УКРАЇНА

(19) UA (11) 132735 (13) U

(51) МПК (2019.01)
G01N 33/48 (2006.01)
G01N 21/00

МІНІСТЕРСТВО ЕКОНОМІЧНОГО РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2018 09401**

(22) Дата подання заявки: **17.09.2018**

(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **11.03.2019**

(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **11.03.2019, Бюл.№ 5**

(72) Винахідник(и):
Зубач Олена Олександрівна (UA),
Тєлєгіна Тетяна Вікторівна (UA),
Зінчук Олександр Миколайович (UA),
Семенишин Оксана Богданівна (UA)

(73) Власник(и):
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО,
вул. Пекарська, 69, м. Львів, 79010 (UA)

(54) СПОСІБ СПЕЦИФІЧНОЇ ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ ЛЕПТОСПІРОЗУ НА РАННІЙ СТАДІЇ ХВОРОБИ

(57) Реферат:

Спосіб специфічної лабораторної діагностики лептоспірозу включає лабораторне дослідження біологічного матеріалу, при цьому на ранній стадії хвороби з першого дня госпіталізації в стаціонар у сечі пацієнтів визначають наявність ДНК Leptospira interrogans методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі.

UA 132735 U

Корисна модель належить до медицини, зокрема клініки інфекційних хвороб, і може бути використана для специфічної лабораторної діагностики лептоспірозу на ранній стадії хвороби.

Лептоспіроз залишається одним із найрозповсюдженіших зоонозів як в Україні, так і в світі [Haake D, Levett P. Leptospirosis in humans. Curr Top Microbiol 2015:387:65-97]. В Україні лептоспіроз займає одне з провідних місць у групі бактеріальних зоонозів. Причому типовим є наявність як природних, так й антропургічних осередків [Куліш І.М., Корнійчук О.П., Шикула Р.Г., Постранський М.П. Особливості етологічної структури та динаміки захворюваності на лептоспіроз у Львівській області. //Практична медицина. - 2011; 6 (18):44-49]. Усереднений показник захворюваності на цю недугу на теренах нашої держави за останні 15 років (2003-2017 рр.) склав 1,01/100 тис. населення. Проте реальний рівень захворюваності на лептоспіроз як у світі, так і в Україні, насправді, є у рази вищим. У частині хворих не вдається підтвердити діагноз лептоспірозу за допомогою методів специфічної лабораторної діагностики, адже їх чутливість та специфічність не є абсолютною. Покращення специфічної діагностики лептоспірозу за допомогою застосування нових методик є одним із шляхів зменшення кількості пацієнтів із непідтвердженим лабораторно діагнозом: лептоспіроз.

Відомий спосіб специфічної лабораторної діагностики лептоспірозу - реакція мікроаглютинації (РМА) з набором еталонних культур лептоспір - є основним методом для підтвердження діагнозу лептоспірозу в Україні. Основною перевагою РМА є можливість виявлення серогрупової належності лептоспір. Проте способу притаманний цілий ряд недоліків. Відомо, що при застосуванні цього способу реакція, зазвичай, стає позитивною наприкінці першого тижня хвороби, а більш вірогідною є поява антитіл з 10-12 дня від появи перших клінічних ознак [Sofia Andalib Safiullah, Ahmed Abu Saleh, Shaila Munwar. Laboratory Methods for Diagnosing Leptospirosis: A Review // Bangladesh J. Med. Microbiol. - 2009. - № 03 (01). - P. 39-43]. Максимальною чутливість та специфічність способу стає на 3-4-му тижні хвороби, що є основним його недоліком, оскільки при такій пізній появі антитіл спосіб часто дає змогу підтвердити діагноз лише ретроспективно, вже після виписки хворого з лікарні. Окрім того, як антигени використовуються живі культури лептоспір, що несе ризики зараження для персоналу лабораторії та вимагає застосування спеціальних методик безперервного культивування високопатогенних мікроорганізмів (лептоспір). Ще одним недоліком способу є ймовірність виникнення перехресних реакцій між серогрупами лептоспір або між різними спірохетами (збудник сифілісу, Лайм-бореліозу), особливо в зразках, відібраних в гострій фазі хвороби. Отже, покращення можливостей специфічної лабораторної діагностики лептоспірозу є пріоритетним напрямком сучасної інфектології.

В основу корисної моделі поставлена задача поліпшення інформативності специфічної лабораторної діагностики лептоспірозу, що дозволить підтверджувати діагноз лептоспірозу на ранніх стадіях інфекційного процесу.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі специфічної лабораторної діагностики лептоспірозу, що включає лабораторне дослідження біологічного матеріалу, згідно з корисною моделлю, на ранній стадії хвороби з першого дня госпіталізації в стаціонар у сечі пацієнтів визначають наявність ДНК Leptospira interrogans методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі.

Переваги запропонованого способу полягають у тому, що він дає можливість верифікувати діагноз з першого дня госпіталізації в стаціонар на ранній стадії хвороби, що дозволяє вчасно призначити адекватну терапію та дає змогу попередити несприятливий перебіг хвороби і знизити летальність. Також варто зазначити, що термін виконання способу короткий та складає лише 12 годин [Васильєва Н.А. Лептоспіроз/ Н.А. Васильєва, М.А. Андрейчин. / Укрмедкнига, 2016. - 275 с.]. Окрім того, збір сечі для встановлення ПЛР - неінвазивна маніпуляція. Протягом першого тижня хвороби спосіб має високу чутливість (100 %) та специфічність (93 %) [John E. Bennett, Raphael Dolin, Martin J. Blaser. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 8th Edition. - 2015. - P. 2714-2720].

Пропонований поліпшений спосіб специфічної діагностики лептоспірозу використовують таким чином.

Починаючи з першого дня госпіталізації в стаціонар, у пацієнта з підозрою на лептоспіроз, проводиться забір ранішньої сечі з метою виявлення ДНК L. interrogans. Виділення ДНК проводять за допомогою набору "Рибо-преп 100", детекцію специфічних ДНК - методом ПЛР в реальному часі із застосуванням набору "АмлиСенс Leptospira-FL". Облік результатів ПЛР проводиться на ампліфікаторі RotorGene-6000 за допомогою оригінального програмного забезпечення. Відбір, транспортування та підготовку проб біологічного матеріалу від хворих, а також постановку реакцій проводять відповідно до діючих офіційних рекомендацій [Організація роботи лабораторій при дослідженні матеріалу, що містить біологічні патогенні агенти І-ІУ груп

патогенності молекулярно-генетичними методами: ДСанПіН 9.9.5-153-2008, затверджені наказом МОЗ України від 24.01.2008 року № 26, Київ. 2008: 1-51].

Ефективність та достовірність нового способу було підтверджено дослідженням, яке проводилось протягом 2016-2017 років у Львівській обласній інфекційній клінічній лікарні (ЛОІКЛ). За вказаний період часу із діагнозом "Лептоспіроз" в даному закладі був пролікований 31 хворий. Діагноз "Лептоспіроз" лабораторно підтверджено 26 пацієнтам, що склало 83,9 % від загальної кількості хворих, в тому числі 3 летальні випадки. При цьому за результатами тільки РМА діагноз встановлено 15 хворим (48,3 %), за результатами тільки ПЛР (виявлення ДНК патогенних Leptospira spp.) - 5 хворим (16,1 %). У 6 осіб (19,3 %) діагноз підтверджено двома методами (РМА та ПЛР). У двох пацієнтів, які померли на першому тижні хвороби, діагноз був підтверджений тільки методом ПЛР, у одного хворого, смерть, якого наступила після сьомого дня хвороби, - тільки методом РМА (1:800).

Наводимо власне клінічне спостереження пацієнта з лептоспірозом, у випадку якого діагноз був підтверджений тільки завдяки ПЛР.

Хворий Н., 30 років, лікувався стаціонарно в ЛОІКЛ у період із 25.09.2017 р. по 26.09.2017 р. Захворів за 8 днів до госпіталізації в лікарню (18.09.2017 р.), коли з'явились нудота, блювання, з 20.09.2017 р. - підвищення температури до 40 °С, з 21.09.2017 р. - біль в литкових м'язах, зниження діурезу. Звернувся вперше за медичною допомогою лише тоді, коли зауважив суттєве зменшення об'єму сечі. На наявність початкових симптомів хвороби особливої уваги не звертав. Орієнтовно за тиждень до початку хвороби рибалив та купався в одній з водойм на території України. При госпіталізації: іктеричність шкіри та слизових, склерит. Кашель з виділенням харкотиння. ЧД - 25/хв., ЧСС - 95/хв., АТ 140/100 мм рт. ст. Аускультативно в легенях ослаблене дихання, у нижніх відділах обох легень дрібно- та великопухирчаті хрипи. Тони серця приглушені. Живіт м'який, болючий при пальпації в правому підребер'ї. Печінка + 3 см. Діурез та випорожнення відсутні з 24.09.17 р. У загальному аналізі крові: еритроцити - 4×10^{12}/л, гемоглобін - 120 г/л, тромбоцити - 35×10^{9}/л, лейкоцити - $12{,}3\times10^{9}$ /л, нейтрофіли - 84 %, моноцити - 7 %, лімфоцити - 9 %, ШОЕ - 37 мм/год. У біохімічному аналізі крові: креатинін - 730 мкмоль/л; сечовина - 28,5 ммоль/л; загальний білірубін - 456,5 мкмоль/л; АлАТ - 152 ммоль×год./л; протромбіновий час - 28"; протромбіновий індекс - 53 %. На оглядовій рентгенограмі органів грудної клітки виявлені ознаки двобічної пневмонії. РМА на 8-ий день хвороби (1-й день госпіталізації): негативний результат. ПЛР сечі на 7-й день захворювання - виявлено L. interrogans. Заключний діагноз: Лептоспіроз (ПЛР сечі від 25.09.2017 L. interrogans +), тяжкий перебіг, жовтянична форма. Гостре пошкодження нирок у стадії анурії.

Тромбогеморагічний синдром. Двобічна пневмонія. Токсична енцефалопатія. ДН III. ССН III. Незважаючи на проведене лікування, враховуючи пізнє звернення хворого за медичною допомогою, смерть пацієнта настала через 29 годин після госпіталізації. У даного пацієнта результат РМА при госпіталізації виявився негативним, попри те, що забір крові був проведений на 8-й день хвороби. Враховуючи той факт, що летальне звершення хвороби наступило через 29 годин від моменту госпіталізації, повторне проведення РМА в динаміці хвороби не проводилося. Відтак, до впровадження для широкого обстеження пацієнтів із підозрою на лептоспіроз методики ПЛР у Львівській області у 2016 році, діагноз лептоспірозу не мав би специфічного підтвердження.

Використання ПЛР при дослідженні сечі у пацієнтів з підозрою на лептоспіроз показало хорошу інформативність цього методу, збільшивши кількість хворих із підтвердженим діагнозом лептоспірозу на 16,1 %. Цей метод доцільно застосовувати в комплексі з РМА. Цінність цього методу зростає на початку хвороби, коли результати РМА у більшості випадків є негативними.

Таким чином, запропонований спосіб покращення специфічної лабораторної діагностики лептоспірозу дозволяє підтвердити діагноз на ранніх стадіях хвороби, є простим та доступним для клінічної практики і може бути рекомендований для широкого використання.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб специфічної лабораторної діагностики лептоспірозу, що включає лабораторне дослідження біологічного матеріалу, який **відрізняється** тим, що на ранній стадії хвороби з першого дня госпіталізації в стаціонар у сечі пацієнтів визначають наявність ДНК Leptospira interrogans методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі.

Комп'ютерна верстка О. Гергіль

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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