



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **69503** (13) **U**
(51) МПК (2012.01)
A61B 10/00
G01N 33/48 (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

| | |
|--|--|
| (21) Номер заявки: u 2011 13892 | (72) Винахідник(и): Ковальчук Леонід Якимович (UA), Бігуняк Володимир Васильович (UA), Дем'яненко Василь Васильович (UA) |
| (22) Дата подання заявки: 25.11.2011 | |
| (24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.04.2012 | (73) Власник(и): ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.Я.ГОРБАЧЕВСЬКОГО, Майдан Волі, 1, м. Тернопіль, 46001, Україна (UA) |
| (46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.04.2012, Бюл.№ 8 | |

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ГРИПУ

(57) Реферат:

Спосіб діагностики грипу включає лабораторне дослідження лейкоцитів периферійної крові пацієнта. 20 мкл нативної крові на предметному склі змішують із аналогічним об'ємом розчину флуорохрому акридину оранжевого в розведенні 1:10000 на ізотонічному розчині натрію хлориду. Після інкубації упродовж 45 хв. досліджують у полі зору люмінесцентного мікроскопу і визначають відсоткове співвідношення лейкоцитів із поліхромним світінням ядер, а саме зеленим, жовто-оранжевим і червоним. Висновок про наявність вірусного зараження роблять за кількісним критерієм реверсного зсуву спектра люмінесценції індукованого вірусом грипу токсичного ураження лейкоцитів (V_{ls}), який знаходять із формули:

$$V_{ls} = k_R \cdot \sqrt[3]{(g-2) \cdot (y_0+1) \cdot (r+1)}, (1).$$

UA 69503 U

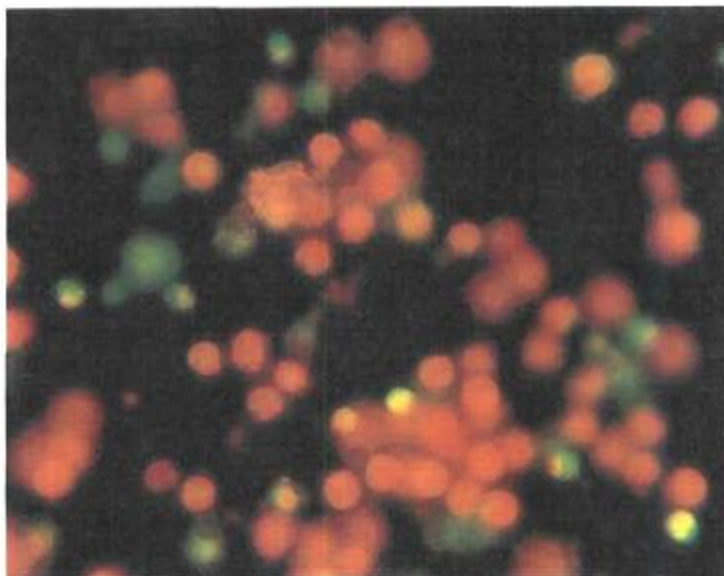


Fig. 1

Корисна модель належить до медицини, зокрема інфекційних хвороб, вірусології та епідеміології, і може бути використана в широкій медичній практиці як доступна інформативна проба для експрес-діагностики захворювання на грип в епідеміологічно-небезпечний період.

Відомий спосіб діагностики грипу, що включає отримання периферійної крові пацієнта з наступним лабораторним дослідженням в ній лейкоцитів [1]. За відомим способом визначають вміст лейкоцитів у периферійній крові пацієнта з підозрою на грип, і за показником лейкоцитозу чи лейкопенії у зіставленні з іншими діагностичними показниками і клінічними проявами роблять висновок про наявність або відсутність захворювання на грип, а також фазу його перебігу.

Недоліком відомого способу є недостатня інформативність, що впливає з обмеженої діагностичної цінності показника вмісту лейкоцитів у периферійній крові при вірусній інфекції, спричиненій вірусом грипу. Це пояснюється відомими коливаннями показника, що є відображенням фазності патологічного процесу, спричиненого вірусним фактором. До того ж, діагностичний тест на вміст лейкоцитів у периферійній крові полишений специфічності, що також вказує на обмежений характер його діагностичної цінності при грипі.

В основу корисної моделі поставлено задачу вдосконалити відомий спосіб, у якому шляхом зміни технології постановки діагностичної проби, спрямованої на виявлення глибинних змін у клітинних (лейкоцитарних) структурах на рівні ініційованих вірусним цитопатичним впливом біоенергетичних процесів, досягають підвищення інформативності діагностичного способу.

При вирішенні поставленої задачі було взято до уваги відомі механізми взаємодії вірусів із лейкоцитами як імунокомпетентними клітинами, причому ці механізми здійснюються за закономірностями фізики і хімії поверхневих явищ. У результаті вірусного цитопатичного впливу детермінантні групи глікокаліксу лейкоцитів блокуються макромолекулярними структурами вірусів, а відтак змінюють характер взаємодії із флуорохромом акридину оранжевим. За цих умов молекули акридину оранжевого із мономерної форми, яка забезпечує характерне для ДНК неуразених лейкоцитів яскраво-зелене світіння, вимушено трансформуються у димери [2,3]. Останні в силу притаманної їм властивості висвічувати червоним за умов заблокованості детермінант на поверхні мембран лейкоцитів і кон'югації з ураженою вірусами ДНК, викликають тотальний реверс люмінесценції ядерних структур лейкоцитів крові в мікропрепараті: від переважно короткохвильового зеленого (у здорових) - у бік довгохвильового червоного світіння, що набуває ознак індукованого вірусом токсичного ураження лейкоцитів.

Виходячи з наведених міркувань, у відомому способі діагностики грипу, що включає лабораторне дослідження лейкоцитів периферійної крові пацієнта, відповідно до корисної моделі, 20 мкл нативної крові на предметному склі змішують із аналогічним об'ємом розчину флуорохрому акридину оранжевого в розведенні 1:10000 на ізотонічному розчині натрію хлориду, а після інкубації упродовж 45 хв. досліджують у полі зору люмінесцентного мікроскопу і визначають відсоткове співвідношення лейкоцитів із поліхромним світінням ядер, а саме зеленим, жовто-оранжевим і червоним, а висновок роблять за кількісним критерієм реверсного зсуву спектра люмінесценції індукованого вірусом грипу токсичного ураження лейкоцитів (V_{Is}), який знаходять із формули:

$$V_{Is} = k_R \cdot \sqrt[3]{(g-2) \cdot (y_0+1) \cdot (r+1)}, \quad (1)$$

де g - вміст у мікропрепараті клітин, ядра яких висвічують зеленим, %;

y_0 - вміст у мікропрепараті клітин, ядра яких висвічують жовто-оранжевим, %;

r - вміст у мікропрепараті клітин, ядра яких висвічують червоним, %;

k_R - коефіцієнт спектрального реверсу зі значенням 1 або -1, залежно від встановленого порогового значення показника g .

Фіг. 1. Індукований гриппозною інфекцією зсув спектра вторинної люмінесценції ядер лейкоцитів у бік із відносно більшою довжиною хвилі. ЛЮАМ Р 8 МЗ.

Фіг. 2. Динаміка змін показника зсуву спектра люмінесценції лейкоцитів хворої на грип людини.

Спосіб здійснюють наступним чином. На предметне скло наносять 20 мкл нативної крові і змішують із аналогічним об'ємом розчину флуорохрому акридину оранжевого в розведенні 1:10000 на ізотонічному розчині натрію хлориду, а після інкубації упродовж 45 хв. досліджують у полі зору люмінесцентного мікроскопу і визначають відсоткове співвідношення лейкоцитів із поліхромним світінням ядер, а саме зеленим, жовто-оранжевим і червоним, а висновок про наявність вірусного зараження роблять за кількісним критерієм реверсного зсуву спектра люмінесценції індукованого вірусом грипу токсичного ураження лейкоцитів (V_{Is}), який знаходять із формули:

$$V_{Is} = k_R \cdot \sqrt[3]{(g-2) \cdot (y_0+1) \cdot (r+1)}, \quad (1)$$

де g - вміст у мікропрепараті клітин, ядра яких висвічують зеленим, %;

y₀ - вміст у мікропрепараті клітин, ядра яких висвічують жовто-оранжевим, %;

5 г - вміст у мікропрепараті клітин, ядра яких висвічують червоним, %;

k_R - коефіцієнт спектрального реверсу зі значенням 1 або -1, залежно від встановленого порогового значення показника г. Далі за відсотковим показником реверсного зсуву спектра люмінесценції лейкоцитів (V_{Is}) відповідно до критеріальних меж (табл. 1) роблять висновок про наявність у пацієнта захворювання на вірусний грип.

10

Таблиця 1

Кількісні критерії реверсного зсуву спектра люмінесценції уражених вірусом грипу лейкоцитів

| Межі фізіологічної норми і | Критеріальні межі показника V _{Is} | | | |
|----------------------------|---|----------|----------|-----------|
| < 12 | -(10÷14) | -(15÷30) | -(31÷40) | <(-40) |
| | легкий | середній | високий | надмірний |

Приклад 1. У пацієнта Д., 21 р., з діагнозом грип, із пальця взяли 40 мкл нативної крові і змішали на предметному склі з аналогічним об'ємом 2 % розчину цитрату натрію. До 20 мкл цитратної крові на предметному склі внесли 20 мкл розчину флуорохрому акридину оранжевого на ізотонічному розчині натрію, змішали і покрили скельцем. Через 45 хв. мікропрепарат досліджували у полі зору люмінесцентного мікроскопу, в процесі якого визначили відсоткове співвідношення лейкоцитів із поліхромним світінням ядер, а саме зеленим, жовто-оранжевим і червоним. І при цьому було встановлено, що переважна кількість клітин висвічувала червоним, що становило 79 %, жовто-оранжевим 16 % і 5 % клітин висвічували зеленим (фіг. 1). У контрольному препараті крові дорослої здорової людини співвідношення "червоних", "жовто-оранжевих" і "зелених" клітин становило 2,9 і 89 % - відповідно, що відповідає середньостатистичній нормі. Далі визначали показник зсуву спектра люмінесценції лейкоцитів (V_{Id}) свіжоцитратної крові за формулою (1):

$$V_{Is} = k_R \cdot \sqrt[3]{(g-2) \cdot (y_0+1) \cdot (r+1)}, \quad (1)$$

25

І отримали Д. V_{Is} = k_R · √[3]{(5-2) · (16+1) · (79+1)} = 15,9. Проте оскільки вміст "червоних" лейкоцитів г перевищував встановлений поріг на 20 % (r>20), то коефіцієнт спектрального реверсу k_R набував значення -1, а показник V_{Is} становив таким чином - 15,9. Відповідно до наведених у табл.1 критеріальних меж показника V_{Is} зроблено висновок про середній рівень вірусного ураження лейкоцитів пацієнта Д., як характерну для грипоної інфекції ознаку.

30

Приклад 2.

За запропонованим способом провели дослідження свіжоцитратної крові хворого на грип М., 24 р, у різні дні захворювання. За представленими в табл. 2 результатами люмінесцентного аналізу лейкоцитів свіжоцитратної крові побудовано графік (фіг. 2). Зроблено висновок про характер вірусного ураження в динаміці захворювання.

35

Таблиця 2

Люмінесцентний аналіз крові хворого на грип пацієнта М. у різні дні захворювання

| День проведення аналізу крові | Лейкоцити з поліхромним ядром, % | | світінням | Показник V _{Is} % |
|-------------------------------|----------------------------------|----------------|-----------|----------------------------|
| | g | y ₀ | г | |
| 1 | 9 | 90,5 | 21 | -22,1 |
| 3 | 16 | 81,0 | 12 | -23,9 |
| 7 | 24 | 96,0 | 20 | -33,9 |
| 10 | 73 | 18,1 | 15 | 24,5 |
| 14 | 91 | 11,7 | 8 | 11,8 |

Так, із наведених у таблиці 2 даних видно, що у пацієнта М. упродовж семи днів (1,3 і 7) мав місце виражений реверс показника зсуву спектра люмінесценції клітин як наслідок індукованого вірусом грипу токсичного ураження лейкоцитів (переважання вмісту "червоних" клітин: $r > 20$). Цей зсув на 1,3 і 7 дні складав - (22,1), - (23,9) і - (32,9) - відповідно. На графіку (фіг. 2) наведені значення показника V , що лежать нижче лінії - межі фізіологічної норми. На 10 добу вказаний показник вже перевищував рівень норми, досягаючи значення 24,5 % як прояв адаптаційних змін в організмі пацієнта, а на 14 добу показник V_{is} досяг рівня фізіологічної норми, що дорівнювало відповідно значенню 11,8 %.

Таким чином, із наведених даних видно, що запропонований спосіб забезпечує вищу, ніж за способом-прототипом, технологічність дослідження, точність та інформативність його результатів, і може бути використаний у широкій медичній практиці, зокрема для експрес-діагностики грипу в період спалаху епідемій.

Джерела інформації, які слід взяти до уваги:

1. Карпухин Г.И. Грипп. Л.: Медицина, 1986.-348 с.
2. Зеленин А.В. Взаимодействие аминопроизводных акридина с клеткой. М.: Наука, 1971.
3. Карнаухов В.Н. Люминесцентный анализ клеток. Пущино, 2002. Электронная версия. Подготовлена в Электронном издательстве "Аналитическая микроскопия" под редакцией проф. А.Ю. Буданцева (рег. № издательства в Министерстве РФ по делам печати, телерадиовещания и средств массовой информации. Эл. № 6072 от 4 февраля 2002 г.) <http://cam.psn.ru>

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб діагностики грипу, що включає лабораторне дослідження лейкоцитів периферійної крові пацієнта, який **відрізняється** тим, що 20 мкл нативної крові на предметному склі змішують із аналогічним об'ємом розчину флуорохрому акридину оранжевого в розведенні 1:10000 на ізотонічному розчині натрію хлориду, а після інкубації упродовж 45 хв. досліджують у полі зору люмінесцентного мікроскопу і визначають відсоткове співвідношення лейкоцитів із поліхромним світінням ядер, а саме зеленим, жовто-оранжевим і червоним, а висновок про наявність вірусного зараження роблять за кількісним критерієм реверсного зсуву спектра люмінесценції індукованого вірусом грипу токсичного ураження лейкоцитів (V_{is}), який знаходять із формули:

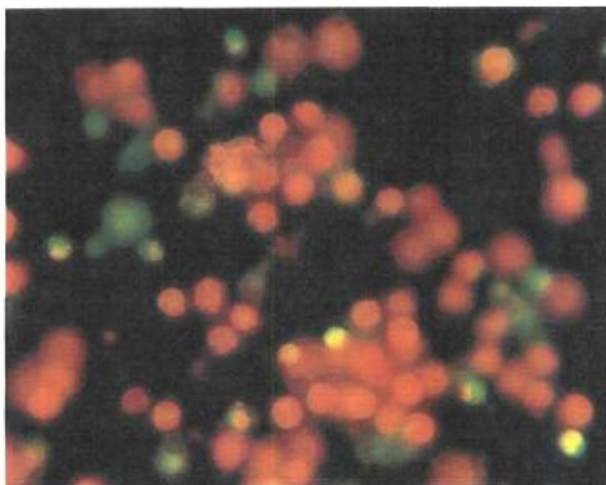
$$V_{is} = k_R \cdot \sqrt[3]{(g-2) \cdot (y_0+1) \cdot (r+1)}, \quad (1)$$

де g - вміст у мікропрепараті клітин, ядра яких висвічують зеленим, %;

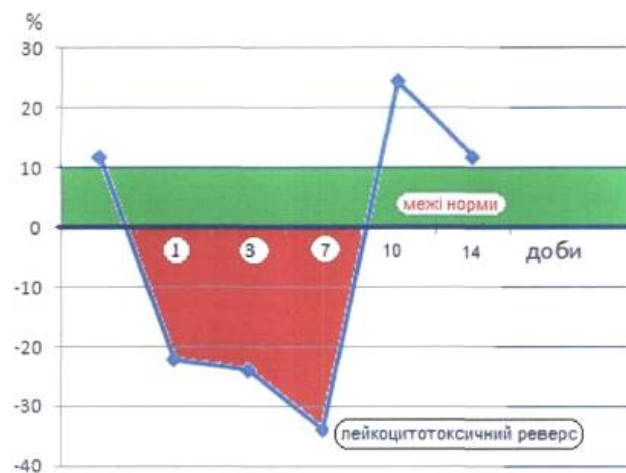
y_0 - вміст у мікропрепараті клітин, ядра яких висвічують жовто-оранжевим, %;

r - вміст у мікропрепараті клітин, ядра яких висвічують червоним, %;

k_R - коефіцієнт спектрального реверсу зі значенням 1 або -1, залежно від встановленого порогового значення показника g .



Фіг. 1



Фіг. 2

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

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

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