



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2015122608/15, 15.06.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
15.06.2015

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 15.06.2015

(45) Опубликовано: 10.10.2016 Бюл. № 28

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **ТОПТЫГИНА А.П.** и др. Сопоставление первичного и вторичного гуморального иммунного ответа на вакцинацию "Приорикс". *Инфекция и иммунитет.* 2013; 3(4): 359-364.. RU 2127884 C1, 20.03.1999. UA 27419 U, 25.10.2007. **ОТРАШЕВСКАЯ Е.В.** Функциональное состояние специфического иммунитета у детей и подростков, иммунизированных паротитной вакциной // *Вопр. Вирусол.*, 2010, Т. 55, N4, С. 10-12.

Адрес для переписки:

125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10,
ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского
Роспотребнадзора, патентный отд.

(72) Автор(ы):

Топтыгина Анна Павловна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное Бюджетное учреждение науки "Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (RU)

(54) СПОСОБ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ПЕРВИЧНОГО И ВТОРИЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА НА ВИРУС ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПАРОТИТА

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к медицинской иммунологии, и может быть использовано для дифференциальной диагностики первичного и вторичного иммунного ответа на вирус эпидемического паротита. Проводят разделение типов иммунного ответа на первичный и вторичный на основании рассчитанных с помощью ROC-анализа пороговых критериев для IgG1 и IgG3 субклассов по результатам определения количества специфических противопаротитных антител, принадлежащих к субклассам IgG1 и IgG3 с помощью ИФА-анализа. При получении пороговых значений для IgG1<55% и для

IgG3>37,3% от общего количества противопаротитных IgG-антител диагностируют первичный иммунный ответ. При получении пороговых значений для IgG1>55% и для IgG3<37,3% от общего количества противопаротитных IgG-антител диагностируют вторичный иммунный ответ. Использование данного способа позволяет проводить дифференциальную диагностику первичного и вторичного иммунного ответа на вирус эпидемического паротита, что в свою очередь позволит выявить группу первичных больных эпидемическим паротитом с угрозой осложнения орхитом. 3 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2015122608/15, 15.06.2015**

(24) Effective date for property rights:
15.06.2015

Priority:

(22) Date of filing: **15.06.2015**

(45) Date of publication: **10.10.2016** Bull. № 28

Mail address:

**125212, Moskva, ul. Admirala Makarova, 10, FBUN
MNIEM im. G.N. Gabrichevskogo
Rospotrebnadzora, patentnyj otd.**

(72) Inventor(s):

Toptygina Anna Pavlovna (RU)

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe Byudzhethnoe uchrezhdenie nauki
"Moskovskij nauchno-issledovatel'skij institut
epidemiologii i mikrobiologii im. G.N.
Gabrichevskogo" Federalnoj sluzhby po nadzoru
v sfere zashshity prav potrebitelej i
blagopoluchiya cheloveka (RU)**

(54) **METHOD FOR DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF PRIMARY AND SECONDARY IMMUNE RESPONSE TO EPIDEMIC PAROTITIS VIRUS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to medicine, specifically to immunology, and can be used for differential diagnosis of primary and secondary immune response to epidemic parotitis virus. Separation of types of immune response into primary and secondary is performed on basis of calculated using ROC analysis thresholds for IgG1 and IgG3 subclasses based on results of determining amount of specific mumps antibodies belonging to IgG1 and IgG3 subclasses by ELISA analysis. For threshold values of IgG1 < 55 % and IgG3 > 37.3 % of total amount of mumps IgG-

antibodies primary immune response is diagnosed. For threshold values of IgG1 > 55% and IgG3 < 37.3 % of total amount of mumps IgG-antibodies secondary immune response is diagnosed.

EFFECT: using the given method enables performing differential diagnosis of primary and secondary immune response to epidemic parotitis virus, that in turn enables detection of a group of primary infected by epidemic parotitis virus with threatening of orchitis sequelae.

1 cl, 3 tbl

RU 2 599 504 C1

RU 2 599 504 C1

Изобретение относится к области медицинской иммунологии, а именно к способам определения специфического гуморального иммунного ответа.

Изобретение может быть использовано в медицине для дифференциальной диагностики первичного и вторичного гуморального иммунного ответа на вирусы эпидемического паротита у больных или привитых против этой инфекции. Известно, что со временем поствакцинальный иммунитет истощается, и в результате человек, привитый в детстве против эпидемического паротита, может заболеть при контакте с диким штаммом вируса. С другой стороны, в результате нарушения инструкций по хранению и применению вакцины человек мог быть привит некачественной вакциной и, при наличии документа о проведенной прививке, он на самом деле остается не защищенным против эпидемического паротита. По графику прививок РФ, вакцинация против эпидемического паротита проводится двукратно в 1 год и в 6 лет, и документы о проведенных прививках тщательно сохраняются, однако с годами документы о прививках могут теряться, а сам взрослый не помнит, делали ли ему прививку в раннем возрасте. Такие люди имеют статус «с неясным прививочным анамнезом». Эпидемический паротит не отличается особой тяжестью течения или высокой смертностью. Особенность этого вируса состоит в том, что, имея тропность к железистой ткани, он может поражать не только слюнные железы, но также вызывать панкреатит или орхит. Последний приводит к 100%-ному мужскому бесплодию и не поддается никакому лечению [1]. На сегодняшний момент нет стандартного метода, позволяющего четко разграничить первичный и вторичный иммунный ответ на вирусы эпидемического паротита.

Для дифференциальной диагностики первичного и вторичного иммунного ответа используют количество специфических IgM и IgG антител [2]. Однако уровень специфических IgG-антител в самом начале заболевания весьма вариабелен, требуется подтверждение прироста уровня антител через 2-3 недели, но в результате бустер-эффекта уровень антител может повышаться и у привитого, вполне защищенного индивидуума. IgM-антитела могут наблюдаться и при первичном и при вторичном иммунном ответе [3]. Также используют определение авидности IgG-антител, однако для иммунного ответа на вирус эпидемического паротита типична низкая авидность антител у привитых даже спустя годы после вакцинации [4]. Более того, даже у переболевших эпидемическим паротитом лиц авидность антител крайне редко превышает 30% [5].

Известно, что антитела класса IgG делятся на 4 субкласса: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. Считают, что для противовирусного иммунного ответа наиболее типичны антитела субклассов IgG1 и IgG3 [6]. Отсутствие коммерческих тест-систем затрудняет сопоставление и оценку результатов. Тем не менее, было показано, что у больных эпидемическим паротитом сначала появляются специфические IgM, затем низкоаффинные IgG3, и только после этого - IgG1 [7], то есть для первичного иммунного ответа преобладающим субклассом специфических антител являются IgG3, а для вторичного иммунного ответа - IgG1 [8]. Этот феномен может быть использован для разделения первичного и вторичного иммунного ответа на вирусы эпидемического паротита.

Наиболее близкое техническое решение описано в статье А.П. Топтыгиной [6]. В статье на примере привитых и ревакцинированных против вирусов эпидемического паротита детей было показано, что через месяц после вакцинации в противопаротитном иммунном ответе IgG1 и IgG3-антитела составляли 47,4% и 53,6% от общего количества противопаротитных IgG антител, через год преобладающим субклассом оказался IgG1,

который составил 93,2%, а после ревакцинации IgG1 субкласс составил 68,2%. Тем не менее, не было выявлено четких критериев дифференциальной диагностики первичного и вторичного иммунного ответа. Так через 1 неделю после ревакцинации отмечался вновь значимый подъем количества специфических IgG3-антител до 40,3% от общих специфических IgG-антител, а через 6 недель IgG3-антитела составляли 25,6% от общего иммунного ответа на вирус ($p < 0,01$).

Задачей изобретения является разработка способа дифференциальной диагностики первичного и вторичного иммунного ответа на вирус эпидемического паротита.

Поставленная задача достигается за счет того, что разделение типов иммунного ответа на первичный и вторичный осуществляется на основании рассчитанных пороговых критериев (cut off) по результатам определения количества специфических противопаротитных антител, принадлежащих к субклассам IgG1 и IgG3, определенных методом иммуноферментного анализа.

Пример. Проводилась дифференциальная диагностика первичного и вторичного типа иммунного ответа на антигены вирусов эпидемического паротита в сыворотках крови детей через 1 месяц после первичной вакцинации (60 человек, группа 1) или ревакцинации (28 человек, группа 2) против эпидемического паротита.

Определение количества специфических антител против эпидемического паротита, принадлежащих к субклассам IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, проводилось ранее описанным методом [9, 10]. Для выявления наиболее информативных показателей субклассов специфических антител, образующихся после прививки Приорикс, позволяющих различить первичный и вторичный гуморальный ответ на антигены вирусов, входящих в состав вакцины, был проведен ROC-анализ полученных данных для группы 1 (первичный иммунный ответ) и группы 2 (вторичный иммунный ответ). Определение количества специфических IgG1 и IgG3 для антигенов вируса эпидемического паротита соответствовало средней вероятности правильного разделения на первичный и вторичный иммунный ответ: AUC 0,639 (0,482-0,797) и 0,659 (0,504-0,814), соответственно ($p < 0,05$). Вероятность правильного прогноза разделения на первичный и вторичный тип иммунного ответа на основе определения специфических IgG4 не превышала вероятности случайных событий. Для IgG2 расчет не проводили ввиду отсутствия специфических антител данного субкласса у привитых детей. Для антител субклассов IgG1 и IgG3 прослеживались прямо противоположные зависимости. Чем больше количество IgG1-антител и меньше количество IgG3-антител, тем вероятнее, что данный человек отвечает по типу вторичного иммунного ответа и наоборот. На Рисунке 1 представлены ROC-кривые, полученные в результате анализа количества специфических антител субклассов IgG1 и IgG3 через 1 месяц после прививки против эпидемического паротита для определения типа иммунного ответа (первичный или вторичный гуморальный иммунный ответ).

Для определения уровня порогового значения количества субклассов антител (cut-off) были выбраны наиболее информативные показатели - количество специфических антител IgG1 и IgG3 субклассов. Результаты расчета значения cut off представлены в Таблице 1.

Таблица 1 Уровень порогового значения, показатели чувствительности и специфичности для наиболее информативных показателей количества субклассов противопаротитных антител для определения типа иммунного ответа, рассчитанные для групп 1 и 2.

Субклассы IgG	Пороговое значение количества IgG, Me/мл	Чувствительность	Специфичность
IgG1 (cut-off)	19,7	60%	66,7%
IgG1- первичный иммунный ответ	9,8	84%	41,7%
IgG1- вторичный иммунный ответ	33	20%	83,3%
IgG3 (cut-off)	10,05	70,8%	60%
IgG3- первичный иммунный ответ	21,05	29,2,5%	80%
IgG3- вторичный иммунный ответ	4,95	83,3%	40%

В связи с тем, что определение количества специфических IgG-антител и их субклассов для антигенов вирусов эпидемического паротита сильно различаются в зависимости от использования тех или иных тест систем, результаты были представлены в виде процента от общего количества противопаротитных IgG антител, что позволило объединить всех лиц, отвечающих по первичному типу иммунного ответа или по вторичному типу иммунного ответа, независимо от возраста и использованной тест-системы. На Рисунке 2 представлены ROC-кривые, полученные в результате ROC-анализа процента специфических антител субклассов IgG1 и IgG3 от общего специфического иммунного ответа на антигены вирусов эпидемического паротита для определения типа иммунного ответа (первичный или вторичный гуморальный иммунный ответ).

На основании этих ROC кривых были рассчитаны площади под кривыми и значения порогового критерия. Предложенная модель характеризовалась высоким прогностическим качеством ($p < 0,01$). Результаты расчетов представлены в Таблице 2.

Таблица 2 ROC-анализ количества субклассов специфических антител, выраженных в процентах от общего специфического иммунного ответа на антигены вирусов эпидемического паротита.

Субклассы IgG	Площадь под ROC-кривой AUC(CI), $p < 0,05$	Пороговое значение уровня IgG, %	Чувствительность, %	Специфичность, %
IgG1	0,854 (0,763-0,945)	55,0	87,5	87,1
IgG3	0,850 (0,760-0,939)	37,3	83,9	80,4

Таким образом, независимо от количества специфических антител, определяемых в той или иной тест-системе, если для вирусов эпидемического паротита количество специфических антител субкласса $IgG1 < 55\%$ от общего иммунного ответа на этот вирус и $IgG3 > 37,3\%$, то с вероятностью более 90%, это первичный иммунный ответ, а если

IgG1>55% и IgG3<37,3%, то это вторичный иммунный ответ. Предложенный метод дифференциальной диагностики первичного и вторичного иммунного ответа на вирус эпидемического паротита продемонстрировал высокую чувствительность и специфичность (см. Таблицу 2).

5 В качестве примера в Таблице 3 приведено процентное содержание противопаротитных антител субклассов IgG1 и IgG3 у людей, впервые привитых вакциной против эпидемического паротита через 1 месяц после прививки (группа 1); у взрослых людей, привитых в детстве против эпидемического паротита (группа 2) и у больных эпидемическим паротитом (группа 3).

10

Таблица 3 Содержание специфических антител к антигенам вирусов эпидемического паротита субклассов IgG1 и IgG3 в сыворотке крови (% от общего количества противопаротитных IgG).

15

Номер пациента	IgG1	IgG3
Группа 1		
1	27,4	64,2
2	39,2	58,6
20 3	32,2	63,4
4	48,8	46,5
5	37,8	61,1
Группа 2		
25 6	73,6	10,8
7	66,3	27,1
8	65,8	31,2
30 9	abs	abs
10	71,8	21,3
Группа 3		
35 11	43,7	48,2
12	34,6	44,5
13	63,8	28,2

Используя значения порогового критерия из таблицы 2, находим, что все
40 обследованные люди, впервые привитые вакциной против эпидемического паротита (группа 1), через месяц после прививки имели специфические антитела субкласса IgG1 менее значения cut off (55%), а антитела к эпидемическому паротиту субкласса IgG3 превышали значение cut off (37,3%), то есть отвечали на прививку первичным иммунным
45 ответом, что типично для ранее не привитых людей. Обследованные доноры группы 2 (№6, 7, 8 и 10), привитые против эпидемического паротита в детстве, демонстрировали вторичный тип иммунного ответа (значения IgG1 превышали уровень cut off, а уровень IgG3 был ниже cut off). У донора №9 не было обнаружено специфических противопаротитных антител ни субкласса IgG1, ни IgG3, несмотря на свидетельство о

прививке в детстве против этой инфекции. Возможно, этот человек утерял со временем защитные антитела против эпидемического паротита, или вовсе их не выработал на прививку (первичная или вторичная вакцинальная неудача). Этот человек может заболеть эпидемическим паротитом при контакте с диким штаммом вируса. В группе 5 3 ситуация также не была однородной. Так пациенты под номерами 11 и 12 имели уровень специфических IgG1 антител ниже значения cut off, а IgG3 - выше cut off. Это означает, что эти пациенты отвечали на инфекцию по типу первичного иммунного ответа. Это подтвердили данные анамнеза: эти люди ранее не прививались против эпидемического паротита и не болели этой инфекцией. А вот у пациента №13 ситуация 10 иная. В данном случае антитела субкласса IgG1 оказались выше уровня cut off, а антитела субкласса IgG3 - ниже cut off, что соответствует вторичному типу иммунного ответа. По данным анамнеза этот пациент был привит против вирусов эпидемического паротита в детстве. По-видимому, этот человек утерял со временем защитный уровень антител против эпидемического паротита, однако клетки иммунологической памяти, 15 сохранившиеся после прививки, ответили на инфекцию с преимуществом более эффективных IgG1-антител. Это особенно важно для прогнозирования вероятности осложнений в виде орхита, так как образующиеся при вторичном иммунном ответе IgG1-антитела лучше и эффективнее защищают от инфекции.

Техническим результатом заявленного изобретения является разработка способа 20 дифференциальной диагностики первичного и вторичного иммунного ответа на вирусы эпидемического паротита, позволяющего независимо от способа получения этого иммунитета (вакцинация или инфекция) четко различать первый или повторный контакт организма с вирусом эпидемического паротита. Такие знания позволяют выявить среди лиц с неизвестным прививочным анамнезом группу первичных больных эпидемическим 25 паротитом, что угрожает осложнением орхитом и развитием в дальнейшем мужского бесплодия; и группу больных, привитых в детстве от эпидемического паротита, но из-за утери защитного уровня антител, заболевших этой инфекцией. У таких пациентов вероятность осложнений существенно ниже. Разработанный способ дифференциальной диагностики первичного и вторичного иммунного ответа на вирусы эпидемического 30 паротита помогает осуществлять контроль за качеством противопаротитного иммунитета населения и анализировать случаи первичных и вторичных вакцинальных неудач.

ЛИТЕРАТУРА

1. Божедомова В.А. Этиология аутоиммунного мужского бесплодия. / В.А. Божедомова, М.А. Николаева, И.В. Ушакова, Е.А. Спориш, И.М. Рохликов, Н.А. Липатова, Н.А. Логинова, Л.З. Файзуллин, Г.Т. Сухих // Акушерство и гинекология. 2013. - №2. - С.68-76.
2. Терентьева Ж.В. Актуальные вопросы серологического мониторинга в системе эпидемиологического надзора за эпидемическим паротитом. / Ж.В. Терентьева, Л.В. 40 Лялина, А.Г. Мадоян, Н.В. Валдайцева, В.А. Пьяных, О.В. Дегтярев // Профилактическая и клиническая медицина. - 2013. - №1 (46). - С.79-81.
3. Ярилин А.А. Иммунология. - М.: «ГЭОТАР-Медиа», 2010: 752.
4. Отрашевская Е.В. Функциональное состояние специфического иммунитета у детей и подростков, иммунизированных паротитной вакциной. / Е.В. Отрашевская, 45 Е.К. Букин, И.В. Красильников, Г.М. Игнатъев // Вопр. Вирусол. - 2010. - Т. 55. - №4. - С. 10-12.
5. Narita, M. Analysis of Mumps Vaccine Failure by Means of Avidity Testing for Mumps Virus-Specific Immunoglobulin G / M. Narita, Y. Matsuzono, Y. Takekoshi, S. Yamada, O.

Itakura, M. Kubota, H. Kikuta, T. Togashi // Clin Diagn Lab Immunol. Nov 1998; 5(6): 799-803.

6. Gregorek H., K. Madaliński, M. Woynorowski, J. Mikołajewicz, M. Syczewska, and J. Socha. The IgG subclass profile of anti-HBs response in vaccinated children and children seroconverted after natural infection. Vaccine 2000; 18: 1210-1217.

5 7. Linde G.A. Immunoglobulin class and immunoglobulin G subclass enzyme-linked immunosorbent assays compared with microneutralization assay for serodiagnosis of mumps infection and determination of immunity. / G.A. Linde, M. Granström, and C. Orvell // J Clin Microbiol. - 1987. - V. 25(9). - P. 1653-1658.

8. Топтыгина А.П., Алешкин В.А. Сопоставление первичного и вторичного
10 гуморального иммунного ответа на вакцинацию «Приорикс». Инфекция и иммунитет. 2013; 3(4): 359-364.

9. Топтыгина А.П., Пухальский А.Л., Мамаева Т.А., Алешкин В.А. Спектр субклассов противокоревых иммуноглобулинов G у лиц, перенесших корь. Бюлл. exper. биол. 2004; 137(3): 293-295.

15 10. Топтыгина А.П., Алешкин В.А. Созревание специфического гуморального ответа у детей, привитых вакциной «Приорикс». Иммунология. 2008; 29(6): 353-356.

Формула изобретения

Способ дифференциальной диагностики первичного и вторичного иммунного ответа
20 на вирус эпидемического паротита, отличающийся тем, что разделение типов иммунного ответа на первичный и вторичный осуществляют на основании рассчитанных с помощью ROC-анализа пороговых критериев для IgG1 и IgG3 субклассов по результатам определения количества специфических противопаротитных антител, принадлежащих к субклассам IgG1 и IgG3 с помощью ИФА-анализа, и при получении пороговых
25 значений для IgG1<55% и для IgG3>37,3% от общего количества противопаротитных IgG-антител диагностируют первичный иммунный ответ, а при получении пороговых значений для IgG1>55% и для IgG3<37,3% от общего количества противопаротитных IgG-антител диагностируют вторичный иммунный ответ.

30

35

40

45

Рисунок 1.

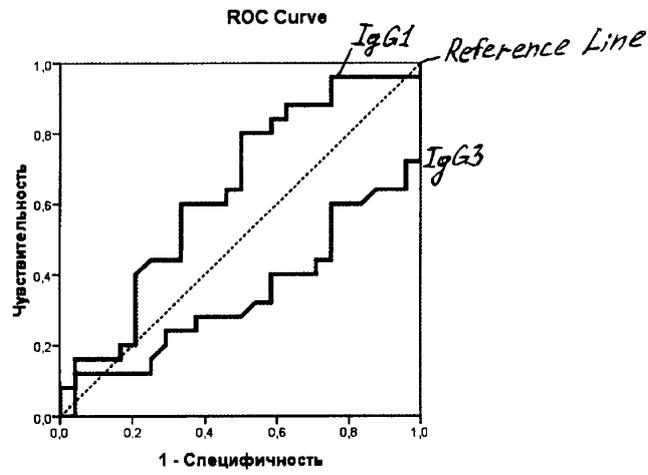


Рисунок 2

