited; Available from: www.congenitalcmv.org/public.htm]. Суть проблеми ЦМБІ полягає в тому, що вона належить до так званих "опортуністичних інфекцій", клінічні прояви яких можливі лише в умовах первинного або вторинного порушення функціонування імунної системи як на загальному, так і локальному рівнях (Bonaros N., Mayer B., Schachner N., et al. CMV-hyperimmune globulin for preventing cytomegalovirus infection and disease in solid organ transplant recipients: a metaanalysis. Clin. Transplant. 2008; 22(1); 89-87). Генوم вірусу цитомегалії, вбудовуючись у ДІЖ клітини макроорганізму, яка ділиться, сприяє змінам програми клітинного апоптозу, надаючи ураженим клітинам риси "безсмертя" (Yu, Y. Human cytomegalovirus major immediate-early proteins and simian virus 40 large T antigen can inhibit apoptosis through activation of the phosphatidylinositol 3'-OH kinase pathway and the cellular kinase Akt / Y. Yu, J.C Alwine // J. Virol. - 2002. - Vol. 76, No 8. - P. 3731-3738). За відсутності патології з боку імунної системи гостра ЦМБІ трансформується в латентну з позитивним переметутуванням вірусу в організмі людини.

В останні роки з'явилися публікації про тісний зв'язок цього вірусу з онкопатологією: ЦМБІ діагностується у пухлинних тканинах при багатьох онкологічних захворюваннях (рак молочної залози, простати, слинної залози, головного мозку) (Лисяний А.Н. Выявление антител к цитомегаловирусу в сыворотке крови и рр65 этого вируса в неопластических клетках больных с опухолями головного мозга. // Онкология. - 2013. - № 2. С. 108-112).

У ряді випадків ЦМБІ підтримує хронічний запальний процес органів малого таза, що обумовлює невисоку ефективність терапії та наявність порушень репродуктивної функції у таких пацієнток. Відомо, що у 3-35 % випадків вірус виділяють з уrogenітального тракту як жінок, так і чоловіків за наявності мікст-інфікування.

Розповсюдженість ЦМБІ, варіабельність взаємовідносин між вірусом та макроорганізмом, можливість тривалої персистенції збудника в організмі людини з ураженням різних органів та систем, труднощі лабораторної діагностики, відсутність надійних лікувальних та профілактичних заходів переконливо свідчать про актуальність даної проблеми та необхідність не тільки встановлення факту присутності ЦМБІ в організмі пацієнта, а у визначенні ступеня вірусологічного навантаження, що обумовлює патологічні зміни в органах.

Відомий спосіб діагностики реплікативних безсимптомних форм цитомегаловірусної інфекції у жінок репродуктивного віку, вагітних і новонароджених (пат. 21854, UA), який передбачає визначення протицитомегаловірусних Ig G антитіл у сироватці крові серологічним методом імуноферментного аналізу (ІФА) із додатковим цитологічним дослідженням шляхом цитоскопії осаду слини, сечі, біосубстрату з піхви і цервікального каналу, де виявляють специфічні цитомегалічні клітини, і, за наявності навіть однієї такої клітини у серопозитивних щодо анти-ЦМВ Ig G осіб, діагностують реплікативну безсимптомну ЦМБІ. Однак, недоліком даного способу є відсутність інформації про стадійність та активність процесу на органному рівні, що є провідним для розуміння клінічної ситуації.

Також існує спосіб діагностики цитомегаловірусної інфекції (пат. 24583 UA), що включає морфометричне дослідження мазка крові з вимірюванням площі та яскравості цитоплазми нейтрофільних гранулоцитів крові і при наявності клітин, що мають площу, меншу ніж 130 мкм² та нормальну яскравість цитоплазми - більшу ніж 45 %, або клітин, що мають площу, більшу ніж 170 мкм² і нормальну яскравість цитоплазми - більшу ніж 60 %, діагностують ЦМБІ. Проте, даний спосіб потребує проведення детального обчислення математичних показників на спеціальному програмно-апаратному комплексі та наявності вузькопрофільного спеціаліста для реалізації такої задачі.

Зважаючи на відомий негативний вплив ЦМБІ на вагітних жінок (ранні втрати вагітності) та новонароджених (внутрішньоутробне інфікування плода із мультиорганими ураженнями) [Ljungman, P. Workshop of CMV disease: definitions, clinical severity scores, and new syndromes / P. Ljungman, S. A. Plotkin // Scand. J. Infect. Dis. Suppl. - 1995. - Vol. 99, No 1. - P. 87-89.], існує ряд діагностичних способів, які дозволяють контролювати вірусологічне навантаження різних біосубстратів організму вагітної.

Так, відомий спосіб діагностики цитомегаловірусної інфекції у вагітних (пат. 74889 UA) шляхом проведення серологічного дослідження, який відрізняється тим, що проводять визначення Ig G, Ig M методом ІФА в кожному триместрі вагітності. Недоліком цього способу є визначення в динаміці лише напруження анти-ЦМВ-антитілоутворення у майбутньої матері, що може бути умовним критерієм внутрішньоутробного інфікування та не використовується, як монодослідження.

Також, існує спосіб діагностики цитомегаловірусної інфекції у вагітних (пат. 65390 UA), який здійснюють шляхом дослідження біосубстрату з піхви і цервікального каналу з наступним вивченням під мікроскопом, який відрізняється тим, що біосубстрат одержують шляхом уведення гігієнічного тампона ввечері на 8-10 годин. Зазначений спосіб має недоліки у вигляді обов'язкового розташування чужорідного тіла у статевих шляхах вагітної жінки протягом майже половини доби, що може викликати дискомфорт як психологічного, так і механічного характеру і не має бути рекомендованим до використання у вагітних із високим ризиком настання передчасних пологів, із швом на шийці матки, акушерським песарієм.

Найбільш близьким за технічною суттю є патент "Biomarkers for prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus" (20140141406, US), в якій діагностується вроджений цитомегаловірус з виконанням наступних етапів: отримання біологічного зразка (пуповинна кров плода); контакт біоматеріалу з реагентами (моноклональні антитіла), які мають здатність специфічно зв'язуватися з визначеним ЦМВ-асоційованим маркером (більш ніж 20 різновидів); порівняння отриманих результатів з біологічними пробами неінфікованих суб'єктів.

Даний спосіб виявляє ступінь вірусологічного навантаження в організмі новонародженого після пологів в цілому, однак, не дозволяє конкретизувати ураження органів чи систем; є фінансово неможливим для використання в сучасних економічних умовах нашої Держави та головне - проводиться вже після пологів (педіатричний та неонатологічний профіль), а не на прекоцепційному етапі.

В основу запропонованого способу діагностики ЦМВІ у жінок покладена задача створення шляху визначення даного вірусу у пацієнток з проліферативними процесами ендометрія, що дозволяє оцінити навантаження антигенами цитомегаловірусу тканини-мішені (ендометрій), виявити ступінь їх експресії та дослідити концентрації Ig M та G до ЦМВ в сироватці крові; медична ефективність запропонованого способу полягає у максимально всебічному урахуванні стану взаємовідносин системи "збудник - організм жінки" з метою оцінки вірусологічного навантаження, що дає змогу зробити вибір адекватного індивідуального алгоритму ведення клінічного випадку з урахуванням подальших репродуктивних намірів та відновлення функції ендометрія.

Поставлене завдання способу діагностики цитомегаловірусної інфекції у жінок вирішується шляхом базового імуноферментного дослідження крові, згідно корисної моделі додатково здійснюється ідентифікація вірусу цитомегалії в мазках-відбитках ендометріальної тканини за допомогою реакції імунофлуоресценції (ІФА) в непрямій модифікації з моноклональними антицитомегаловірусними антитілами з метою виявлення специфічного антигену ЦМВ, у разі виявлення одного або декількох позитивних результатів продовжувалось обстеження пацієнтки в динаміці.

Спосіб реалізується наступним чином: інтраопераційно проводиться забір зразків тканин від хворої, у якій під час передопераційного обстеження верифіковано (за УЗ-даними) проліферативне захворювання ендометрія - гіперплазія ендометрія або поліп ендометрія; зразки матеріалу, потрапляючи до лабораторії вірусології, приймаються до підготовки проведення досліджень, а саме:

використовується непрямий метод Кунса в модифікації із застосуванням мічених флуоресціюючим барвником моноклональних антитіл до ЦМВ (ендометріальна тканина), які містять лише одну хімічно однорідну популяцію антитіл, комплементарну специфічній детермінанті антигену, що дозволяє здійснювати тонку диференціацію білків, і результат дослідження оцінюється за допомогою люмінесцентного мікроскопу як позитивний за наявності зміни червоного кольору хемілюмінесценції мічених моноклональних антитіл, властивого їм у незв'язаному з антигенами стані, на зелений у випадку створення комплексу антиген-антитіло. Використовуються люмінесцентні мікроскопи МЛ-2А, ЛЮМАМ-І 1;

серологічний метод дозволяє оцінити характер та напруженість гуморального імунітету проти цитомегаловірусних агентів (сироватка крові - IgM, IgG). Використовуються імуноферментні тест-системи фірми "Novum diagnostica" (Німеччина) та стріповий імуноферментний аналізатор "Stat fax-300" (США), при довжині хвилі 450 нм. Інтерпретація даних - порівняння показників з референтними значеннями (див. таб.): комплексна оцінка отриманих показників.

Референтні значення	Інтерпретація
10NTU	мітка відсічки
9-11 NTU	"сіра зона"
<9NTU	від'ємний результат
>11 NTU	позитивний результат

У разі виявлення одного або декількох позитивних результатів продовжувалось обстеження пацієнтки в динаміці, призначалися комплексне лікування та рекомендації з урахуванням подальших репродуктивних намірів та з метою відновлення функції ендометрія.

Сутність заявленого способу пояснюється наступними прикладами:

Приклад 1

Хвора М., 34 р. Діагноз "Безплідність-II. Хронічний двобічний сальпінгіт. Гіперплазія ендометрія. Обтяжений гінекологічний анамнез (в анамнезі - ранні втрати вагітності - замерла вагітність в терміні 5-6 тижнів)". Проведено гістероскопію із роздільним діагностичним вишкрібанням стінок порожнини матки та цервікального каналу (за даними ПГД - комплексна гіперплазія ендометрія без атипії, ознаки хронічного ендометриту).

До проведення хірургічного лікування хвора отримала комплексну протизапальну терапію без противірусного компоненту.

Інтраопераційно отримано наступний матеріал: мазок-відбиток тканини з порожнини матки "+" щодо наявності антигенів ЦМВ (зміна кольору препарату на зелений); сироватка крові - Ig M - 7,0 (негативний результат), Ig G - 19,0 (різко позитивний результат) щодо наявності антиЦМВ-антитіл.

Вищевказані зміни були розцінені як наявність латентної форми цитомегаловірусного інфікування, яке персистує в організмі жінки протягом тривалого часу, викликаючи зміни в органах-мішенях. На післяопераційному етапі паралельно із гормонотерапією призначено відповідне лікування - загальнозміцнююча, імуномодуюча терапія (препарати як системної, так і місцевої дії), дообстеження та лікування статевого партнера. За 6 місяців жінка завагітніла та народила доношену дитину.

Приклад 2

Хвора Ю., 29 р., звернулась планово, щодо проведення преконцепційної підготовки. З анамнезу відомо про випадки появи незначних міжменструальних кров'янистих виділень зі статевих шляхів, які турбують протягом останніх 2 місяців. За даними УЗД - наявність поліпів ендометрія. Проведено гістероскопію із роздільним діагностичним вишкрібанням стінок порожнини матки та цервікального каналу (за даними ПГД - залозисто-фіброзний поліп порожнини матки).

Інтраопераційно отримано наступний матеріал: мазок-відбиток тканини з порожнини матки "+++" щодо наявності антигенів ЦМВ (зміна кольору препарату на зелений); сироватка крові - Ig M - 12,0 (позитивний результат), Ig G - 17,0 (позитивний результат) щодо наявності антиЦМВ-антитіл.

Вищевказані зміни були розцінені, як наявність активної форми цитомегаловірусної інфекції із ураженням структур ендометрія, після чого призначене комплексне противірусне лікування із дворазовим повтором місцевої імуномодуючої терапії. Чоловік обстежився, отримав курс анти-ЦМВ-імуноглобуліна.

За 8 місяців пацієнтка завагітніла, результати визначення ЦМВ-навантаження в момент першого візиту вагітної - негативні.

Таким чином, наведені приклади доводять, що запропонований спосіб оцінки активності цитомегаловірусної інфекції у жінок репродуктивного віку з проліферативними процесами ендометрія має високу клінічну інформативність, діагностичну і прогностичну значущість. Перевагами запропонованого способу є невисока вартість реактивів та обладнання і можливість дослідження одномоментно отриманих проб різних біологічних зразків для отримання більш детальної інформації про фазність та глибину ураження цитомегаловірусом організму жінки, що дозволить ефективно використовувати лікувальні заходи.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб діагностики цитомегаловірусної інфекції у жінок, що включає імуноферментне дослідження крові на наявність специфічних антитіл до ЦМВ (IgM, IgG), який **відрізняється** тим, що додатково здійснюється вірусологічне обстеження мазків-відбитків оперативного матеріалу (ендометріальна тканина), що дозволить не тільки виявити наявність специфічного

антигену ЦМВ у клітинах, але і його локалізацію в структурних елементах, у разі виявлення одного або декількох позитивних результатів продовжується обстеження пацієнтки в динаміці.

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

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