



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 45129

(13) A

(51) 6 G01N33/48

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ  
НА ВІНАХІДВидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

## (54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ГЕНЕТИЧНОЇ СХИЛЬНОСТІ ДО ІНФЕКЦІЙНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ

1

2

(21) 2001053496

(22) 24 05 2001

(24) 15 03 2002

(46) 15 03 2002, Бюл. № 3, 2002 р.

(72) Незгода Ірина Іванівна, Дизик Галина Михайлівна

(73) ВІННИЦЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ МІ ПИРОГОВА

(57) 1 Спосіб визначення генетичної схильності до інфекційних захворювань за групами крові АВО, що включає моделювання реакції ізогемаглютинації і введення в реагуючу систему полісахаридної фракції мікроорганізмів з подібними до речовини групи крові цукрами, який відрізняється тим, що, крім полісахаридної фракції, в реакцію вводиться ендотоксин відповідного інфекційного збудника з

попереднім підбором його субгемолітичної дози шляхом розведення ендотоксину ізотонічним розчином натрію хлориду, а при гальмуванні реакції ізогемаглютинації на  $\geq 4$  розведення стандартної сироватки з еритроцитами відповідної групи крові досліджувану особу вважають генетично схильною до даної інфекції.

2 Спосіб за п. 1, відрізняється тим, що як джерело аглютининів використовують сироватку від інфікованої особи паралельно із стандартною сироваткою, а при гальмуванні реакції ізогемаглютинації в присутності інфекційного агента на  $\geq 4$  розведення вважають діагноз інфекційного захворювання підтвердженим.

Винахід відноситься до медицини, зокрема, до розділу "інфекційні захворювання", і може бути використаний при розробці системи генетичного консультування, диспансеризації, а також для диференційної діагностики інфекційних захворювань на ранніх етапах їх розвитку.

Прототипом технічного рівня, що пропонується, є спосіб визначення генетичної схильності до інфекційних захворювань за групами крові АВО на прикладі стафілококових інфекцій (Г. Н. Дранник, Г. М. Дизик "Генетические системы крови человека и болезни" - Киев "Здоров'я", 1990 - С. 122 - 126).

Наведене технічне рішення має ряд недоліків, а саме:

- в якості мікробних агентів у реакції ізогемаглютинації використовуються діагностичні алергени для внутрішньошкірного введення, які зміщують тільки полісахаридну фракцію мікроорганізмів. Полісахаридна фракція мікробних агентів виявляє подібність до цукрів речовини групи крові, але ніколи не викликає в організмі людини захворювання, тобто не є аналогом збудника,

- деякі збудники, наприклад сальмонела тифімуриум, мають високу вірулентність за рахунок ендотоксина, який ніколи не виділяється в культуральному середовищі при рості мікроорганізмів і мо-

же бути екстрагований трихлороцетовою кислотою. В реакції ізогемаглютинації ендотоксин викликає гемоліз, а не аглютинацію еритроцитів, тому в прототипі не використовується,

- в прототипі застосовувались стандартні алергени, виготовлені Казанським НДІЕМ, а не окремі штами мікроорганізмів, що є збудниками захворювань і отже, не несли відповідної інформації щодо генетичної схильності до конкретного збудника, його штаму і частоти виділення від хворих.

В основу винаходу "Спосіб визначення генетичної схильності до інфекційних захворювань" поставлене завдання розробити інформативний спосіб визначення генетичної схильності до інфекційних захворювань за групою крові із серологічної системи АВО.

Поставлене завдання досягається створенням моделі реакції ізогемаглютинації, при якій вводиться полісахаридна фракція мікроорганізмів, що має подібність до цукрів речовин груп крові, який відрізняється тим, що крім зазначеної фракції, в реакцію вводиться ендотоксин відповідного інфекційного збудника з попереднім підбором її субгемолітичної дози, шляхом розведення ендотоксину ізотонічним розчином натрію хлориду. Одночасне використання зазначених інгредієнтів мікроорганізмів розширює можливості і підвищує інформативність

(13) A

(11) 45129

(19) UA

способу

Ознаками, що відрізняють винахід, є

- використання ендотоксину, наприклад сальмонели тифімуриум, як головного чинника захворювання, виділеного від хворого на важку гастроінтестинальну форму сальмонельозу, тобто саме того штаму, який став причиною інфекційного захворювання, а не лабораторного, музейного штаму,

- визначається генетична схильність під час епідемії, що дає змогу вводити карантин в закритих дитячих колективах, проводити диспансеризацію і виділяти групи підвищеного ризику розвитку даного інфекційного захворювання, брати їх під профілактичний нагляд і тим переривати поширення епідемії - спосіб дає можливість у ранній період захворювання проводити диференційну діагностику і застосовувати інтенсивну тактику лікування ще до отримання результатів бакпосіву

Спосіб здійснюється таким чином

1 етап - приготування 5% зависі відмитих еритроцитів,

2 етап - приготування і титрування антисироватки

При аглютинації еритроцитів групи O(I) використовують лектин Vlex Euporeus фірми Фрезенус, оскільки еритроцити цієї групи не аглютинуються сироватками крові групи A і B. При аглютинації еритроцитів групи A використовується стандартна сироватка групи B. При аглютинації еритроцитів групи B використовується стандартна сироватка групи A. При аглютинації еритроцитів групи AB використовується будь-яка сироватка із зазначених груп.

Кожну сироватку і лектин розводили фізіологічним розчином в пропорції 1:2 до 1:1024. Для цього в пробірку № 1 вносили 0,3 мл фізрозчину та 0,3 мл ізосироватки, після перемішування із цієї пробірки переносили 0,3 мл суміші у наступну пробірку і т.д. до пробірки № 10, з якої після перемішування реагентів видаляли 0,3 мл.

3 етап - введення в реакцію мікробного агента

Мікробні агенти були представлені у вигляді термостабільного фільтрату 5-денної культури бактерій: протей, синьогнійної палички, кишкової палички, сальмонели тифімуриум + ендотоксин в субгемолітичній концентрації цих же мікроорганізмів. Мікробний агент по 0,3 мл добавляли в кожную пробірку титрованої ізосироватки. Паралельно в контрольний ряд пробірок з тією ж ізосироваткою замість мікробного агента добавляли 0,3 мл фізрозчину. Після добавлення мікробного агента суміш інкубували 30 хв при кімнатній температурі.

4 етап - введення в суміш 0,1 мл 5% зависі еритроцитів та облік реакції

Суть винаходу характеризується конкретними прикладами

1. Дослідження подібності антигенної структури мікроорганізмів та речовин груп крові проведено на матеріалі 18 зразків крові та 4 видів культури мікроорганізмів: сальмонели тифімуриум, протей мірабіліс, цитробактерної та кишкової палички. Результати реакції ізогемаглютинації еритроцитів груп крові в присутності зазначених мікробних агентів наведено в таблицях 1 - 4.

На таблиці 1 показано гальмування природного перебігу реакції ізогемаглютинації еритроцитів O(I) групи крові в присутності мікробних компонентів сальмонели тифімуриум, а на табл. 2 - гальмування ізогемаглютинації еритроцитів A(II) в присутності антигенів протей мірабіліс.

Гальмування природної реакції можливе лише у випадку поєднання тест-сироватки не з відповідними детермінантами на мембрані еритроцитів, а з аналогічними молекулярними структурами мікробних агентів. З цього випливає, що сальмонела тифімуриум має в своєму складі таку речовину, що і еритроцити групи O(I), тобто "H" - речовину, оскільки в якості антиреагента використовується лектин анти-H.

У випадку гальмування реакції ізогемаглютинації еритроцитів групи A(II) в присутності антигена протей мірабіліс можна стверджувати, що ізогемаглютиніни а поєднуються з мікробним агентом і їх не вистачає для аглютинації еритроцитів від розведення 1:64 до 1:512, в той час як без мікробного агента аглютинація припиняється при розведенні 1:1024.

Встановлення подібності антигенної структури сальмонели тифімуриум за O(I) групою крові, а протей мірабіліс з A(II) групою крові дає підставу вважати представників цих груп схильними до відповідних інфекцій. Організм не розпізнає інфекційного агента як "чуже", оскільки має в своєму складі аналогічну субстанцію.

На підтвердження наводимо аналіз розподілу груп крові серед хворих на сальмонельоз, (табл. 5).

Як видно з даних таблиці 5 в загальній групі хворих сальмонельозом спостерігається статистично достовірною перевагою осіб з O(I) групою крові у співвідношенні зі здоровими дітьми. При розгляді різних форм сальмонельозу встановлена більш чітка залежність між важкістю патологічного процесу і групою крові (табл. 6). Так найбільша кількість представників групи крові O(I) виявлена у хворих з генералізованою (43%,  $p < 0,05$ ) та важкою гастроінтестинальною формами (43,2%,  $p < 0,02$ ).

Отже хворі на сальмонельоз з O(I) групою крові мають високий ризик розвитку генералізації та важкого перебігу даного інфекційного захворювання, про що свідчать високі показники Вульфа у представників O(I) групи крові (генералізована форма RR - 2,29, важка гастроінтестинальна RR - 2,28).

В системі A-анти-A (табл. 2), B-анти-B (табл. 3) та AB-анти-AB (табл. 4) гальмування реакції ізогемаглютинації в присутності антигенних субстанцій сальмонели тифімуриум не зареєстровано.

З наростанням важкості захворювання зростає питома вага дітей з протейним дисбактеріозом, який частіше спостерігається у представників групи крові A(II).

Таким чином, встановлено спосіб визначення генетичної схильності до інфекційних захворювань за групою крові системи ABO(H), який може бути застосований для ранньої діагностики, профілактики та формування груп підвищеного ризику, особливо важливого в закритих колективах в епідемічних періодах.

Таблиця 1

Результати реакції ізогемаглютинації еритроцитів групи крові 0(I) в присутності мікробних агентів

Титр лектину	Результати реакції ізогемаглютинації				
	Контроль	Сальмонела	Протей	Цитробактер	Кишкова паличка
1 2	+++	+++	+++	+++	+++
1 4	+++	+++	+++	+++	+++
1 8	+++	+++	++	+++	+++
1 16	+++	++	++	++	++
1 32	+++	+	++	++	++
1 64	+++	-	++	+	+
1 128	+	-	+	+	+
1 256	+	-	-	-	-
1 512	+	-	-	-	-
1 1024	-	-	-	-	-

Таблиця 2

Результати реакції ізогемаглютинації еритроцитів групи крові A(II) в присутності мікробних агентів

Титр лектину	Результати реакції ізогемаглютинації				
	Контроль	Сальмонела	Протей	Цитробактер	Кишкова паличка
1 2	+++	+++	+++	+++	+++
1 4	+++	+++	+++	+++	+++
1 8	+++	+++	++	+++	++
1 16	+++	++	+	+++	++
1 32	++	++	+	++	++
1 64	+	+	-	++	+
1 128	+	+	-	+	+
1 256	+	+	-	+	+
1 512	+	-	-	+-	+
1 1024	-	-	-	-	-

Таблиця 3

Результати реакції ізогемаглютинації еритроцитів групи крові B(III) в присутності мікробних агентів

Титр лектину	Результати реакції ізогемаглютинації				
	Контроль	Сальмонела	Протей	Цитробактер	Кишкова паличка
1 2	+++	+++	+++	+++	+++
1 4	+++	+++	+++	+++	+++
1 8	+++	+++	+++	+++	+++
1 16	++	++	++	+++	++
1 32	++	++	++	+++	++
1 64	++	++	++	++	++
1 128	+	++	++	++	+
1 256	+	+	+	+	+
1 512	+	+	+	+	+
1 1024	-	-	-	-	-

Таблиця 4

Результати реакції ізогемаглютинації еритроцитів групи крові AB(IV) в присутності мікробних агентів

Титр лектину	Результати реакції ізогемаглютинації				
	Контроль	Сальмонела	Протей	Цитробактер	Кишкова паличка
1 2	+++	+++	+++	+++	+++
1 4	+++	+++	+++	+++	+++
1 8	+++	+++	+++	+++	+++
1 16	+++	++	+++	+++	++
1 32	++	++	++	+++	++
1 64	++	++	++	++	+
1 128	++	++	+	++	+
1 256	+	+	+	+	+-
1 512	+	+	+-	+	-
1 1024	-	-	-	-	-

Таблиця 5

Асоціативний зв'язок антигенів крові AB0 (H) з сальмонельозом

Антигени Крові	Хворі на сальмонельоз n-148	Здорові n-160	X <sup>2</sup>	P
----------------	-----------------------------	---------------	----------------	---

Продовження таблиці 5

	Доля осіб	Доля осіб		
O(I)	0,35	0,25	4,1	<0,05
A(II)	0,37	0,40	0,2	>0,1
B(III)	0,20	0,24	0,71	>0,05
AB(IV)	0,60	0,10	1,61	>0,05

Таблиця 6

Асоційованість груп крові системи AB0 та Rh з різними формами сальмонельозу

Анти- гени Крові	Здо- ров і п- 160	Гене- рالی- зов фор- ма саль- мон п-30	RR	P1	Важ- ка фор- ма саль- мон п-44	RR	P2	Сере- дньо- важка фор- ма саль- мон п-48	RR	P3	Легка фор- ма саль- мон п-26	RR	P4
		Час- то- та %			Час- то- та %			Час- то- та %			Час- то- та %		
O(I)	25,0	43,0	2,29	<0,05	43,2	2,28	<0,02	31,2	1,36	>0,05	26,9	1,11	>0,05
A(II)	40,0	40,0	1,0	>0,05	31,8	0,70	>0,05	33,3	0,75	>0,05	42,2	1,10	>0,05
B(III)	24,4	6,7	0,22	<0,02	20,4	0,80	>0,05	29,1	1,28	>0,05	23,0	0,93	>0,05
AB(IV)	10,6	10,0	0,93	>0,05	4,6	0,40	>0,05	6,4	0,56	>0,05	7,9	0,70	>0,05

Примітка

P1 - достовірність різниці між здоровими та хворими з генералізованою формою сальмонельозу

P2 - достовірність різниці між здоровими та хворими з важкою гастроінтестинальною формою сальмонельозу

P3 - достовірність різниці між здоровими та хворими з середньоважкою гастроінтестинальною формою сальмонельозу

P4 - достовірність різниці між здоровими та хворими з легкою гастроінтестинальною формою сальмонельозу