



(19) KG (11) 383 (13) C2
(51) G01N 33/53 (2014.01)

ГОСУДАРСТВЕННАЯ СЛУЖБА ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ И ИНОВАЦИЙ ПРИ ПРАВИТЕЛЬСТВЕ КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ к патенту Кыргызской Республики

(21) 20130066.1

(22) 25.07.2013

(46) 30.01.2015. Бюл. № 1

(76) Балтабаев М. К.; Балтабаев А. М. (KG)

(56) Т. Фитцпатрик, Р. Джонсон, К. Вульф, М. Полано, Д. Сюрмонд. Дерматология. Атлас-справочник. - Москва: «Практика», 1999. McGraw-Hill International (UK) Ltd.. - С. 409-413

(54) Способ лабораторной диагностики истинной акантолитической пузырчатки

(57) Изобретение относится к медицине, а именно к дерматологии, и может быть использовано в диагностике различных клинических форм пузырчатки.

Задачей изобретения является усовершенствование лабораторной диагностики истинной акантолитической пузырчатки, обеспечивающей назначение специфического лечения и улучшение прогноза течения различных клинических форм данного аутоиммунного заболевания.

Поставленная задача решается в способе лабораторной диагностики истинной акантолитической пузырчатки, где исследуется в периферической крови титр специфических иммуноглобулинов G и M к цитомегаловирусу методом иммуноферментного анализа (ИФА), и при необходимости полимеразно-цепная реакция (ПЦР) к фрагментам ДНК цитомегаловируса (ЦМВ) в мазках-отпечатках, причем при наличии повышенного титра, начиная с 200 и выше, а также фрагментов ДНК цитомегаловируса, диагностируют истинную акантолитическую пузырчатку.

1 н. п. ф., 3 пр.

Изобретение относится к медицине, а именно к дерматологии, и может быть использовано в диагностике различных клинических форм пузырчатки.

Известен способ лабораторной диагностики акантолитической пузырчатки, основанный на появлении клеток Тцанка (акан-толитические клетки) в очагах поражений (Т. Фитцпатрик, Р. Джонсон, К. Вульф, М. Полано, Д. Сюрмонд. Дерматология. Атлас-справочник. - Москва: «Практика», 1999. McGraw-Hill International (UK) Ltd.. - С. 409-413).

Определение акантолитических клеток в мазках-отпечатках не является строго специфическим анализом, так как они могут появляться и при других тяжело протекающих дерматозах - доброкачественной семейной пузырчатке Гужеро-Хейли-Хейли, синдроме Лайелла.

Известен способ лабораторной диагностики пузырчатки, на основании приготовления срезов из нефиксированной ткани толщиной 5 мкм, готовят в криостате (-20 °C), обрабатывают 40-60 % водной смесью этанола, промывают в физиологическом растворе pH 7,0-7,4 10 мин с целью удаления не связанных с тканями белков, обрабатывают люминесцирующей сывороткой против иммуноглобулина G 30 мин, промывают 10 мин и заключают в 60 % нейтральный глицерин. При обработке срезов в течение 1-3 мин 40-60 % водной смесью этанола установлено, что такое мягко денатурирующее средство стабилизирует связь между антителами и тканевым антигеном, препятствуя их вымыванию из межклеточной склеивающей субстанции. Выраженной коагуляции растворимых белков при этом не происходит, что удается проконтролировать с помощью обработки срезов 96 % этанолом. В последнем случае выявляется иммуноглобулин класса G плазмы крови и экссудативной жидкости. Параметрические значения реализации способа: использовали 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 96 % водной смеси этанола и выявлено, что оптимальным для проявления реакции является 50 % водные смесь этанола, но возможно использовать раствор в параметрах от 40 до 60 %. Использовать менее концентрированную водную

смесь не следует вследствие слабого стаби-лизирующего эффекта. Более высокая концентрация (60-96 %) приводит к коагуляции растворимых белков тканевых жидкостей (Махнева Н. В., Белецкая Л. В. Патент RU № 94036174, 1996).

Однако описанный способ лабораторной диагностики требует специальной лабораторной техники, сложен в исполнении и требует специальных условий для его проведения.

Задачей изобретения является усовершенствование лабораторной диагностики истинной акантолитической пузырчатки, обеспечивающей назначение специфического лечения и улучшение прогноза течения различных клинических форм данного аутоиммунного заболевания.

Поставленная задача решается в способе лабораторной диагностики истинной акантолитической пузырчатки, где исследуется в периферической крови титр специфических иммуноглобулинов G и M к цитомегаловирусу методом иммуноферментного анализа (ИФА), и при необходимости полимеразно-цепная реакция (ПЦР) к фрагментам ДНК цитомегаловируса (ЦМВ) в мазках-отпечатках, причем при наличии повышенного титра, начиная с 200 и выше, а также фрагментов ДНК цитомегаловируса, диагностируют истинную акантолитическую пузырчатку.

Определение специфических иммуноглобулинов G и M к цитомегаловирусу в периферической крови проводилось следующим образом: сыворотку крови, взятой из локтевой вены, в количестве 3-5 мл, получали путем центрифугирования при 2500 об/мин в течение 10-15 мин, инактивировали при 56 °C 30 мин и предварительно готовили из нее ряд последовательных двукратных разведений, добавляли иммунопероксидазные коньюгаты и учитывали результаты реакции на АКИ-Ц-01 при длине волны 492 нм, далее для более точной оценки результата ИФА при выявлении антител к цитомегаловирусу соответствующие иммуноглобулины, меченные пероксидазой, добавлялись только в разведения сыворотки 1:200 и 1:3200 и далее из сывороток крови больных с высокими значениями титров готовили разведения сыворотки таким образом, чтобы значения показателя оптической плотности (ОП) находились в пределах прямо пропорциональной зависимости от концентрации иммуноглобулинов.

Изучение титра иммуноглобулина G к цитомегаловирусу методом ИФА в периферической крови у 10 наблюдавшихся больных акантолитической пузырчаткой выявило их повышенный уровень у всех пациентов. Титр IgG составил от 200 и выше. Повышенный уровень IgG указывал на хроническое течение патологического процесса. Положительные титры IgM отмечены у 4 пациентов, что указывало на острый недавний характер течения вирусной инфекции. Изучение мазков-отпечатков с очагов поражений у больных акантолитической пузырчаткой методом ПЦР выявило фрагменты ДНК цитомегаловируса (ЦМВ) у всех больных.

Лабораторный способ диагностики различных клинических форм акантолитической пузырчатки осуществляется исследованием в периферической крови больных уровня специфических иммуноглобулинов классов G и M к цитомегаловирусу, и при необходимости подтверждением исследования мазков-отпечатков на фрагменты ДНК ЦМВ полимеразно-цепной реакцией.

Клиническое наблюдение за 10 больными показало, что повышенный уровень титра ЦМВ коррелирует с тяжестью и торpidностью течения системного процесса.

Приводим клинические наблюдения.

Пример 1. Больная, Реннер Анна Анатольевна, 1984 г. р. Пол: женский. Считает себя больной с 2009 года. Заболевание ни с чем не связывает. Первые очаги появились во рту. После одного месяца появились высыпания в области левого плеча, с дальнейшим распространением кожного процесса в области головы и половых органах. Лечилась по поводу стрептодермии без эффекта. Дерматовенеролог поликлиники отправил больную на исследование на клетки Тцанка. При однократном анализе клетки Тцанка не были найдены. Улучшения не отмечала. Обследовалась в Центральном научно-исследовательском кожно-венерологическом институте МЗ РФ г. Москвы в 2009 году, где диагноз акантолитической пузырчатки был подтвержден на основании клиники и исследований биопсийного материала с очага поражения и мазков-отпечатков на акантолитические клетки - клетки Тцанка были обнаружены.

Больной проведено комплексное лечение кортикостероидами. В настоящее время находится на поддерживающей терапии: три таблетки преднизолона в сочетании с панангином на протяжении четырех лет. Результаты параклинических анализов: общий анализ крови от 29.12.2009 г.: эритроциты - 4.96 млн/мкл, лейкоциты - 13,3 тыс/мкл, гемоглобин - 15,3 г/дл, гематокрит - 41,8 %, тромбоциты - 333 тыс/мкл, средний объем эритроцита - 84 мкм³. Биохимический анализ крови: глюкоза - 6,7 ммоль/л, креатинин - 63 мкмоль/л, билирубин общий - 17,8 мкмоль/л, холестерин

общий - 4,6 ммоль/л, триглицериды - 0,76 ммоль/л, общий кальций - 2,33 ммоль/л, АЛТ - 24,3 Ед/л, АСТ - 13 Ед/л, альфа-амилаза - 95,2 Ед/л, щелочная фосфатаза - 37,8 Ед/л.

Анализы на вирусную инфекцию. Иммуноферментный анализ. 31.03.2011 г. ЦМВ IgM - отрицательный, ЦМВ IgG - 1:200, герпес (1-11) IgM - отрицательный, герпес (1-11) IgG - отрицательный. Полимеразно-цепная реакция: в мазка-отпечатках из очагов поражений найдены фрагменты ДНК цитомегаловируса.

Пример 2. Больная, Ормонбекова Кумара Турсунбаева, 30.08.1973 г. р. История болезни № 451/235. Пол: женский. Дата взятия на учет: 02.06.11 г. Клинический диагноз: Листовидная пузырчатка. Поступила в стационар Республиканского центра дерматовенерологии (РЦВД) с жалобами на распространенные высыпания по всему телу, в том числе в области головы, сопровождающиеся жжением. Anamnesis morbi: считает себя больной в течении месяца, заболевание связывает с самостоятельной отменой преднизолона, после чего на коже туловища и сгибателей появились элементы, мокнущие, эрозивные. Высыпания быстро стали распространяться по всему телу, после чего обратилась в стационар РЦВД с клиническим диагнозом: Листовидная пузырчатка. При объективном осмотре состояние больной относительно удовлетворительное. Локальный статус: кожный процесс хронический в стадии обострения. Процесс локализован на коже туловища, верхних и нижних конечностях, представлен гиперемией и инфильтрацией кожи, папулами и пустулами с серозно-гнойным содержимым, везикулами и пузырями с серозным содержимым. А также имеются множественные эрозивные поверхности, сливающиеся друг с другом, расположенные в области грудины, под молочными железами, имеющие мокнущий характер. Симптом Никольского резко положителен. В мазках-отпечатках акантолитические клетки (клетки Тцанка) найдены. Общий анализ крови: эритроциты - 4,8 млн/мкл, гемоглобин - 15,3 г/дл, цветной показатель - 0,9, лейкоциты - 8,2 тыс/мкл, эозинофилы - 3 %, сегментоядерные лейкоциты - 56 %, лимфоциты - 24 %, моноциты - 17 %, СОЭ - 24 мм/час.

Анализы на вирусную инфекцию. Иммуноферментный анализ. 28.06.2011: ЦМВ IgM - отрицательный, ЦМВ IgG - 1:200, Герпес (I и 11) IgM - отрицательный, Герпес (I и II) IgG - 1:200. Полимеразно-цепная реакция: в мазках-отпечатках из очагов поражений найдены фрагменты ДНК цитомегаловируса.

Пример 3. Большой, Курбанов Абдумалик Абдувалипович, 10.05.1961 г. р. Пол: мужской. Дата взятия на учет: 20.09.10 г. Клинический диагноз: Вульгарная пузырчатка. Жалобы при поступлении: на распространенные высыпания в области предплечий, области лица, на спине, на животе и груди, в области нижних конечностей. Anamnesis morbi: считает себя больным с мая месяца 2010 года, когда впервые на коже вокруг пупка появились эритематозные элементы, которые далее распространились на область грудной клетки, далее кожи голени и бедренной части. Обратился в стационар РЦДВ, был выставлен клинический диагноз: Вульгарная пузырчатка. В июне 2010 года находился на стационарном лечении, выписался с улучшением. В конце августа вновь поступил с обострением кожного процесса. Лечился в течение 26 дней. Выписался с улучшением. Последнее обострение началось в мае 2011 года. Не лечился. Получал только местное лечение. 29.11.2011 года поступил на стационарное лечение в РЦДВ. Локальный статус: процесс носят ограниченный характер и представлен в виде эритематозных пятен, локализующихся в области лица. Кожные покровы остальных участков кожи свободны от высыпаний. Общий анализ крови: эритроциты - $4,0 \times 10^{12}/\text{л}$, гемоглобин 116 г/л, цветной показатель - 0,9, тромбоциты - $219 \times 10^9/\text{л}$, лейкоциты - $3,5 \times 10^9/\text{л}$, палочкоядерные лейкоциты - 3 %, сегментоядерные лейкоциты - 51 %, эозинофилы - 2 %, лимфоциты - 37 %, моноциты - 7 %, СОЭ - 26 мм/час.

Анализы на вирусную инфекцию. Иммуноферментный анализ. 20.10.2010 г. ЦМВ IgM - отрицательный, ЦМВ IgG - 1:400, ВПГ (I-II) IgM - отрицательный, ВПГ (I-II) IgG - 1:200, Токсоплазма IgG - отрицательный. Полимеразно-цепная реакция: в мазках-отпечатках из очагов поражений найдены фрагменты ДНК цитомегаловируса.

Данным способом обследовано 10 пациентов, и у всех обследованных на ИФА и ПЦР анализы выявило наличие IgG в периферической крови и фрагменты ДНК вируса в мазках-отпечатках.

Таким образом, указанный способ лабораторной диагностики различных клинических форм истинной акантолитической пузырчатки позволяет усовершенствовать вопросы диагностики, назначить специфическое противовирусное лечение с целью уменьшения рецидивов и продления клинической ремиссии дерматоза.

Формула изобретения

Способ лабораторной диагностики истинной акантолитической пузырчатки, осуществляется на основании обнаружения в мазках-отпечатках акантолитических клеток, отличающихся тем, что определяют титр специфических иммуноглобулинов G и M к цитомегаловирусу методом иммуноферментного анализа в периферической крови больных, и при необходимости исследованием мазков-отпечатков на наличие фрагментов ДНК цитомегаловируса методом полимеразно-цепной реакции, причем при наличии повышенного титра, начиная с 200 и выше, а также фрагментов ДНК цитомегаловируса, диагностируют истинную акантолитическую пузырчатку.

Выпущено отделом подготовки материалов

Государственная служба интеллектуальной собственности и инноваций при Правительстве Кыргызской Республики,
720021, г. Бишкек, ул. Московская, 62, тел.: (312) 68 08 19, 68 16 41; факс: (312) 68 17 03