



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **106362** (13) **U**
(51) МПК (2016.01)
A61B 10/00
G01N 33/48 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2015 10062</p> <p>(22) Дата подання заявки: 15.10.2015</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.04.2016</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.04.2016, Бюл.№ 8</p>	<p>(72) Винахідник(и): Дубинська Галина Михайлівна (UA), Прийменко Наталія Олегівна (UA), Кайдашев Ігор Петрович (UA), Ізюмська Олена Михайлівна (UA), Коваль Тетяна Ігорівна (UA), Котелевська Тетяна Михайлівна (UA), Боднар Вадим Анатолійович (UA), Похилько Валерій Іванович (UA)</p> <p>(73) Власник(и): ВИЩИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД УКРАЇНИ "УКРАЇНСЬКА МЕДИЧНА СТОМАТОЛОГІЧНА АКАДЕМІЯ", вул. Шевченка, 23, м. Полтава, 36011 (UA)</p>
---	--

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ ТЯЖКОГО ТА УСКЛАДНЕНОГО ПЕРЕБІГУ ГРИПУ І ГРИП-АСОЦІЙОВАНОЇ ПНЕВМОНІЇ

(57) Реферат:

Спосіб прогнозування тяжкого та ускладненого перебігу грипу і грип-асоційованої пневмонії включає застосування полімеразної ланцюгової реакції. Проводять генотипування поліморфних локусів Arg753Gln гена TLR-2, Leu412Phe TLR-3, Asp299Gly TLR-4. При виявленні генотипів Leu/Phe і Phe/Phe TLR-3 та їх комбінацій із Arg/Gln TLR-2 і Asp/Gly TLR-4 прогнозують тяжкий перебіг грипу з високою ймовірністю грип-асоційованої пневмонії тяжкого перебігу з розвитком поліорганної недостатності та гострого респіраторного дистрес-синдрому.

UA 106362 U

Запропонована корисна модель належить до галузі медицини, а саме - до інфекційних хвороб і медичної генетики, й призначається для прогнозування ризику розвитку тяжкого та ускладненого перебігу грипу і грип-асоційованої пневмонії.

5 Грип і грипоподібні захворювання залишаються однією з найактуальніших медичних та соціальних проблем в силу високої питомої ваги в інфекційній патології (80-90 %), а також ризику розвитку тяжких ускладнень та загострень хронічних хвороб.

10 На сьогодні доведено, що тяжкий та ускладнений перебіг грипу розвивається переважно у пацієнтів із груп ризику, до яких належать: вагітні, хворі на цукровий діабет, ожиріння, хронічні захворювання легень та серця, а також особи старших вікових груп. Проте, за даними ВООЗ, у 30 % пацієнтів, які раніше вважалися здоровими, також можливий тяжкий і ускладнений перебіг грипу. Тому для практичної охорони здоров'я надзвичайно важливим є раннє виявлення осіб, які мають загрозу несприятливого перебігу грипу.

15 Дослідження останніх років свідчать про те, що сприйнятливість до інфекційних агентів є генетично детермінованою. Тому пошук інформативних генетичних маркерів, які регулюють ключові ланки патогенезу грипу, безсумнівно, залишається одним із пріоритетних завдань сучасної медицини, вирішення якого дозволить сформувати серед практично здорових осіб групу ризику схильних до тяжкого та ускладненого перебігу хвороби для своєчасного проведення профілактичних заходів.

20 Відомими способами прогнозування перебігу грипу та розвитку ускладнень є: спосіб прогнозування бактеріальних ускладнень грипу та гострих респіраторних вірусних інфекцій (ГРВІ) на 1-5 дні хвороби, який полягає у визначенні тривалості лихоманки, абсолютної кількості лейкоцитів, показника резерву фагоцитів і спонтанної люменолзалежної хемілюмінесценції, процентного вмісту нейтрофілів, С-4 компонента компліменту, швидкості осідання еритроцитів, супутніх хвороб респіраторного тракту та ЛОР-органів, віку хворого, концентрації фібрoneктину, імуноглобуліну G, часу досягнення максимуму стимульованої люменолзалежної хемілюмінесценції, процентного вмісту лімфоцитів, кількості циркулюючих імунних комплексів, показника лейкоцитарного індексу інтоксикації з наступним підрахунком діагностичних коефіцієнтів. При значенні діагностичного порога +13 прогнозують неускладнений грипу чи ГРВІ, а при досягненні цього порога -13 прогнозують можливість бактеріальних ускладнень (Патент РФ № 2063039, МПК G01N33/48, G01N33/483. Спосіб прогнозування бактеріальних ускладнень грипу та ОРВИ на 1-5 дні хвороби / Созинов А.С., Еналеева Д.Ш., Зинкевич О.Д., Хамитов Р.Ф.; заявитель и патентообладатель: Казанский государственный медицинский институт им. С.В. Курашова. - № 5068366/14; заявл. 14.09.1992; опубл. 27.06.1996.); Спосіб прогнозування бактеріальних ускладнень грипу, головним чином грипу А середнього ступеня тяжкості, що включає визначення у крові хворого на 1-5 дні хвороби абсолютної кількості лейкоцитів і процентного вмісту нейтрофілів, величини С-реактивного білка і антитіл ліпополісахариду ентобактерій класу М (анти-ЛПС-IgM) методом імуноферментного аналізу, і при рівні СРБ не більше 10 мг/л та величиною анти-ЛПС-IgM в межах 0,111±0,012 УО ОЩ діагностують неускладнений перебіг хвороби, а при збереженні або підвищенні патологічних концентрацій зазначених речовин понад 3 доби від початку терапії на тлі підвищення рівня лейкоцитів і вмісту нейтрофілів прогнозують високу ймовірність розвитку бактеріальних ускладнень грипу А (Пат. 88542 Україна, МПК G01N 33/48; G01N 33/483. Спосіб прогнозування бактеріальних ускладнень грипу, головним чином грипу А середнього ступеня тяжкості / Карімов І.З., Гордієнко А.І., Одинець Т.М.; заявник та патентовласник: Медична академія ім. С.І. Георгієвського. - № u 201310441; заявл. 27.08.13; опубл. 25.03.14, Бюл. № 6.).

45 Найбільш близьким аналогом до запропонованого є спосіб прогнозування перебігу грипу А(H1N1) pdm09 із використанням полімеразної ланцюгової реакції, за допомогою якої виявляють поліморфізм генів Mx1 G-88T, Mx1 C-123A, CD14 C-159. Методика ґрунтується на скринінговому виявленні поліморфнозмінених ділянок ДНК, присутність в геномі яких підвищує ризик розвитку пневмонії при середньотяжкому перебігу грипу та тяжкого перебігу хвороби з летальним наслідком (Бокова Н.О. Клинико-лабораторная характеристика современного течения гриппа: автореф. Дисс. на соискание ученой степени кандидата медицинских наук: 14.01.10 / Наталья Олеговна Бокова. - Москва, 2013. - 24 [1] с.

55 Основними недоліками відомого способу є те, що поліморфізми генів Mx1 G-88T, Mx1 C-123A, CD14 C-159 мають прогностичне значення лише при грипі А(H1N1) pdm09, проте розвиток тяжкого та ускладненого перебігу грипу можливий і при циркуляції інших штамів вірусів грипу; при визначенні генетичних маркерів ризику розвитку несприятливого перебігу хвороби не враховувався вплив інших факторів ризику, які мали місце в обстежених пацієнтів.

В основу корисної моделі поставлена задача створити спосіб прогнозування тяжкого та ускладненого перебігу грипу і грип-асоційованої пневмонії в осіб без загальноновизнаних факторів ризику з метою індивідуалізації лікувально-профілактичних заходів.

5 Поставлена задача вирішується створенням способу прогнозування тяжкого та ускладненого перебігу грипу і грип-асоційованої пневмонії, що включає застосування полімеразної ланцюгової реакції, в якій, згідно з корисною моделлю, проводять генотипування поліморфних локусів Arg753Gln гена TLR-2, Leu412Phe TLR-3, Asp299Gly TLR-4 і при виявленні генотипів Leu/Phe і Phe/Phe TLR-3 та їх комбінацій із Arg/Gln TLR-2 і Asp/Gly TLR-4 прогнозують тяжкий перебіг грипу з високою ймовірністю грип-асоційованої пневмонії тяжкого перебігу з розвитком поліорганної недостатності та гострого респіраторного дистрес-синдрому.

10 Запропонований спосіб здійснюють наступним чином: виділення геномної ДНК з венозної крові проводять із використанням набору "Комплект для виділення ДНК/ПНК з сироватки або плазми крові" (ООО НПФ "ЛитТех", Росія). Поліморфні ділянки Arg753Gln гена TLR-2, Asp299Gly гена TLR-4 та Leu412Phe гена TLR-3 ампліфікують за допомогою ПЛП в 25 мкл реакційної суміші, що містить: 2,5 мкл 10-х буфера для ампліфікації; 2 мМ хлориду магнію; по 0,2 мМ кожного із dNTP; 2,5 од. Таq-ДНК-полімерази; по 66 нг специфічних праймерів.

Геномну ДНК додають до реакційної суміші в кількості 20-50 нг. Ампліфікацію поліморфних ділянок проводять на ампліфікаторі "Терцик" ("НПО ДНК-Технологія", Росія) за допомогою програми ампліфікації, що включає початкову денатурацію при 95 °С впродовж 60 секунд, 35 циклів: 95° 30 секунд; відпал, специфічний для кожної пари праймерів: при температурі 64 °С для Leu412Phe гена TLR-3, при 58 °С - для Asp299Gly гена TLR-4 та при 62 °С - для Arg753Gln гена TLR-2 впродовж 60 секунд; елонгацію ланцюга при 72 °С, 60 секунд, завершує програму фінальна елонгація при 72 °С, 3 хвилини. Для поліморфної ділянки Leu412Phe гена TLR-3 отримуються три типи продуктів ампліфікації: гомозигота за алеллю 1, гетерозигота, гомозигота за алеллю 2. Для ідентифікації поліморфних ділянок гена Arg753Gln TLR-2 та Asp299Gly гена TLR-4 продукту ампліфікації піддають рестрикційному аналізу з використанням ендонуклеази рестрикції Pst I та Bsp19, відповідно (НПО "СибЭнзим", Росія).

Продукти розщеплення поліморфних ділянок генів TLR-2, TLR-4 та ампліфікаційні продукти поліморфної ділянки гена TLR-3 виявляють за допомогою горизонтального електрофорезу в 30 3 % агарозному гелі в 1 x TBE буфері, що містить 50 мМ трис-Н₃В₃О₃ та 2 мМ ЕДТА, рН 8.0 протягом 2 год. при напрузі 2V на 1 см гелю. Як маркер молекулярної ваги ДНК використовують рBR322/BsuRI. Гелі фарбують етидіумом бромідом із подальшою візуалізацією результатів в УФ-світлі.

35 Запропонованим способом в умовах діагностичного відділення та блока реанімації й інтенсивної терапії Полтавської обласної клінічної інфекційної лікарні було обстежено 112 хворих на грип (49 з не ускладненим перебігом та 49 з грип-асоційованою пневмонією) віком від 18 до 64 років. Діагноз грипу встановлювали на основі характерних клініко-епідеміологічних даних і результатів лабораторних методів дослідження (серологічного та молекулярно-біологічного). Хворі з грип-асоційованою пневмонією не мали загальноновизнаних факторів ризику розвитку ускладненого перебігу грипу.

40 Проведені молекулярно-генетичні дослідження виявили, що поширеність мутантного алеля 299Gly TLR-4 у хворих із неускладненим перебігом грипу та грип-асоційованими пневмоніями в 3,8-4,3 разу (6,3 % і 7,1 % відповідно) перевищує показники популяційного контролю (1,7 %, p<0,05). Мутантний алель 412Phe TLR-3 достовірно частіше зустрічався у хворих на грип-асоційовану пневмонію (42,9 %), порівняно з неускладненим перебігом грипу (24,6 %, p<0,01) та здоровими (30,0 %, p<0,05).

45 За показником відношення шансів встановлено, що маркерами підвищеного ризику розвитку грипу є генотип Asp/Gly TLR-4 (OR=4,22; 95 % CI 1,07-16,59) та комбінації мутантних генотипів TLR-2, TLR-3, TLR-4 (OR=15,0; 95 % CI 1,83-286,93); грип-асоційованої пневмонії генотип Phe/Phe TLR-3 (OR=4,5; 95 % CI 1,15-17,65).

50 За результатами клініко-лабораторного обстеження хворих на грип з'ясовано, що в осіб із поліморфнозміненими генотипами TLR-3 та комбінаціями поліморфізму в генах TLR-2, TLR-3, TLR-4 вірогідно довше тривають основні клінічні симптоми (температура, головний біль, ломота в тілі, біль в горлі, загальна слабкість), переважає середньотяжкий (54,4 % і 42,9 % відповідно) та тяжкий (36,4 %, p<0,04 і 57,1 %, p<0,02 відповідно) перебіг хвороби з високою частотою розвитку грип-асоційованої пневмонії (54,2 %, p<0,03 і 50,0 % p<0,05 відповідно), порівняно з хворими з нормальним розподілом алелей TLR. При аналізі клінічних характеристик грип-асоційованих пневмоній встановлено, що первинна вірусна пневмонія розвивається винятково у носіїв поліморфнозмінених генотипів TLR-3 (Leu/Phe-44,4 %, OR=18,91, Phe/Phe-100,0 %, 60 OR=49,3) та їхніх комбінацій з Asp/Gly TLR-4 та Arg/Gln TLR-2 (42,8 %, OR=22,55) і

характеризується: раннім розвитком (на 1-3 добу), переважанням двобічного (63,1 %), багаточасткового (47,4 %) ураження легень, тяжким перебігом (63,1 %) із тривалою кисневою залежністю, розвитком гострого респіраторного дистрес-синдрому (36,8 %) та поліорганної недостатності (42,1 %), високою летальністю (21,0 %). Вторинна вірусно-бактеріальна грип-асоційована пневмонія в осіб із генотипом Leu/Phe TLR-3 та комбінаціями поліморфнозмінених генотипів TLR-2, TLR-3, TLR-4 характеризується переважно тяжким перебігом (55,6 %, $p < 0,05$ і 50,0 %, $p < 0,05$ відповідно) із двобічним ураженням легень (55,6 %, $p < 0,05$ і 75,0 %, $p < 0,05$ відповідно).

Таким чином, особи із поліморфнозміненими генотипами TLR-3 та їх поєднаннями з Arg/Gln TLR-2 і Asp/Gly TLR-4 складають групу ризику тяжкого та ускладненого перебігу грипу і грип-асоційованої пневмонії й потребують індивідуалізації лікувально-діагностичної тактики: призначення протівірусних препаратів із першого дня хвороби, обов'язкової госпіталізації для динамічного спостереження, рентгенографії органів грудної клітки на першому тижні у зв'язку з високим ризиком розвитку вірусної пневмонії.

Позитивним ефектом запропонованого способу є прогнозування тяжкого та ускладненого перебігу грипу і грип-асоційованої пневмонії, що дозволяє своєчасно провести профілактику цих ускладнень у даної категорії осіб.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб прогнозування тяжкого та ускладненого перебігу грипу і грип-асоційованої пневмонії, що включає застосування полімеразної ланцюгової реакції, який **відрізняється** тим, що проводять генотипування поліморфних локусів Arg753Gln гена TLR-2, Leu412Phe TLR-3, Asp299Gly TLR-4, і при виявленні генотипів Leu/Phe і Phe/Phe TLR-3 та їх комбінацій із Arg/Gln TLR-2 і Asp/Gly TLR-4 прогнозують тяжкий перебіг грипу з високою ймовірністю грип-асоційованої пневмонії тяжкого перебігу з розвитком поліорганної недостатності та гострого респіраторного дистрес-синдрому.

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

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