



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **85885** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)
G01N 33/53 (2006.01)
A61B 5/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2013 04547	(72) Винахідник(и): Чемич Микола Дмитрович (UA), Піддубна Анна Іванівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 11.04.2013	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.12.2013	(73) Власник(и): СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Римського-Корсакова, 2, м. Суми, 40007 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.12.2013, Бюл.№ 23	

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ РОЗВИТКУ ОПОРТУНІСТИЧНИХ ІНФЕКЦІЙ У ВІЛ-ІНФІКОВАНИХ ОСІБ

(57) Реферат:

Спосіб прогнозування розвитку опортуністичних інфекцій у ВІЛ-інфікованих осіб шляхом дослідження сироватки крові із визначенням у ній вмісту цитокінів. Для дослідження сироватки крові забирають зразок венозної крові і вміст у ній цитокінів проводять детекцією інтерлейкіну 10 та фактора некрозу пухлин альфа, використовуючи стандартну методику імуноферментного аналізу. І, якщо рівень інтерлейкіну 10 становить $(32,5 \pm 8,28)$ пг/мл, а рівень фактора некрозу пухлин альфа - $(2,63 \pm 0,95)$ пг/мл, прогнозують розвиток трьох та більше опортуністичних інфекцій з наступним висновком про високу ймовірність проградієнтного перебігу ВІЛ-інфекції.

UA 85885 U

Корисна модель належить до медицини, зокрема до інфекційних хвороб, і може бути використана для прогнозування розвитку опортуністичних інфекцій та перебігу захворювання у хворих з ВІЛ-інфекцією/СНІДом.

Відомий спосіб прогнозування швидкого прогресування недуги у осіб з ВІЛ, що базується на кількісному визначенні вмісту CD4+, CD8+, CD16+, CD20+ лімфоцитів та циркулюючих імунних комплексів [1]. Цей спосіб надає уявлення про глибину імунodefіциту, однак має обмежені можливості щодо прогнозування перебігу захворювання, яке у цьому випадку засноване на емпіричному досвіді переходу однієї стадії недуги в іншу.

Відомий спосіб прогнозування перебігу ВІЛ-інфекції, в основу якого покладено передбачення несприятливого прогнозу при виявленні двох і більше вірусних агентів родини Herpesviridae [2]. Недоліком даного способу є використання дороговартісного методу ДНК-вмісних зондів та віднесення до кофакторів прогресування ВІЛ-інфекції лише однієї групи збудників.

Найбільш близьким до запропонованого способу і прийнятим за прототип є спосіб прогнозування розвитку СНІДу у дітей [3]. Згідно з цим способом, ймовірність розвитку СНІДу засновується на дослідженні сироватки крові із визначенням у ній внутрішньоклітинної продукції цитокінів, а саме інтерферону гама (INF- γ), інтерлейкіну 2 (IL-2) та фактора некрозу пухлин альфа (TNF- α) CD3+, CD4+ лімфоцитами методом проточної цитометрії. Але слід мати на увазі, що спосіб може бути використаний тільки для прогнозування розвитку термінальної стадії ВІЛ-інфекції, та не може свідчити про можливість детекції опортуністичних інфекцій у хворих з імунodefіцитом. Недоліком існуючої корисної моделі є те, що передбачається визначення внутрішньоклітинної продукції цитокінів з застосуванням методу проточної цитометрії, який, у свою чергу, вимагає наявності специфічного устаткування. Використання способу також обмежується доведеною ефективністю лише на особах дитячого віку.

У доступній літературі не знайдено способів діагностики розвитку опортуністичних інфекцій при ВІЛ/СНІДі шляхом визначення сироваткових рівнів цитокінів.

Відомо, що баланс цитокінів відіграє важливу роль у регулюванні гомеостазу імунної системи і впливає на перебіг ВІЛ-інфекції. ВІЛ-асоційована імунна дисфункція обумовлена активацією як протизапальної, так і прозапальної цитокінових ланок, з підвищенням вмісту інтерлейкіну 10 (IL-10) і фактора некрозу пухлин альфа (TNF- α) [4-6]. На високу сироваткову концентрацію TNF- α при прогресуванні недуги вказується багатьма дослідниками, більшість з яких підкреслюють кореляцію даного підвищення зі зниженням кількості CD4+ лімфоцитів і тяжкістю клінічної картини захворювання [7, 8]. Значення IL-10 у розвитку хвороби полягає у його здатності як знижувати, так і підвищувати реплікацію вірусу залежно від присутності інших цитокінів. Високі рівні IL-10 зафіксовані у сироватці інфікованих осіб на пізніх стадіях хвороби [9, 10].

В основу корисної моделі поставлено задачу створення способу своєчасної діагностики опортуністичних інфекцій у ВІЛ-інфікованих осіб шляхом дослідження сироватки крові із визначенням у ній вмісту цитокінів, що дозволить вчасно прогнозувати проградієнтний перебіг захворювання, зменшуючи при цьому економічні збитки внаслідок покращення ефективності спостереження пацієнтів з ВІЛ/СНІДом.

Поставлена задача вирішується тим, що у відомому способі прогнозування розвитку опортуністичних інфекцій у ВІЛ-інфікованих осіб, який включає дослідження сироватки крові із визначенням вмісту в ній цитокінів, згідно із корисною моделлю, для дослідження забирають зразок венозної крові і вміст у ній цитокінів проводять визначенням саме IL-10 та TNF- α , використовуючи стандартну методику імуноферментного аналізу, причому, якщо рівень IL-10 становить (32,5 \pm 8,28) пг/мл, а рівень TNF- α -(2,63 \pm 0,95) пг/мл, прогнозують розвиток трьох та більше опортуністичних інфекцій з наступним висновком про високу ймовірність проградієнтного перебігу ВІЛ-інфекції. Використання способу, що заявляється, з усіма суттєвими ознаками, включаючи відмінні, дозволяє прогнозувати тяжкий перебіг захворювання та вчасно проводити діагностику опортуністичних інфекцій на тлі ВІЛ/СНІДу.

Спосіб здійснюють наступним чином: зразок венозної крові забирають натще, одразу здійснюється центрифугування, визначають сироваткову концентрацію цитокінів IL-10 та TNF- α за стандартною методикою імуноферментного аналізу. Для визначення рівнів вмісту інтерлейкінів на першій стадії аналізу в усі лунки вносять по 100 мкл розчину для розведення зразків. Далі додають по 100 мкл досліджуваних проб. Після цього проводять інкубацію 120 хв. при температурі 37,0 °C і 700 об./хв. Матеріал, який не зв'язався, промивають 5 разів розчином 1, який вносять по 300 мкл до кожної лунки в процесі однієї відмивки. Зв'язані цитокіни у стріпах взаємодіють при інкубації із відповідними кон'югатами № 1. Отримані розчини інкубують у шейкері протягом 60 хв. при температурі 37,0 °C і 700 об./хв. Після завершення інкубації лунки

стрипів знову 5 разів промивають. На наступній стадії до вмісту лунок додають по 100 мкл робочих розчинів кон'югату № 2 (стрептавідин із пероксидазою хрому) та інкубують протягом 30 хв. при температурі 37,0 °C і 700 об./хв. із наступним третім п'ятиразовим відмиванням. Після цього до кожної лунки вносять по 100 мкл розчину тетраметилбензидину та інкубують у темряві протягом 30 хв. при температурі 20,0 °C. Потім додають по 100 мкл стоп-реагенту. Облік результатів проводять на аналізаторі "ImmunoChem-2100" ("HTI", США) шляхом вимірювання оптичної щільності вмісту лунок при довжині хвилі 450 нм за допомогою запрограмованого калібрувального графіка.

Суть способу діагностики розвитку опортуністичних інфекцій у ВІЛ-інфікованих осіб пояснюється наступними прикладами.

Приклад 1. Хворий В., 30 років, мешканець м. Суми. ВІЛ-позитивний статус відомий протягом 3-х років. Ймовірний шлях інфікування - парентеральний (обстежений як споживач ін'єкційних наркотиків).

Крім загальноприйнятих та передбачених протоколом обстежень проводилося визначення вмісту IL-10 і TNF- α у сироватці крові методом імуноферментного аналізу. Отримано результати: IL-10-27,59 пг/мл, TNF- α -1,6 пг/мл.

Високі рівні IL-10 і TNF- α надали змогу передбачити тяжкий перебіг недуги у хворого та прогнозувати діагностику трьох і більше опортуністичних інфекцій.

Через 3 місяці звернувся в клініку зі скаргами на виражену загальну слабкість, підвищення температури тіла до 39 °C, кашель з виділенням незначної кількості харкотиння, біль у суглобах, часті рецидиви лабіального герпесу.

При госпіталізації загальний стан хворого тяжкий. Тяжкість стану зумовлена інтоксикаційним синдромом. Шкіра бліда, у ділянці червоної облямівки губ наявні герпетичні висипання. На слизовій язика, задньої стінки глотки білі нашарування. Над легеньми жорстке дихання, хрипів немає. ЧД 24 за хв. Тони серця ослаблені, ритмічні, ЧСС 90 за хв., АТ 110/80 мм рт. ст. Живіт м'який, не болючий, печінка виступає із-під краю реберної дуги на 2 см, край заокруглений.

Було встановлено діагноз: ВІЛ-інфекція, III клінічна стадія. Орофарингеальний кандидоз. Герпетична інфекція, шкірна, лабіальна форма. ГРВІ, тяжкий перебіг. Токсичний гепатит.

Результати сироваткової концентрації IL-10 і TNF- α , отримані на догоспітальному етапі, скерували діагностичний пошук на виявлення третьої опортуністичної інфекції. Хворому призначений огляд фтизіатра, який встановив діагноз: туберкульоз.

Для подальшого лікування переведений в тубстаціонар, з діагнозом: ВІЛ-інфекція, III клінічна стадія. Вперше діагностований туберкульоз, верхньої долі лівої легені, (вогнищевий). Орофарингеальний кандидоз. Герпетична інфекція, шкірна, лабіальна форма. Токсичний гепатит.

Приклад 2. Хворий Є., 30 років, мешканець м. Кролевець. ВІЛ-інфекція встановлена у поточному році, обстежений на наявність антитіл до ВІЛ 1/2 за клінічними показаннями. Ймовірний шлях інфікування - статевий.

Крім загальноприйнятих та передбачених протоколом обстежень проводилося визначення вмісту IL-10 і TNF- α у сироватці крові. Отримано результати: IL-10-64,75 пг/мл, TNF- α -2,23 пг/мл.

Високі рівні зазначених інтерлейкінів надали змогу передбачити тяжкий перебіг недуги у хворого та прогнозувати діагностику трьох і більше опортуністичних інфекцій. Так, при дослідженні катамнезу встановлено, що за 2 місяці стан хворого погіршився. Направлений на госпіталізацію в клініку з діагнозом: ВІЛ-інфекція, III клінічна стадія. Лейкоплакія язика. Орофарингеальний кандидоз. Хронічний вірусний гепатит В, С, мінімальної активності. Мієлодиспластичний синдром. Хронічний холецистит, стадія ремісії. Хронічний гастродуоденіт, стадія ремісії.

При госпіталізації загальний стан хворого тяжкий. Астенізований. Тяжкість стану зумовлена наявністю інтоксикаційного синдрому, анемією. Шкіра бліда, на слизовій язика, задньої стінки глотки, ясен білі нашарування. Пальпуються передньо-, задньошийні, пахові, пахвові, надключичні лімфатичні вузли, щільної консистенції, неbolючі, діаметром до 1 см. У проекції лівої привушної слинної залози наявне об'ємне утворення. Над легеньми везикулярне дихання, хрипів немає. ЧД 18 за хв. Тони серця ослаблені, ритмічні, ЧСС 78 за хв., АТ 120/80 мм рт. ст. Живіт м'який, не болючий, печінка виступає із-під краю реберної дуги на 1 см, край заокруглений.

Внаслідок наявності високих сироваткових рівнів IL-10 і TNF- α , отриманих на догоспітальному етапі, діагностичний пошук був направлений на виявлення третьої опортуністичної інфекції. Призначений огляд онколога.

Проведена пункція шийного лімфатичного вузла. Встановлено діагноз: лімфома Беркіта.

Для подальшого лікування переведений у профільну онкологічну клініку з діагнозом: ВІЛ-інфекція, IV клінічна стадія. Лімфома Беркіта. Стадія 4. Група 4. Лейкоплакія язика. Орофарингеальний кандидоз. Хронічний вірусний гепатит В, С, мінімальної активності. Хронічний холецистит, стадія ремісії. Хронічний гастродуоденіт, стадія ремісії.

З метою визначення ефективності запропонованого методу діагностики розвитку опортуністичних інфекцій обстежено 59 ВІЛ-інфікованих осіб, серед яких було 40 (67,8 %) чоловіків та 19 (32,2 %) жінок у віці $(32,61 \pm 0,87)$ року. ВІЛ-інфіковані з I клінічною стадією недуги склали 6,8 % (5 осіб), з II-5,1 % (3), з III-37,3 % (22), з IV-50,8 % (30). Пацієнти були розподілені на групи залежно від рівнів IL-10 та TNF- α . До I групи увійшли 26 осіб з рівнем IL-10 < 10,0 пг/мл, TNF- α < 1,0 пг/мл, до II-33 хворих з рівнем IL-10 та TNF- α вищими за відповідні I групи. ВІЛ-інфіковані досліджуваних груп не відрізнялися за тендерною, віковою ознаками та шляхом інфікування. Групу порівняння склали зіставні за статтю і віком 30 клініко-анамнестично здорових донорів крові.

Серед контингенту групи I рівні протизапального цитокіну IL-10 та прозапального TNF- α достовірно не перевищували показники групи порівняння (див. таблицю).

Таблиця

Сироваткові рівні IL-10 та TNF- α серед дослідних груп

Показник	Група порівняння (n=30)	Група I (n=26)	Група II (n=33)
IL-10, пг/мл	$1,68 \pm 0,32$	$2,4 \pm 0,38$	$32,5 \pm 8,28^*, **$
TNF- α , пг/мл	$0,51 \pm 0,32$	$0,58 \pm 0,31$	$2,63 \pm 0,95^*, **$

Примітка: * - достовірна різниця показника щодо осіб групи порівняння, $p < 0,001$; ** - достовірна різниця показника щодо групи I, $p < 0,05$.

У ВІЛ-інфікованих групи II спостерігалися достовірно вищі рівні IL-10 та TNF- α у порівнянні з контролем, які перевищували аналогічні показники групи I у 13,5 та 4,5 разу відповідно ($p < 0,05$) (див. таблицю).

При співставленні клінічних стадій ВІЛ-інфекції пацієнтів досліджуваних груп встановлено, що стадія безсимптомного носійства виявлена лише в осіб з групи I, а клінічна стадія III у них зустрічалася у 2,7 разу частіше ($p < 0,05$) (фіг. 1). У групі II домінували пацієнти з термінальною стадією захворювання (показник перевищив аналогічний серед осіб групи I у 6,9 разу, $p < 0,001$).

В осіб групи I на момент звернення за медичною допомогою у всіх пацієнтів загальний стан був розцінений як середнього ступеня тяжкості, що у 2,2 разу частіше, ніж серед осіб групи II ($p < 0,05$). У хворих з високими рівнями цитокінів тяжкий стан зафіксовано у 36,4 % випадків, вкрай тяжкий стан - у 18,2 %, що достовірно перевищує відповідні дані групи I ($p < 0,05$).

Кількість опортуністичних інфекцій, що були діагностовані у 1 хворого групи II, коливалась від 3 до 5, склавши в середньому $(3,34 \pm 0,15)$. В осіб групи I значення показника було достовірно меншим - $(1,19 \pm 0,17)$ ($p < 0,001$).

Необхідно відзначити, що в когорті осіб групи II наявна залежність сироваткової концентрації інтерлейкінів від перебігу захворювання. Так, зафіксовано прямі кореляційні зв'язки середньої сили між рівнями відповідних цитокінів і тяжкістю загального стану пацієнтів (IL-10: $r = 0,35$, $p < 0,05$; TNF- α : $r = 0,31$, $p < 0,05$); кількістю опортуністичних інфекцій, які виявлено у 1 хворого (IL-10: $r = 0,42$, $p < 0,05$; TNF- α : $r = 0,34$, $p < 0,05$).

При вивченні структури патології, асоційованої з ВІЛ встановлено, що серед пацієнтів з високими рівнями цитокінів найбільш розповсюдженими були інфекції бактеріального походження, які включали бактеріальні респіраторні захворювання та туберкульоз (фіг. 2), показник перевищив відповідний серед хворих групи I у 3,9 разу ($p < 0,001$).

При проведенні аналізу спектра опортуністичних інфекцій встановлено, що сухоти легеневи та позалегевих локалізацій діагностувалися лише у когорті хворих II групи ($p < 0,01$) (фіг. 3).

Паразитарні інвазії, як причини звернення за медичною допомогою, домінували серед осіб групи II. Так, як видно з фіг. 3, токсоплазмоз реєструвався серед цих пацієнтів у 3,9 разу частіше ($p < 0,05$).

Захворювання грибкової та вірусної природи на тлі ВІЛ-інфекції зустрічалися з однаковою частотою серед осіб досліджуваних груп (фіг. 2), проте у хворих з високими рівнями IL-10 та TNF- α зазвичай перебігали з генералізацією процесу та тяжкими органічними ураженнями.

Результати проведеного клінічного вивчення дозволили зробити наступні висновки:

1. Доцільність використання сироваткових рівнів IL-10 та TNF- α як прогностичних маркерів розвитку опортуністичних інфекцій у ВІЛ-інфікованих підтверджують кореляційні зв'язки між концентрацією цитокінів та кількістю опортуністичних інфекцій на одного хворого, достовірно частіше виявлені пізні стадії захворювання, тяжкий перебіг недуги, обумовлений наявністю

численних опортуністичних інфекцій, зокрема туберкульозу та паразитарних інвазій.

2. Серед обстежених ВІЛ-інфікованих пацієнтів з рівнем IL-10 ($32,5 \pm 8,28$) пг/мл та TNF- α ($2,63 \pm 0,95$) пг/мл реєструються три і більше опортуністичні інфекції, що дозволяє скеровувати діагностичний пошук на виявлення тяжких захворювань, асоційованих з ВІЛ, при детекції високих рівнів відповідних цитокінів.

Таким чином, запропонований спосіб сприяє своєчасній діагностиці опортуністичних інфекцій у ВІЛ-інфікованих осіб, надаючи можливість поставити діагноз, знизити матеріальні витрати; має простоту і надійність і виключає недоліки найближчого аналога.

Джерела інформації:

1. Патент RU, 2306566 C1, кл. G01N 33/53, опубл. 20.09.2007.

2. Заявка на винахід RU № 94020017 A1, кл. G01N 33/48, опубл. 20.05.1996.

3. Патент UA, 36669 U, кл. A61B 5/00, опубл. 10.11.2008.

4. Functional state of CD4+and CD8+T lymphocytes and their role in the slow progression of HIV infection in pediatric patients / M.A. Alfonzo, A. Diaz, L. Siciliano (et al.) // J Pediatr (Rio J).-2012. - Vol. 88, № 2. - P. 161-168.

5. TH1/TH2 cytokine levels as an indicator for disease progression in human immunodeficiency virus type 1 infection and response to antiretroviral therapy / C.E. Osakwe, C. Bleotu, M.C. Chifiriuc (et al.) // Roum Arch Microbiol Immunol.-2010. - Vol. 69, № 1. - P. 24-34.

6. Identification of three immunologic correlates for HIV type 1 pathogenesis in youth / W. Song, Y. Li, CM. Wilson (et al.) // AIDS Res Hum Retroviruses.-2011. - Vol. 27, № 6. - P. 639-646.

7. Epigenetic regulation of tumor necrosis factor a release in human macrophages by HIV-1 single-stranded RNA is dependent on TLR8 signaling / X. Han, X. Li, S.C. Yue (et al.) // J Biol Chem.-2012. - Vol. 287, № 17.-P. 13778-13786.

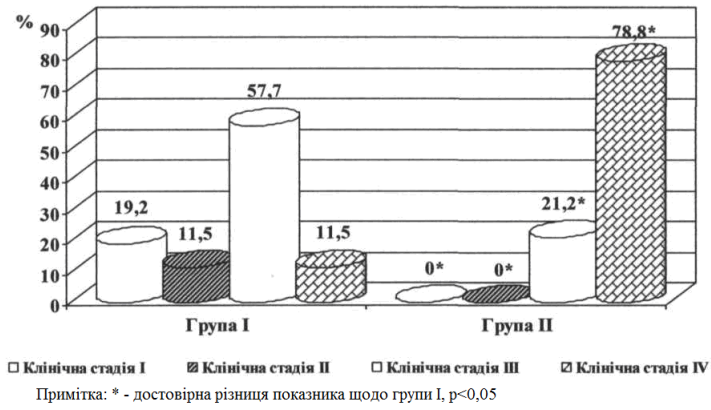
8. Cytokine profiles in HIV-1 subtype infected individuals with different rates of diseases progression: a multiplex immunoassay / T. Chuenchitra, P. Chaitaveep, S. Sukwit (et al.) // Journal of the Medical Association of Thailand.-2012. - Vol. 134, № 5. - P. 116-123.

9. Kwon D.S. Protective and detrimental roles of IL-10 in HIV pathogenesis / D.S. Kwon, D.E. Kaufmann // Eur Cytokine Netw.-2010. - Vol. 21, № 3. - P. 208-214.

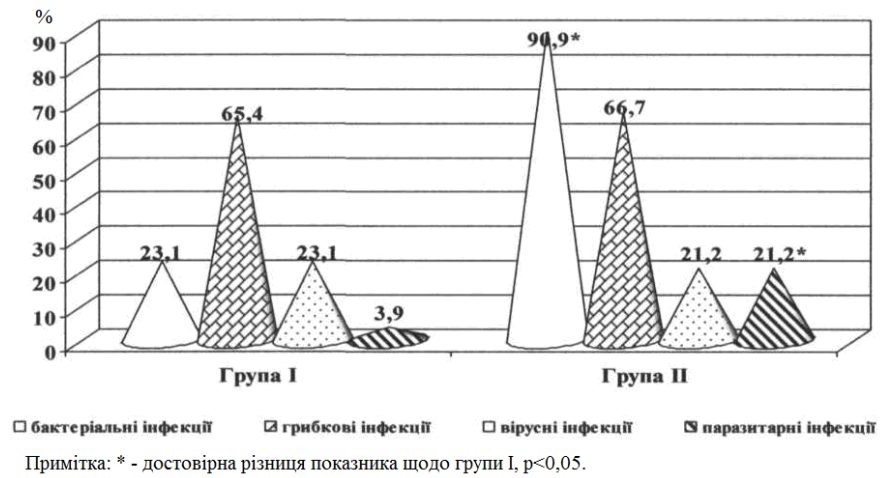
10. The Th1/Th2/Th17 cytokine profile of HIV-infected individuals: A multivariate cytokinomics approach / A. Williams, F. Steffens, C Reinecken (et al.) // Cytokine.-2013. - Vol. 61, № 2. - P. 521-526.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

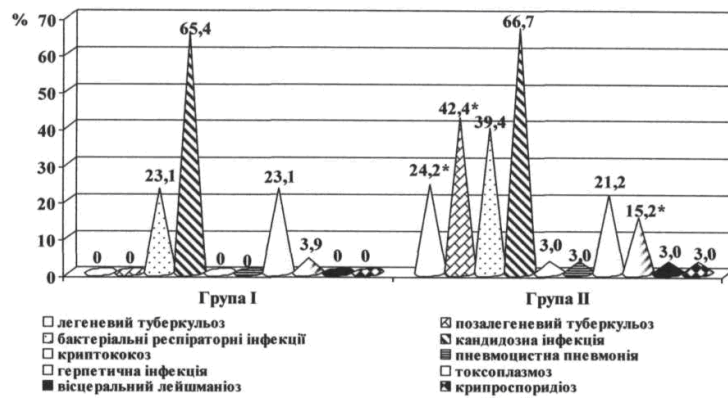
Спосіб прогнозування розвитку опортуністичних інфекцій у ВІЛ-інфікованих осіб, що включає дослідження сироватки крові із визначенням у ній вмісту цитокінів, який **відрізняється** тим, що для дослідження сироватки крові забирають зразок венозної крові і вміст у ній цитокінів проводять детекцією інтерлейкіну 10 та фактора некрозу пухлин альфа, використовуючи стандартну методику імуноферментного аналізу, причому, якщо рівень інтерлейкіну 10 становить ($32,5 \pm 8,28$) пг/мл, а рівень фактора некрозу пухлин альфа - ($2,63 \pm 0,95$) пг/мл, прогнозують розвиток трьох та більше опортуністичних інфекцій з наступним висновком про високу ймовірність проградієнтного перебігу ВІЛ-інфекції.



Фіг. 1



Фіг. 2



Фіг. 3

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

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