



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2011108163/15, 02.03.2011

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
02.03.2011

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 02.03.2011

(45) Опубликовано: 10.06.2012 Бюл. № 16

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU 94020017 A1, 20.05.1996. PAUL M.E.

Diagnosis of immunodeficiency: clinical clues and
diagnostic tests. Current Allergy and Asthma
Reports. 2002 Sep; 2(5): 349-55.

AmpliSens® EBV/CMV/HHV6-screen-FRT PCR
kit. AmpliSens®, Cat. No.: R-V48(RG, iQ, Mx)-
CE. 13.10.2010-07.12.2010 [Найдено 22.11.2011]
[он-лайн], Найдено из (см. прод.)

Адрес для переписки:

614045, г.Пермь, ул. Орджоникидзе, 82,
ФБУН "ФНЦ медико-профилактических
технологий управления рисками здоровью
населения", директору Н.В.Зайцевой

(72) Автор(ы):

Зайцева Нина Владимировна (RU),
Долгих Олег Владимирович (RU),
Кривцов Александр Владимирович (RU),
Дианова Дина Гумаровна (RU),
Лыхина Татьяна Станиславовна (RU),
Ланин Дмитрий Владимирович (RU),
Гугович Алеся Михайловна (RU),
Харахорина Регина Атласовна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное бюджетное учреждение науки
"Федеральный научный центр медико-
профилактических технологий управления
рисками здоровью населения"(ФБУН "ФНЦ
медико-профилактических технологий
управления рисками здоровью населения")
(RU)

(54) СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ ВТОРИЧНЫХ ИММУНОДЕФИЦИТНЫХ СОСТОЯНИЙ
ЧЕЛОВЕКА, СВЯЗАННЫХ С ХИМИЧЕСКИМ КОНТАМИНАНТОМ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области
медицины. Предложен способ диагностики
вторичных иммунодефицитных состояний
человека, связанных с химическим
контаминантом. Отбирают пробы
биологического материала из ротоглотки или
из полости носа, осуществляют выделение
ДНК, проводят ПЦР с использованием
одновременно трех праймеров: LMP гена
Эпштейна-Барр (ЭБВ), MIE гена
цитомегаловируса (ЦМВ), pol гена вируса
герпеса человека 6-го типа (ВГЧ-6). В качестве
внутреннего контрольного образца (ВКО)
используют β-глобиновый ген человека. По
полученным в процессе ПЦР-амплификации
данным рассчитывают количественное

содержание в исследуемой пробе конкретной
вирусной ДНК по формуле. Для каждой
вирусной ДНК определяют индекс, в пробе
крови устанавливают количественное
содержание химического контаминанта,
техногенно значимого на территории
проживания, определяют наличие или
отсутствие превышения этого контаминанта
над его референтным значением, находят
сумму индексов ЭБВ, ЦМВ, ВГЧ-6 и при ее
значении более 1,0 и при одновременном
превышении концентрации химического
контаминанта в крови диагностируют
вторичное иммунодефицитное состояние.
Изобретение позволяет характеризовать
количественное содержание трех вирусов
герпетической группы в организме человека

одновременно и позволяет оценить иммунитет вирусной и химической нагрузок. 1
комбинированный эффект воздействия на табл., 3 пр.

(56) (продолжение):

Интернет: <URL.: http://www.pcrdiagnostics.eu/files/documents/productspdf/ebv-cmv-hhv6-screen-ftr%20_english_%20071210.pdf>. ГЛИК Б., ПАСТЕРНАК ДЖ. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. - М.: Мир, 2002, 589 с, ISBN 5-03-003328-9.

R U 2 4 5 2 9 6 3 C 1

R U 2 4 5 2 9 6 3 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)*C12Q 1/68* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2011108163/15, 02.03.2011**(24) Effective date for property rights:
02.03.2011

Priority:

(22) Date of filing: **02.03.2011**(45) Date of publication: **10.06.2012 Bull. 16**

Mail address:

**614045, g.Perm', ul. Ordzhonikidze, 82, FBUN
"FNTs mediko-profilakticheskikh tekhnologij
upravlenija riskami zdorov'ju naselenija",
direktoru N.V.Zajtsevoj**

(72) Inventor(s):

**Zajtseva Nina Vladimirovna (RU),
Dolgikh Oleg Vladimirovich (RU),
Krivtsov Aleksandr Vladimirovich (RU),
Dianova Dina Gumjarovna (RU),
Lykhina Tat'jana Stanislavovna (RU),
Lanin Dmitrij Vladimirovich (RU),
Gugovich Alesja Mikhajlovna (RU),
Kharakhorina Regina Atlasovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federal'noe bjudzhetnoe uchrezhdenie nauki
"Federal'nyj nauchnyj tsentr mediko-
profilakticheskikh tekhnologij upravlenija
riskami zdorov'ju naselenija"(FBUN "FNTs
mediko-profilakticheskikh tekhnologij
upravlenija riskami zdorov'ju naselenija") (RU)**

(54) DIAGNOSTIC TECHNIQUE FOR SECONDARY IMMUNODEFICIENT DISEASES RELATED TO CHEMICAL CONTAMINANT

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: oropharyngeal or nasal biological material is sampled to recover DNA; it is followed by the PCR with using three primers simultaneously: Epstein-Barr gene (EBV) LMP, Cytomegalovirus gene (CMV) MIE, type 6 human herpes virus gene pol (HHV-6). A human 3-globin gene is used as an internal reference sample (IRS). Data derived from the PCR amplification are used to calculate the quantitative content of specific viral DNA in the analysed sample by formula. An index is determined for each viral DNA, while the blood sample is analysed for the quantitative content of a chemical

contaminant technogenically significant in the territory; it is followed by stating the presence or the absence of the contaminant exceeding its reference value; total value of EBV, CMV, HHV-6 indexes is calculated, and if its value exceeds 1.0 and the blood chemical contaminant concentration is simultaneously increased, a secondary immunodeficient disease is diagnosed.

EFFECT: invention enables characterising the quantitative content of three viruses of a herpetic group in a human body simultaneously and assessing the combined effect of viral and chemical loads on the immunity.

1 tbl, 3 ex

Изобретение относится к технике лабораторных исследований, в частности к способам проведения иммунологического анализа, и может быть использовано в клинической иммунологии для определения количества вирусов герпетической группы, благодаря чему у пациента диагностируют наличие вторичного
5 иммунодефицитного состояния, вызванного конкретным химическим соединением, обусловленным техногенной средой обитания (например, хлороформом, свинцом и т.п.).

Проблема иммуноопосредованных нарушений здоровья является актуальной для
10 всех регионов России, где население проживает и/или постоянно работает в условиях экспозиции химическими веществами, обладающими специфическим в отношении иммунной системы или политропным повреждающим действием на организм.

Для задач оценки степени воздействия среды обитания на здоровье, ранней
15 диагностики нарушений здоровья, а также для оценки эффективности профилактики и лечения, актуальным является выделение маркерных показателей изменения иммунного статуса человека, которые могут использовать в качестве индикаторов нарушения гомеостаза и в качестве дополнительных диагностических критериев санитарно-эпидемиологической обстановки.

В настоящее время большинство способов диагностики иммунодефицитного
20 состояния основано на использовании в качестве маркеров показателей крови. Например, известен способ прогнозирования иммунодефицитного состояния (далее ИДС) у детей на первом году жизни (патент РФ №2121684) по исследованию пуповинной крови, согласно которому определяют относительное содержание Т-
25 лимфоцитов, нейтрофилов с рецепторами к C_3 компоненту комплемента и спонтанную НСТ-активность и при их значениях Е-РОЛ менее 19%, ЕАС-РОН менее 15%, НСТ менее 19% прогнозируется развитие ИДС.

Также известен способ диагностирования ИДС (патент РФ №2179316) по
30 проведению оценки как процентного содержания Т-клеток в периферической крови относительно региональной нормы, так и иммунореактивности клеток в нагрузочном тесте розеткообразования *in vitro* с Т-активином и определение показателя относительного содержания Т-клеток (ПОТ) и показателя реактивности Т-клеток (ПРТ).

Однако указанные известные способы не обеспечивают достаточную точность при
35 установлении ИДС человека, проживающего в условиях воздействия химических токсикантов, обусловленных средой обитания, т.к. анализируемые в качестве критериев иммунодефицитного состояния выборочные показатели клеточного
40 иммунитета не могут отражать всю совокупность факторов и механизмов иммунного ответа, препятствующих ИДС (например, в вышеуказанном способе никак не учитывается регуляторная роль цитокинов - интерлейкинов и интерферонов), т.е. нет суммирующего критерия, которым должен выступать факт присутствия или
45 отсутствия вируса (вирусов), что и является отражением выраженности дефекта иммунной системы.

А кроме того, указанными известными способами не учитывается вклад химической техногенной контаминации в формирование иммунодефицитных состояний.

Еще известен способ оценки влияния химических токсикантов на состояние
50 иммунного статуса человека (патент РФ №2180116), согласно которому устанавливают в пробе венозной крови содержание токсиканта, обусловленного экологической средой обитания населения, выделяют из пробы лимфоциты

(моноклеарные клетки) и добавляют к ним установленный токсикант в концентрации, соответствующей норме, полученную смесь инкубируют при температуре, соответствующей нормальной температуре организма человека, далее методом иммунологического анализа устанавливают в пробе количество лимфоцитов, содержащих дифференцировочные антигены, обусловленных воздействием токсиканта, и при снижении количества соответствующих кластеров лимфоцитов в пробе под воздействием токсиканта не менее чем в 1,5 раза по сравнению с контрольной пробой без введенного в нее дополнительно токсиканта, при одновременном обнаружении токсиканта в пробе крови в концентрации, превышающей норму, судят об ухудшении состояния иммунитета. Способ повышает точность и достоверность установления оценки влияния химического токсиканта на состояние иммунного статуса индивида.

Однако и этот способ не лишен недостатков, т.к. не позволяет оценить комбинированный эффект вирусной и химической техногенной контаминации, поскольку не предполагает количественный и качественный анализ вирусоносительства, сопряженного с вторичным иммунодефицитом.

Из уровня техники также известен способ прогнозирования течения ВИЧ-инфекции (патент РФ по заявке №94020017), согласно которому у больного, инфицированного ВИЧ, берут кровь, отделяют лимфоцитарную фракцию, проводят тотальное выделение ДНК лимфоцитов и выявляют вирусные агенты из группы Herpesviridae (ЭБВ, ВПГ, ЦМВ, ВГЧ-6). При наличии двух и более вирусов прогнозируют тяжелое течение заболевания и определяют характер превентивной терапии. В известном способе показано, что степень иммунодефицита (стадия ВИЧ-инфекции) зависит от наличия оппортунистических вирусов в лимфоцитах крови пациента. ВИЧ-инфекция, как и иммунодефициты, вызванные другими наследственными причинами, является вторичным (приобретенным) иммунодефицитом. При этом ведущую роль в развитии симптомов иммунодефицита играют вирусы, которые в норме контролируются клеточными механизмами защиты. Выход вирусов из под контроля определяется их персистенцией в клетках организма (лимфоциты, нервные и эпителиальные клетки).

Недостатком известного способа является то, что он является инвазивным, недостаточно специфичным, т.к. не предполагает количественное определение вирусов герпетической группы, а также недостаточно чувствительным, т.к. оценивается наличие только одного или двух вирусов в лимфоцитах крови.

Технический результат, достигаемый предлагаемым изобретением, заключается в обеспечении высокой точности определения вторичных иммунодефицитных состояний пациента за счет комплексного использования при интерпретации результатов наряду с количественными показателями вирусов герпетической группы и показателей содержания химического контаминанта - токсиканта.

Указанный технический результат достигается предлагаемым способом диагностики вторичных иммунодефицитных состояний человека, связанных с химическим контаминантом, согласно которому отбирают пробы биологического материала из ротоглотки или из полости носа, осуществляют выделение из указанной пробы дезоксирибонуклеиновой кислоты ДНК, далее на детектирующем амплификаторе проводят полимеразную цепную реакцию ПЦР с использованием одновременно трех праймеров: LMP гена Эпштейна-Барр ЭБВ, MIE гена цитомегаловируса ЦМВ, pol гена вируса герпеса человека 6-го типа ВГЧ-6, и с использованием в качестве внутреннего стандарта контрольного образца ВКО β-

глобинового гена человека, при этом в качестве реакционной смеси при амплификации используют смесь всех вышеуказанных праймеров с введенной в нее смесью нуклеотидов, буфера и TaqF-полимеразы, далее по полученным в процессе выполнения ПЦР-амплификации данным, а также используя стандартные образцы, содержащие вирусные ДНК: ЭБВ, ЦМВ и ВГЧ-6, рассчитывают количественное содержание в исследуемой пробе конкретной вирусной ДНК по формуле:

$$C_{об\ i} = C_{i\ K+} \cdot (1 + E)^{(N_{i\ K+} - N_{i\ об}) - (N_{ВКОК+} - N_{ВКОоб})}, \text{ где}$$

i - конкретная вирусная ДНК: ЭБВ или ЦМВ или ВГЧ-6;

$C_{об\ i}$ - концентрация конкретной вирусной ДНК в исследуемой пробе, ГЭ/мл;

$C_{i\ K+}$ - концентрация конкретной вирусной ДНК (ГЭ/мл) в положительном контрольном образце;

$N_{i\ K+}$ - пороговый цикл реакции амплификации вирусной ДНК в положительном контрольном образце;

$N_{i\ об}$ - пороговый цикл реакции амплификации вирусной ДНК в исследуемом образце;

$N_{ВКОК+}$ - пороговый цикл реакции амплификации ДНК неконкурентного внутреннего контрольного образца в положительном контроле;

$N_{ВКОоб}$ - пороговый цикл реакции амплификации ДНК неконкурентного внутреннего контрольного образца в исследуемой пробе;

далее для каждой вирусной ДНК, содержащейся в исследуемой пробе, по соотношению $C_{об\ i}/C_{i\ K+}$ определяют индекс, затем в пробе крови устанавливают количественное содержание химического контаминанта, техногенно значимого на территории проживания и обусловленного экологической средой обитания, определяют наличие или отсутствие превышения этого контаминанта в пробе крови над его референтным значением, затем находят сумму индексов трех вирусных ДНК: ЭБВ, ЦМВ, ВГЧ-6, и при ее значении более 1,0 и при одновременном превышении концентрации химического контаминанта в крови по сравнению с его референтным значением, диагностируют вторичное иммунодефицитное состояние.

Указанный технический результат достигается за счет следующего.

Благодаря использованию в качестве исследуемого материала пробы биологического материала из ротоглотки или из полости носа обеспечивается простота и надежность исследований, а также получение нужной информативности.

Использование в качестве информативного критерия вирусных ДНК, а именно: ЭБВ, ЦМВ и ВГЧ-6, обусловлено тем, что присутствие в биологических средах вышеперечисленных вирусов ассоциировано с вторичными иммунодефицитными состояниями и их идентификация является комплексным критерием несостоятельности иммунной системы, причем всех ее компартментов - и клеточных, и гуморальных.

Использование для их определения полимеразной цепной реакции (далее ПЦР), осуществляемой с помощью детектирующего амплификатора, обеспечивает точность и специфичность диагностики, поскольку предполагает четкую идентификацию последовательности нуклеотидов ДНК детектируемых вирусов.

Количественное определение вирусных ДНК (вирусов герпетической группы) в пробе, а затем установление соответствующего каждому конкретному вирусу индекса для облегчения интерпретации полученных результатов, позволяет не только идентифицировать качественные и количественные характеристики конкретного вирусного агента, но и установить долевого вклад каждого из них в формирование вторичного иммунодефицитного состояния.

Использование для окончательной диагностики вторичных иммунодефицитных

состояний человека еще и концентрации химического токсиканта (химического контаминанта), обусловленного техногенной нагрузкой среды обитания и присутствующего в крови обследуемого пациента, позволяет оценить совокупный негативный эффект совместного воздействия биологических и химических факторов на состояние вторичного иммунного статуса, так как химическая контаминация служит адъювантным, сенсibiliзирующим фактором, усиливающим и усугубляющим супрессорную активность ДНК-вирусов. Установление содержания химического контаминанта именно в крови обусловлено тем, что кровь является самой гомеостатичной средой (управляемость и регулируемость концентраций составляющих ее компонентов) и единственной, имеющей реферируемые константы в отношении техногенных химических веществ.

Кроме того, как показали наши исследования, точность предлагаемого способа обеспечивается и тем, что диагностику вторичного иммунодефицита, связанного с воздействием вирусов и экологической обстановки, признают достоверной лишь в том случае, если сумма индексов трех вирусных ДНК в пробе превышает величину 1,0 при одновременном превышении содержания химического контаминанта в крови по сравнению с референтной концентрацией.

Предлагаемый способ реализуется следующим образом.

1. Выбирают территорию экологического риска, характеризующуюся наличием химических токсикантов, обусловленных экологической средой обитания.

2. Производят отбор пробы у обследуемого человека в виде следующего материала: мазки из ротоглотки или мазки из полости носа. При этом мазки из ротоглотки забирают сухими стерильными зондами с ватными тампонами вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки после предварительного полоскания полости рта водой. Мазки из полости носа забирают сухими стерильными зондами с ватными тампонами вращательными движениями со слизистой оболочки нижней носовой раковины.

После забора материала тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) помещают в стерильную пробирку типа «Эппендорф» с 500 мкл транспортной среды (стерильный 0,9%-ный раствор NaCl). Конец зонда отламывают или отрезают, с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть крышку пробирки. Пробирку с транспортной средой и рабочей частью зонда закрывают.

3. Далее производят выделение ДНК из пробы. Для этого пробы в количестве 100 мкл лизируют 300 мкл лизирующего раствора, представляющего собой 0,5%-ный раствор саркозила и протеиназы К (20 мг/мл) в ацетатном буфере (pH 7,5). Затем добавляют сорбент (каолин) и последовательными процедурами промывки отмывают фосфатно-солевым буфером (pH 7,2) пробы от белков и смесью изопропиловый спирт: ацетон от липидов. Нуклеиновые кислоты остаются при этом на сорбенте. Далее адсорбированные на сорбенте ДНК из пробы экстрагируют ТЕ-буфером, представляющим собой смесь 10 mM трис-HCl и 1 mM ЭДТА (pH 8,0). Экстракт подвергают центрифугированию. После центрифугирования пробирки надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК.

4. Полученный материал готов к постановке ПЦР (полимеразная цепная реакция). Полимеразную цепную реакцию проводят на детектирующем амплификаторе с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» с использованием набора «АмплиСенс EBV/CMV/HHV-6-скрин-FL» производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, в котором в качестве праймеров используются участки ДНК LMP-гена ЭБВ (вируса Эпштейна-Барр), MIE-гена ЦМВ

(цитомегаловируса человека), ρol гена ВГЧ-6 (вируса герпеса человека 6 типа). При этом в качестве внутреннего стандарта контрольного образца (ВКО) используют β -глобиновый ген человека.

5 Полимеразную цепную реакцию проводят в два этапа: подготовка реакционной смеси и последующая реакция амплификации. При этом для подготовки реакционной смеси проводят смешивание в пробирке всех вышеуказанных праймеров, а также - β -глобиновый ген человека с последующим добавлением к ним смеси нуклеотидов (дезоксинуклеозидтрифосфаты: по 10 мМ дАТФ, дТТФ, дГТФ, дЦТФ), буфера (100
10 мМ трис-HCl-буфера, 500 мМ KCl, 40 мМ MgCl_2), Tag F-полимеразы. Далее добавляют к смеси выделенную из пробы ДНК в количестве 10 мкл. Таким образом, общий объем реакционной смеси составляет 25 мкл. Пробка пробирки плотно закрывается и устанавливается в амплификатор. Амплификацию и детекцию проводят на
15 детектирующем амплификаторе GFX96 фирмы Bio-Rad в соответствии с универсальной программой. Она включает в себя несколько этапов: 1 этап - активация TaqF-полимеразы (режим «горячего старта») продолжается 15 мин при 95°C ; 2 этап - установочные циклы амплификации без измерения флуоресценции (5 циклов); 3 этап - рабочие циклы амплификации с измерением флуоресценции (40
20 циклов).

Каждый цикл амплификации включает в себя денатурацию ДНК (5 с при 95°C), отжиг праймеров (20 с при 60°C) и саму реакцию полимеризации ДНК (15 с при 72°C).

Регистрация сигнала флуоресценции, возникающего при накоплении продуктов амплификации участков ДНК, проводится в режиме «реального времени» после
25 стадии отжига праймеров для ЭБВ - по каналу HEX, ЦМВ - по каналу ROX, ВГЧ-6 - по каналу Cy5, ВКО - по каналу FAM.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на заданном уровне пороговой линией, что
30 соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла (N) в соответствующей графе в таблице результатов, отображаемой в программном обеспечении для амплификатора CFX96.

Для количественной оценки результатов используются стандартные образцы, содержащие вирусные ДНК: ЭБВ, ЦМВ и ВГЧ-6 в концентрации 10^3 ГЭ/мл и ДНК
35 человека (внутренний контрольный образец ВКО) с учетом его содержания в 10^5 эпителиальных клеток плоского неороговевающего или ресничного эпителия на единицу объема. Конечные концентрации вирусных ДНК составили 10^3 ГЭ/ 10^5 эпителиальных клеток. Такая концентрация обозначалась как $3,0 \lg/10^5$
40 эпителиальных клеток.

6. Количественное содержание в исследуемой пробе конкретной вирусной ДНК рассчитывается по формуле:

$$C_{\text{об}i} = C_{\text{ик}+} \cdot (1 + E)^{(N_{\text{ик}+} - N_{\text{ioб}}) - (N_{\text{ВКОк}+} - N_{\text{ВКОоб}})}, \text{ где}$$

45 i - конкретная вирусная ДНК: ЭБВ, или ЦМВ, или ВГЧ-6;

$C_{\text{об}i}$ - концентрация конкретной вирусной ДНК в исследуемой пробе, ГЭ/мл;

$C_{\text{ик}+}$ - концентрация конкретной вирусной ДНК (ГЭ/мл) в положительном контрольном образце;

50 $N_{\text{ик}+}$ - пороговый цикл реакции амплификации вирусной ДНК в положительном контрольном образце;

$N_{\text{ioб}}$ - пороговый цикл реакции амплификации вирусной ДНК в исследуемом образце;

$N_{\text{ВКОк}+}$ - пороговый цикл реакции амплификации ДНК неконкурентного

внутреннего контрольного образца в положительном контроле;

$N_{ВКОоб}$ - пороговый цикл реакции амплификации ДНК неконкурентного внутреннего контрольного образца в исследуемой пробе.

E - экспонента.

Для каждой конкретной вирусной ДНК, содержащейся в исследуемой пробе, по соотношению $C_{обi}/C_{iK+}$ определяют индекс.

Пример расчета индекса: например, во внутреннем стандартном образце (ВКО) концентрация вирусной ДНК - 10^3 ГЭ/мл, пороговый цикл на котором проявилась эта матрица - 18, а в исследуемом образце такая же вирусная ДНК - на 16 цикле, при этом ВКО проявился на 22 и на 20 цикле соответственно. Тогда концентрация конкретной вирусной ДНК в исследуемой пробе составит:

$$C_{обi} = 10^3 \cdot (1 + E)^{(18-16)-(22-20)} = 10^3 (1 + E)^0 = 10^3$$

ГЭ/мл, а индекс $C_{обi}/C_{iK+}$ будет равняться 1,0.

7. Для установления иммунодефицитного состояния человека, проживающего на экологически неблагополучной территории в условиях техногенной контаминации, необходимо учесть и фактор содержания химического контаминанта в крови, т.к. он обязательно будет оказывать влияние на иммунный статус человека. Для этого в пробе крови устанавливают количественное содержание химического контаминанта - токсиканта, обусловленного экологической средой обитания. При этом определение вредных веществ в крови проводят по МУК 4.1.2102-4.1.2116-06 «Определение вредных веществ в биологических средах» (Москва, 2008) и по МУК 4.1.763-4.1.779-99 «Определение химических соединений в биологических средах» (Москва, 2000). Определяют имеется ли превышение концентрации этого контаминанта в пробе крови пациента над его референтным уровнем.

8. Затем находят сумму $I_{сум}$ индексов трех вирусных ДНК, присутствующих в пробе биологического материала из ротоглотки или из полости носа:

$$I_{сум} = \frac{C_{обЭБВ}}{C_{K+ЭБВ}} + \frac{C_{обЦМВ}}{C_{K+ЦМВ}} + \frac{C_{обВГЧ-6}}{C_{K+ВГЧ-6}}$$

и при значении этой суммы $I_{сум}$ более 1,0 и при одновременном превышении концентрации контаминанта в крови над его референтным уровнем диагностируют вторичное иммунодефицитное состояние.

Примеры конкретного осуществления предлагаемого способа. Предлагаемый способ был испытан в клинических условиях. В процессе испытаний были обследованы 9 пациентов, проживающих на территории экологического неблагополучия с наличием техногенно значимого вещества - хлороформа, свинца и дихлорэтана. Данные, полученные в ходе испытаний, приведены в таблице.

Приведем три примера, характеризующих пациентов с вторичным иммунодефицитом, пациентов без иммунодефицита и пациентов, у которых наличие иммунодефицита удалось доказать с помощью предлагаемого способа.

Пример 1 (№1 таблицы). У пациента И. (история болезни №124), 5 лет, в мазке из ротоглотки выявили содержание ЭБВ - 2,4 Ig/мл, ЦМВ - 1,2 Ig/мл, ВГЧ-6 - 3,8 Ig/мл. При иммунофенотипировании клеток крови у него выявили содержание $CD4^+$ -лимфоцитов 24% (норма 30-50%); абсолютное содержание $0,478 \cdot 10^9$ /л (норма $0,4 \cdot 1,5 \cdot 10^9$ /л). При химико-аналитических исследованиях в крови у пациента было выявлено: превышение содержания химического контаминанта - хлороформа, в 5,7 раза от референтного уровня. При осмотре у пациента: состояние удовлетворительное, гиперемия небных дужек и миндалин, печень на 3 см ниже края

реберной дуги, при пальпации слегка болезненно. Увеличение нижнечелюстных и околоушных лимфатических узлов. Температура тела 37°C. Обследование органов дыхания и сердечно-сосудистой системы без особенностей. Был поставлен диагноз: сезонный аллергический ринит, обострение. Хроническая инфекция, вызванная вирусами Эпштейн-Барр, вирусом герпеса человека 6 типа и цитомегаловирусом. Вторичное иммунодефицитное состояние, стадия декомпенсации.

При расчете суммарного индекса были вычислены соотношения $C_{об}/C_{К+}$ для ЭБВ, ЦМВ и ВГЧ-6. Они составили 0,8, 0,4 и 1,27 соответственно, таким образом, суммарный индекс равен 2,47, что превышает установленное значение (1,0), и состояние пациента можно рассматривать как иммунодефицитное, что также было доказано данными иммунофенотипирования и химико-аналитических исследований и объективными данными клинического обследования.

Пример 2 (№9 таблицы): Пациент Д. (история болезни №158), 2 года. Находился на стационарном лечении с диагнозом: билиарная дисфункция по гиперкинетическому типу. При взятии мазка из ротоглотки и носа в нем не обнаружено вирусов герпетической группы. При проведении иммунофенотипирования содержание $CD4^+$ 48% (норма 30-50%), абсолютное содержание $1,286 \cdot 10^9/\text{л}$ (норма 0,4-1,510%). При химико-аналитических исследованиях не выявлено превышения содержания хлороформа от референтного уровня. При осмотре у пациента: состояние удовлетворительное, кожные покровы и слизистые оболочки физиологической окраски, при пальпации живот мягкий безболезненный, печень по краю реберной дуги, край ровный, мягкий. Температура тела 36,5°C. Органы дыхания и сердечно-сосудистой системы при обследовании без особенностей. Регионарные лимфоузлы не увеличены, мягкие, безболезненные.

При расчете суммарного индекса его значение было равно нулю. Таким образом, иммунологическое состояние пациента можно рассматривать как нормальное без признаков вторичного иммунодефицита, что подтверждается клиническими данными и данными лабораторных исследований.

Пример 3 (№7 таблицы): Пациент Е., 15 лет, история болезни №128. Предъявляет жалобы на частые инфекционные заболевания по типу ОРЗ, заложенность носа. При клиническом обследовании: состояние удовлетворительное. Кожные покровы и слизистые физиологической окраски. Живот мягкий безболезненный, печень на 1 см ниже края реберной дуги, край плотный, ровный. Температура тела 36,6°C. Дыхание через нос нарушено. В легких дыхание ритмичное, везикулярное. Органы сердечно-сосудистой системы без особенностей. При исследовании мазка из ротоглотки выявлено содержание ЭБВ 1,7 Ig/мл, ЦМВ 3,0 Ig/мл, ВГЧ-6 - не выявлено. В иммунограмме содержание $CD4^+$ 32% (норма 30-50%), абсолютное содержание $0,705 \cdot 10^9/\text{л}$ (норма 0,4-1,5 $\cdot 10^9/\text{л}$). В крови выявлены антитела Ig G к вирусу ЭБВ в количестве 35 у.е./мл и ЦМВ - в титре 1:3200. При химико-аналитическом исследовании содержание хлороформа в крови превысило референтный уровень в 1,8 раза.

Таким образом, суммарный индекс складывается из соотношений $C_{об}/C_{К+}$ для ЭБВ и ЦМВ и составляет 1,57 (0,57+1,0, соответственно), его значение превышает 1,0, значит по предлагаемому способу можно оценить состояние пациента как иммунодефицитное. Данные лабораторных исследований частично подтверждают наше предположение. При дополнительном исследовании пациенту был поставлен диагноз: Хроническая инфекция ЭБВ, стадия ремиссии; Хроническая цитомегаловирусная инфекция, стадия обострения. Вторичное иммунодефицитное

состояние, стадия компенсации.

Предлагаемый способ позволяет благодаря использованию суммарного индекса, характеризующего количественное содержание вирусов герпетической группы на
слизистых оболочках, а также наличие в крови химического токсиканта в результате
техногенной контаминации, проводить идентификацию вторичного
иммунодефицитного состояния пациента, а введение критерия 1,0 при оценке
превышения суммарного индекса позволяет не только определять количественное
содержание вирусов герпетической группы, но и качественно характеризовать
состояние пациента, как состояние вторичного иммунодефицита.

Для доказательства того, что предлагаемый способ является точным и
достоверным, было проведено углубленное иммунологическое обследование
пациентов под номерами 7 и 8 таблицы. Этим пациентам была выполнена
иммунограмма, в результате чего было выявлено вторичное иммунодефицитное
состояние. Наличие у пациентов диагноза «вторичное иммунодефицитное состояние»
соотносится с известными сведениями о преимущественном негативном воздействии
хлороформа (химический контаминант на территории проживания конкретных
пациентов) на здоровье.

Предлагаемый способ имеет следующие преимущества перед известными:

- позволяет характеризовать количественное содержание трех вирусов герпетической группы в организме человека одновременно. Это вирус Эпштейн-Барр, цитомегаловирус и вирус герпеса человека 6 типа, которые относятся к вирусам, инфицирующим лимфоциты человека и нарушающим их нормальное функционирование;
- установление индекса контаминации (суммационного индекса) герпетических вирусов позволяет оценить состояние иммунной системы как вторичное иммунодефицитное по отношению к противовирусному иммунитету человека без проведения традиционных дорогостоящих методов исследования (иммунограмма);
- установление суммационного индекса вирусной контаминации одновременно с идентификацией вредных химических соединений в крови, обусловленных экологически неблагоприятной средой обитания, позволяет оценить комбинированный эффект воздействия на иммунитет вирусной и химической нагрузок;
- способ является малотравматичным и относится к методам неинвазивной диагностики, так как позволяет проводить исследование без забора крови, не представляет риска заражения инфекциями, передающимися через кровь, что существенно расширяет диагностические возможности способа.

Таким образом, благодаря более высокой точности, достоверности и информативности, предлагаемый способ может найти широкое применение в лабораторной и клинической практике.

Таблица							
Результаты исследований пациентов предлагаемым способом, способами проточной цитофлюориметрии и химико-аналитическими							
№ пациента	Индекс I _{ЭБВ}	Индекс I _{ЦМВ}	Индекс I _{ВГЧ6}	I _{сум}	CD4 ⁺ , %	CD4 ⁺ , 10 ⁹ /л	Кратность превышения допустимого (референтного) уровня содержания химического контаминанта в крови
Пациенты с превышением референтного уровня хлороформа в крови							
1. Пациент, 5 лет Иммунодефицитное состояние	0,8	0,4	1,27	2,47	24	0,478	5,7
2. Пациент, 5 лет Атоп. дерматит	0,72	1,22	0,9	2,84	27	0,571	4,8

5	3. Пациент, 8 лет Дискинезия желче- выводящих путей	0,34	0	1,15	1,49	33	0,601	3,9
	4. Пациент, 5 лет Вегетососудистая дистония	0,62	1,21	0,97	2,80	21	0,328	10,1
	5. Пациент, 7 лет Респ. аллергоз	0,88	0	0,64	1,52	28	0,427	5,1
	6. Пациент, 0 лет Респ. аллергоз	1,27	0	0,6	1,87	30	0,505	4,3
	7. Пациент, 15 лет Иммунодефицитное состояние	0,57	1,0	0	1,57	32	0,705	1,8
10	8. Пациент, 11 лет Иммунодефицитное состояние	0,55	0,26	0,62	1,43	35	0,510	1,7
	9. Пациент, 2 года Билиарная дисфункция	0	0	0	0	48	1,286	1,0
	Пациенты с превышением референтного уровня дихлорэтана в крови							
	10. Пациент, 5 лет Вегетососудистая дистония	0,62	1,21	0,97	2,80	21	0,328	10,1
	11. Пациент, 7 лет Респ. аллергоз	0,88	0	0,64	1,52	28	0,427	5,1
20	12. Пациент, 0 лет Респ. аллергоз	1,27	0	0,6	1,87	30	0,505	4,3
	Пациенты с превышением референтного уровня свинца в крови							
	13. Пациент, 15 лет Иммунодефицитное состояние	0,57	1,0	0	1,57	32	0,705	1,8
	14. Пациент, 11 лет Иммунодефицитное состояние	0,55	0,26	0,62	1,43	35	0,510	1,7
	15. Пациент, 3 года Атопический дерматит	0,8	0,5	1,21	2,51	29	0,470	3,2

30

Формула изобретения

Способ диагностики вторичных иммунодефицитных состояний человека, связанных с химическим контаминантом, характеризующийся тем, что отбирают пробы биологического материала из ротоглотки или из полости носа, осуществляют выделение из указанной пробы дезоксирибонуклеиновой кислоты ДНК, далее на детектирующем амплификаторе проводят полимеразную цепную реакцию ПЦР с использованием одновременно трех праймеров: LMP гена Эпштейна-Барр ЭБВ, MIE гена Цитомегаловируса ЦМВ, pol гена вируса герпеса человека 6-го типа ВГЧ-6, и с использованием в качестве внутреннего стандарта контрольного образца ВКО β-глобинового гена человека, при этом в качестве реакционной смеси при амплификации используют смесь всех вышеуказанных праймеров с введенной в нее смесью нуклеотидов, буфера и TaqF-полимеразы, далее по полученным в процессе выполнения ПЦР-амплификации данным, а также используя стандартные образцы, содержащие вирусные ДНК: ЭБВ, ЦМВ и ВГЧ-6, рассчитывают количественное содержание в исследуемой пробе конкретной вирусной ДНК по формуле:

$$C_{\text{оби}} = C_{\text{ик+}} \cdot (1 + E)^{(N_{\text{ик+}} - N_{\text{об}}) - (N_{\text{ВКОк+}} - N_{\text{ВКОоб}})},$$

где i - конкретная вирусная ДНК: ЭБВ, или ЦМВ, или ВГЧ-6;

$C_{\text{оби}}$ - концентрация конкретной вирусной ДНК в исследуемой пробе, ГЭ/мл;

$C_{\text{ик+}}$ - концентрация конкретной вирусной ДНК (ГЭ/мл) в положительном контрольном образце;

N_{iK+} - пороговый цикл реакции амплификации вирусной ДНК в положительном контрольном образце;

$N_{iоб}$ - пороговый цикл реакции амплификации вирусной ДНК в исследуемом образце;

5 N_{BKOK+} - пороговый цикл реакции амплификации ДНК неконкурентного внутреннего контрольного образца в положительном контроле;

N_{BKOb} - пороговый цикл реакции амплификации ДНК неконкурентного внутреннего контрольного образца в исследуемой пробе;

10 далее для каждой вирусной ДНК, содержащейся в исследуемой пробе, по соотношению $C_{обi}/C_{iK+}$ определяют индекс, затем в пробе крови устанавливают количественное содержание химического контаминанта, техногенно значимого на территории проживания и обусловленного экологической средой обитания, определяют наличие или отсутствие превышения этого контаминанта в пробе крови над его референтным значением, затем находят сумму индексов трех вирусных ДНК:

15 ЭБВ, ЦМВ, ВГЧ-6, и при ее значении более 1,0 и при одновременном превышении концентрации химического контаминанта в крови по сравнению с его референтным значением диагностируют вторичное иммунодефицитное состояние.

20

25

30

35

40

45

50