

АДЕНОВИРУСЭЭР ҮҮСГЭГДСЭН НҮДНИЙ ЗАРИМ ЭМГЭГИЙН ХЭВИЙН ИММУНОГЛОБУЛИН ЭМЧИЛГЭЭНИЙ ҮР ДҮН

*Ц.Энхмаа¹, Ц.Цэвээнсүрэн¹, З.Сайнжаргал¹, Б.Сайнчимэг¹, Ж.Оюунбилэг¹, Д.Уранчимэг²
Д.Лхагвадолгор³ (Tseveenee_01@yahoo.com)*

*1Нийгмийн Эрүүл Мэндийн Хүрээлэн, 2Эрүүл Мэндийн Шинжлэх Ухааны Их
Сургууль, 3Улсын Клиникийн Төв Эмнэлэг*

RESULT OF THE TREATMENT OF CERTAIN EYE DISEASES CAUSED BY ADENOVIRUS INFECTION WITH NORMAL IMMUNOGLOBULIN

*Ts.Enkhmaa¹, Ts.Tseveensuren¹, Z.Sainjargal¹, B.Sainchimeg¹
J. Oyunbileg¹, D. Uranchimeg² D. Lkhavgadolgor³
1Public Health Institute, 2Health Sciences University of Mongolia,
3State Central Clinical Hospital*

Background: In 1889, keratinocytes conjunctivitis with eruption in the form of

Epidemic first was revealed by Fuchs and from 1995 it began to be diagnoses using the polymerase chain reaction. In our country annually about 11,850 patients visited the ophthalmology cabinet of the State Central Clinical Hospital, and from them 1290 cases or 10.89% were diagnosed to have viral infections, including 95% were sick of adenovirus infection, 3.7% had a herpes virus infection, 1,3% infection of other species respectively. At the international level of experience and research on the treatment of adenovirus conducted in a large circle, and immunoglobulin therapy has a high impact ($P=0.0001$, power 0.7599, ANOVA). In Mongolia, normal immunoglobulin is produced and widely uses to enhance immunity, but technological expertise and experiences on the use of immune globulin in ocular diseases caused by adenovirus infection had not been conducted yet.

Goal: To study the possibility to diagnose ocular diseases caused by adenovirus infection with laboratory method and use immunoglobulin in eye area.

Methods and materials: The investigation involved 50 patients aged 18-55 diagnosed with the infection of adenovirus. We took samples from eye conjunctiva, blood and stool of patients involved in the investigation and conducted a survey to identify adenovirus using the polymerase chain reaction. In this analysis it was used the diagnosing devise (Amplify Sense Adenovirus – Eph) made in Russian Federation. Samples where the virus is detected were multiplied in Hep2 cell culture and viruses were abstracted. Linear cells Hep2 were made culture by methodology and recommendation from World Health Organization. Abstracted viruses were challenged in experimental rabbits by dropping it into their eyes or making injections. After rabbits became completely sick, they were divided into five groups and each had a different treatment. Statistical and analytical software used in the development of research. (SPSS,EPI-info8 STATA).

Results: Samples were taken from 50 people and made on them polymerase chain reaction analysis, at 43 (86%) of which were detected adenovirus: Viruses were found in 14(93%) of 15 samples taken from the eye, 12 (80%) of 15 samples taken from the blood, 17(85%) of 20 samples taken from the stool respectively.

Sample with viruses was conducted the initial development and made culture in a linear cell Hep 2. Partial anesthesia were made on both eyes of 25 rabbits with use of Proparacaine Hydrochloride and infected them with adenovirus and after 7 days the following treatments were made dividing the rabbits in five groups so that each group has got five rabbits. (Treatment with interferon, ingavirin treatment against viruses, immunoglobulin drops, combined immunoglobulin drops jointly with ingavirin, immunoglobulin injection for combined with ingavirin).

After infection eyes of rabbits with adenovirus and descending corneous phlegmon in their eyes, the symptom curing were observed on schedule at 2, 4, 6, 8, 10, 12, and 14th days of each separate treatment group and calculated the average. On the 8th day after starting the treatment combined ingavirin with Ig eye drop and treatment Ig catarrh injection with ingavirin conducted in related groups, and on the 12th day of treatment with ingavirin, all the symptoms of infections were completely cured. Treatability of group treated with interferon after 14 days was 71 percent.

On the basis of the above indicators, we compared the most effective method of treatment with interferon treatment, which is currently in use, then developed a method of statistical significance of the study with indicator ANOVA and proved that the significance of the treatment is of $P < 0.05$. As in the 8th day of the treatment, the symptoms of viral infection is completely eliminated, and at the 10th day is not detected any viruses, we can prove that the treatment of immune globulin effectively prevents the virus and is capable of neutralizing the virus.

Conclusions:

1. The experiment shows that intravenous immunoglobulin therapy is an effective method against infection caused by adenovirus.
2. Since immunoglobulin counteracts the adenovirus, it has the opportunity to become a major application against inflammation caused by viruses and bacteria
3. Using of the drug against the virus with a combination of ingavirin has higher effectiveness than the use of only one immunoglobulin against adenovirus

Key words: Adenovirus infection, eyes of rabbits, normal immunoglobulin

Pp., Tables, Figures, References

Үндэслэл: Тахал хэлбэрийн тууралтат кератоконъюнктивитийг 1889 онд анх Фучс илрүүлж нээсэн ба 1955 оноос хойш полимеразын гинжин урвалын аргаар тодорхой оношлох болсон [1]. Аденовирус нь амьсгалын зам уушиг, залгиур хоолой, нүдийг өвчлүүлдэг 54 серотип буюу 6 төрөл (A-F) байдаг [1, 2, 3, 4, 5, 6]. ДЭМБ-аас 2000 онд хийсэн судалгаагаар Япон, Солонгос, Тайван зэрэг улсад нүдний вирусийн халдварын голлох байрыг аденовирус эзлэж байжээ [7, 8, 9]. Энэ өвчин нь их халдвартай, тахал хэлбэрээр олон тооны хүмүүсийг хамарч урт удаан хугацаанд үргэлжилдэг [10, 11, 12]. Тахал хэлбэрийн тууралтат кератоконъюнктивит нь үе үе дэгдэж зарим өвчтөнүүдэд дархлалд суурилсан эвэрлэгийн нэвчдэсийг үүсгэснээрээ олон сараар харааг муутгадаг [13, 14]. 2010 онд Япон улсад хийгдсэн судалгаагаар тахал хэлбэрийн тууралтат кератоконъюнктивитийн гол шалтгаан болоод байгаа иммунохроматографид өндөр

мэдрэг 54-р серотипийг нээж илрүүлсэн байна [15]. Манай оронд УКТЭ-ийн амбулаторын нүдний кабинетод жилд давхардсан тоогоор 11850 хүн үйчлүүлсэнээс 1290 тохиолдол буюу 10.89% нь вирусийн халдвартай, үүнээс 95%-д аденовирусийн халдвар, 3.7%-д херпес вирусийн халдвар, 1.3%-д бусад вирусийн халдвар болохыг эмнэл зүйгээр оношлосон байна. Олон улсад аденовирусийг эмчлэх аргуудын туршилт судалгаа нилээд хийгдэж байгаагаас иммуноглобулины эмчилгээ үр дүн өндөртэй ($P = 0.0001$, power 0.7599, ANOVA) гарсан байна [16, 17]. Эдгээр эсрэг бие нь аденовирусийн гадаргуугийн уургийг [18] таньж эсийн вирусийн халдварлалтыг зогсоодог байна. Иймд хэвийн иммуноглобулиныг хэрэглэснээр вирусийн гадаргуугийн уургийг холбон, нүдний салстын болон эвэрлэгийн эпители эсийн халдварлалтанд хориг тавьж, вирусийн хариу урвалыг багасгана [19]. Энэ нь хэвийн Ig-ны вирусийн эсрэг,

дархлал нь тахал хэлбэрийн тууралтат кератоконъюнктивитийн өвчлөлийг зогсоох үндсэн эмчилгээ болж болохыг харуулж байна. Монголд хэвийн иммуноглобулиныг үйлдвэрлэн биеийн ерөнхий дархлааг сайжруулах зорилгоор нэлээд хэрэглэж заншсан боловч аденовирүсийн халдвараар үүсгэгдсэн нүдний эмгэгийн үед нүдний хэсэг газрын иммуноглобулин эмчилгээг нэвтрүүлээгүй байна. Аденовирүсийн халдвараар үүсгэгдсэн нүдний эмгэгийн үед хэсэг газрын эмчилгээ буюу иммуноглобулины дусаалга хэрэглэх болон нүдний салстын доор иммуноглобулиныг тарих байдлаар эмчилэх нь тухайн өвчний үргэлжлэх хугацааг богиносгон эдгэрэлтийг түргэгэснээрээ цаашид өвчний тархалт, халдварлалтыг бууруулах чухал ач холбогдолтой юм. Манай орны хувьд урьд нь нүдний практикт вирүсийн халдварыг лабораторийн аргаар оношлож, иммуноглобулиныг нүдний хэсэг газрын эмчилгээнд хэрэглэж байсан технологийн туршилт, судалгаа хийгдэж байгаагүй.

Зорилго: Аденовирүсийн халдвараар үүсгэгдсэн нүдний эмгэгийг лабораторийн аргаар оношлох, иммуноглобулиныг нүдний хэсэг газрын эмчилгээнд хэрэглэх боломжийг судлах

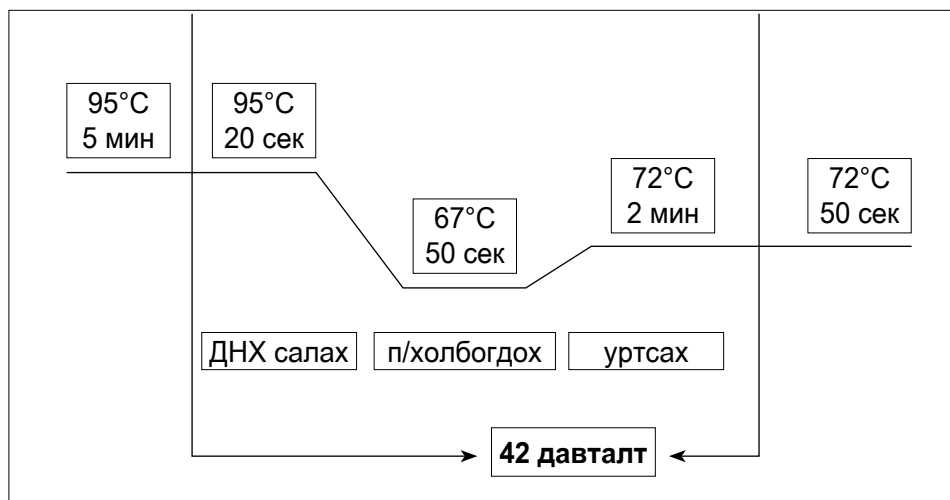
Ёс зүйн асуудал: Энэ төсөлт ажлын хүрээнд амьтан ашиглан судалгааг явуулах учир амьтадтай харилцах Био-анагаахын судалгааны олон улсын ёс зүйн хэм хэмжээг баримтлаж, Эрүүл мэндийн сайдын 2007.08.16-ны өдрийн №223 тоот тушаалыг үндэслэн Эрүүл мэндийн яамны анагаах ухааны ёс зүйн хяналтын хорооны 2009 оны 3 дугаар сарын 20-ны №12 тоот тогтоолоор зөвшөөрөл авсан.

Материал, арга зүй: Судалгаанд нийт 18-55 насны, аденовирүст халдвар оноштой 50 хүн хамрагдсан. Судалгаанд хамрагдсан хүмүүсээс нүдний салстын хусам, цус, өтгөний сорьцыг шинжилгээнд авч аденовирүсийг илрүүлэх шинжилгээг полимеразын гинжин урвалын аргаар хийв. Энэ шинжилгээнд оросын холбооны улсад үйлдвэрлэсэн (Ампли Сенс, Adenovirus-EPh) оношлуурыг үйлдвэрлэгчийн зааврын дагуу ашиглалаа. кДНХ-ийг ялгах (ДНХ-сорб-В бүрдэлийг ашиглав)

1. Задлагч буюу угаагч уусмал-1-ийг 60-650С-д тавьж талстыг бүрэн уусгаж нэг удаагийн эффендорфт 50 мкл ОКО+300мкл задлагч уусмал хийсэн. Дээрээс нь 50мкл дээж, 50 мкл ОКО (-К), 40мкл ОКО+10 ПКО ДНК AV (+К) ыг тус тус нэмэв. Сайн таглаад вортексоор сайтар хольж 650С-д 5 мин тавиад, 5000 эрг/мин-д 5 сек микрофугдэнэ. Дээд шингэнийг нь ашиглаж ДНХ ялгасан.

кДНХ-ийг тодорхойлох

1. ПГУ-ын холимгоо бэлтгээд ПГУ явуулах хуруу шилэндээ тус бүр 10 мкл хийж дээрээс нь маслоос 1 дуслыг (25мкл) нэмсэн.
2. Дээжнээс бэлтгэсэн кДНХ, (-)сөрөг хяналт болон (+)ээрэг хяналтаасаа тус бүр 10 мкл-ийг нэмсэн.
3. Бэлэн болсон хуруу шилээ ПГУ-ыг DNA Thermal Cycler 480 машинд хийж, Хүснэгт 1 харуулсан ПГУ-ын программын дагуу бүтээгдэхүүнийг олшруулав.
4. Гелийн электрофорез: ПГУ-аар олширч гарсан бүтээгдэхүүнээс 10мкл-ийг 1,5%-ийн агароз гельд 200V хүчдэлээр 20мин явууллаа. Үүнд эерэг, сөрөг хяналттай харьцуулан ДНХ-ийн олширсон зурвас илэрч байвал урвалыг эерэг гэж тооцлоо.



Зураг 1. ПГУ-ийн мөчлөг

Вирүс илэрсэн сорьцыг Her2 эсийн өсгөвөрт өсгөвөрлөж вирүсийг ялгаж авсан. Her2 шугаман эсийг ДЭМБ-ийн зөвлөмж аргачлалаар өсгөвөрлөн бэлтгэсэн.

Ялган авсан вирүсийг туршилтын туулайн нүдэнд дусаах болон тарих аргаар халдварлууллаа. Судалгаанд 2кг орчим жинтэй 25 туулай хамруулав.

Туулайнууд бүрэн өвчилсний дараа 5 бүлэг болгон тусгаарлаж ялгаатай эмчилгээнүүдийг хийсэн. Эмчилээнд хүний хэвийн иммуноглобулин, вирүсийн эсрэг бэлдмэл ингавирин, интерфероны уусмал болгон бэлдсэн бэлдмэлүүдийг ашигласан. Бүх бэлдмэлийг шаардагдах хүртэл 40С хадгалсан болно. Эмчилгээний үр дүнг халдварлуулснаас хойш 8 дах хоногийн дараагаас буюу эмчилгээг эхэлсэн хоёр дахь өдрөөс 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 өдрүүдэд үзлэг хийн эмнэлзүйн шинж тэмдгийг ажиглан үнэлэлт өгсөн. Үнэлэлт өгөхдөө бүх шинж тэмдэг арилсан бол эдгэрэлт 100% гэж үзээд бүх шинж тэмдгийн илэрсэн бол 0% буюу өвчлөл гэж үзсэн. Нийт 7 шинж тэмдэг байгаа бөгөөд бүгд дарааллаар үүсч мөн дарааллаар эдгэрэлт явагдана.

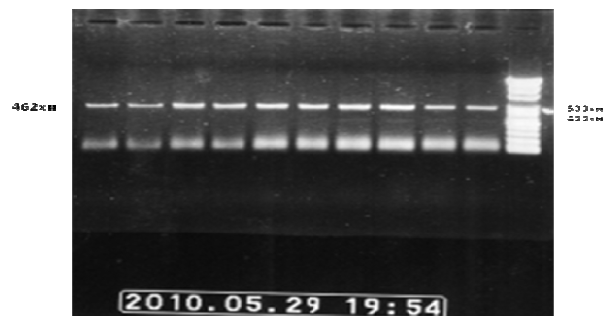
Нэг шинж тэмдгийн эдгэрэлтээр 14,28 % -аар эдгэрэлт нэмэгдэж байгаагаар тооцож % -аар үнэлсэн.

Үр дүн:

Нийт 50 хүнээс сорьц авч Полимеразын Гинжин Урвалаар шинжилгээ хийхэд 43

сорьцонд буюу 86%-д нь аденовирүс илэрсэн. Үүнд: нүдний хусамын 15 сорьцны 14(93%) нь, цусны 15 сорьцны 12(80%) нь, өтгөний 20 сорьцны 17(85%) нь вирүс илэрсэн байна.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 M



Зураг 2. Полимеразын гинжин урвалын электрофорезын зураглал

Тайлбар: 1,2,3 нь нүдний хусмаас авсан сорьц, 4,5,6 –р цусны ийлдэсийн сорьц, 7, 8, 9, 10-р хүний өтгөний сорьц, M- хэмжээ тогтоогч

Вирүс илэрсэн сорьцонд анхан шатны боловсруулалт хийж Her2 шугаман эсэд өсгөвөрлөсөн.

25 туулайн хоёр нүдэнд 0.5%-ийн Propagacaine Hydrochloride-оор хэсгийн мэдээ алдуулалт хийж, аденовирүсийн өсгөврөөр өвчлүүлж 7 хоногийн дараа туулайнуудыг нэг бүлэгт таван туулай байхаар таван бүлэг болгон хувааж дараах эмчилгээнүүдийг хийсэн .

1. Интерферон эмчилгээ – хоёр нүдэнд схемээр 7 хоногийн турш дусаах Вирүсийн эсрэг Ингавирины бэлдмэл – 50мг/кг –аар

- өдөрт 2 удаа 7 хоногийн турш уух
- II. Хэвийн иммуноглобулины дусаалга – хоёр нүдэнд 10%, 5%, 1%- оор өдөрт 4 удаа 10 хоногийн турш
- III. Хэвийн иммуноглобулины дусаалга + Ингавирин - хоёр нүдэнд 10%, 5%, 1%- оор өдөрт 4 удаа дусаах, + 50мг/кг –аар өдөрт 2 удаа ажлын 10 хоногийн турш уух
- IV. Хэвийн иммуноглобулины нүдний салстын доорхи тариа + Ингавирин - хоёр нүдэнд

10%, 5%, 1%- оор өдөрт 1 удаа + 50мг/кг –аар өдөрт 2 удаа 10 хоногийн турш уух

Аденовирүсээр халдварлуулан эвэрлэгийн нэвчдэс үүссэн туулайн нүдэнд илэрсэн шинж тэмдэгүүдийн эдгэрэлтийг эмчилгээний бүлэг тус бүр дээр 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 дэх өдрүүдэд хувиар тооцон дунджийг гаргасан болно. Эмчилгээний 5 бүлэг тус бүрт үр дүн хэрхэн өөрчлөгдөж байгааг харууллаа (Хүснэгт 1).

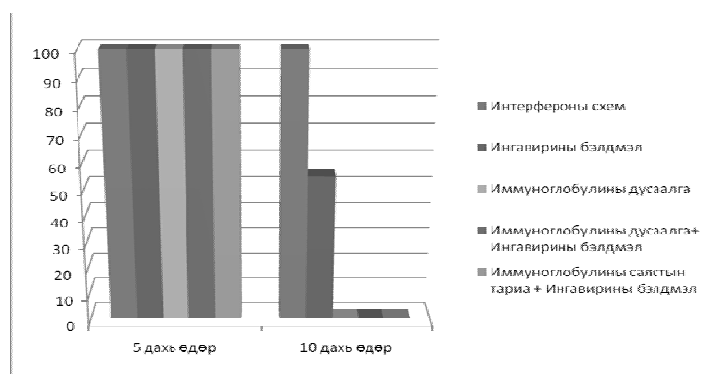
Хүснэгт 1. Туршилтын туулайнд хийсэн эмчилгээний дүн (бүлгүүдийн дундаж дүн %-аар)

№	Эмчилгээний өдөр Эмчилгээ	2 дахь өдөр	4 дахь өдөр	6 дахь өдөр	8 дахь өдөр	10 дахь өдөр	12 дахь өдөр	14 дахь өдөр
1	Интерфероны схем	0%	14%	49%	66%	71%	71%	71%
2	Ингавирины бэлдмэл	0%	57%	71%	71%	89%	100%	100%
3	Имуноглобулины дусаалга	0%	71%	71%	100%	100%	100%	100%
4	Имуноглобулины дусаалга+ Ингавирины бэлдмэл	0%	71%	100%	100%	100%	100%	100%
5	Имуноглобулины салстын тариа + Ингавирины бэлдмэл	0%	71%	100%	100%	100%	100%	100%

Дээрх үзүүлэлтээс хамгийн үр дүнтэй эмчилгээг одоо хийгдэж байгаа эмчилгээний арга болон интерферон эмчилгээний үр дүнтэй харьцуулан судалгааны ач холбогдолыг статистик боловсруулалтын ANOVA үзүүлэлтээр гаргасан .

Имуноглобулины 10%-ийн уусмал болон вирүсийн эсрэг бэлдмэл Ингавирины 100мг-ын

хавсарсан эмчилгээний үр дүнг Интерфероны 10%-ийн уусмалын схем эмчилгээний үр дүнтэй харьцуулан судалгааны ач холбогдлыг гаргав. Эмчилгээний явцад 2 удаа буюу эмчилгээний 5, 10 дахь өдрүүдэд аденовүсийн титрийг эмчилгээний бүлэг тус бүрт тодорхойлсон. (Зураг 1)



Зураг 3. Эмчилгээний 5, 10 дахь өдрийн аденовирусийн титрийг бүлэг тус бүрт тодорхойлсон дүн

Дээрхи судалгаа нь (бүх бүлгийн $n=25$) аденовирусээр халдварлагдсан туулайн вирусийн халдварын үед шинж тэмдгийн эдгэрэлтийг хувиар илэрхийлэн дунжийг гарган тооцоолсон. Иммуноглобулины эмчилгээний вирусийн эсрэг үйлдэл ба вирусийг саармагжуулах чадвар нь үр дүнтэй байгаа нь эмчилгээний эхний 8 дахь хоногоос вирусийн халдварын шинж тэмдэг бүрэн арилж, 10 дахь өдрийн шинжилгээгээр вирус илрэхгүй байгаагаар тодорхойлогдлоо. Судалгааны боловсруулалтад статистик ба аналитик программуудыг (SPSS, EPI-info8 STATA) ашиглав. Дан нууцлалтай энгийн нөхцөлд хийгдсэн судалгааны нууцлалыг бүх эмчилгээ дуусгавар болж бүлэг тус бүр дээр үнэлгээ тогтоогдсон үед зогсоосон. Бүх бүлгийн үзүүлэлтийг нэгтгэн дундаж хазайлтыг тодорхойлон дүгнэснээр (ANOVA) ач холбогдол $P<0.05$ гэж нотлогдсон.

Дүгнэлт

1. Иммуноглобулины эмчилгээ нь аденовирусээр үүсгэгдсэн нүдний халдварын эсрэг үр дүнтэй эмчилгээ болох нь туршилтаас харагдаж байна.
2. Иммуноглобулин нь аденовирусийн эсрэг үр дүнтэй байгаа нь нүдний салстын бусад вирусийн болон нянгийн гаралтай үрэвслийн эсрэг гол хэрэглээ болох боломжтой юм.
3. Аденовирусийн эсрэг иммуноглобулиныг дангаар нь хэргэлэхээс гадна вирусийн эсрэг бэлдмэл ингавиринтай хавсран хэрэглэх нь илүү үр дүнтэй байна.

Ашигласан хэвлэлийн жагсаалт

1. Gregory L, Louis B, Jayne S. External disease and cornea. BCSC. 2010-2011; 8:123-127
2. Pehler-Harrington K, Khanna M, Waters CR, Henrickson KJ. Rapid detection and identification of human adenovirus species by adenoplex, a multiplex PCR-enzyme hybridization assay. J Clin Microbiol. 2004;42(9):4072-6.
3. Kinchington PR, Romanowski EG, Jerold Gordon Y. Prospects for adenovirus antivirals. J Antimicrob Chemother. 2005;55(4):424-9. Epub 2005 Mar 2. Review.
4. Gordon JS, Aoki K, Kinchington PR. Adenovirus keratoconjunctivitis. In: Pepose JS, Holland GN, Wilhelmus KR, editors. Ocular Infection and Immunity. St. Louis: Mosby; 1996. pp. 877–894.
5. Kinchington PR, Turse SE, Kowalski RP, Gordon YJ. Use of polymerase chain amplification reaction for detection of adenoviruses in ocular swab specimens. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1994;35:4126–4134. [PubMed]
6. Gregory L, Louis B, Jayne S. Pediatric ophthalmology and strabismus. BCSC. 2010-2011; 6:190-191
7. Ishii K, Nakazono N, Figinaga K, et al. Comparative studies on aetiology and epidemiology of viral conjunctivitis in three countries of east Asia-Japan, Taiwan and South Korea. Int J Epidemiol 1987; 16:98-103

8. Infectious agents surveillance center of Japan. Viruses isolated from the eye, Japan, 1990-1994. Infectious agents surveillance report 1995;16:97-8
9. Aoki K, Kawana R, Matsumoto I, et al. Viral conjunctivitis with special reference to adenovirus type 37 and enterovirus 70 infection. Jpn J Ophthalmol 1986;30:158-64
10. Gordon JS. Adenoviruses and other nonherpetic viral diseases. In: Smolin G, Thoft RA, editors. The cornea. 3. Boston: Little, Brown and Co.; 1994. Pp. 215-227.
11. Piednoir E, Bureau-Charlot F, Merle C, Gotzamanis A, Wuibout J, Bajolet O. Direct costs associated with a nosocomial outbreak of adenoviral conjunctivitis infection in a long-term care institution. Am J Infec Control. 2002;30:407-410. [PubMed]
12. Dart JK. Eye disease at a community health center. BMJ. 1986;293:1477-1480. [PMC free article] [PubMed]
13. Barnard DL, Hart JCD, Marmion VJ, Clarke SKR. Outbreak in Bristol of conjunctivitis caused by adenovirus type 8, and its epidemiology and control. BMJ. 1973;2:165-169. [PMC free article] [PubMed]
14. Kanski JJ. Clinical Ophthalmology. 3. Boston: Butterworth-Heinemann; 1998. p. 86.
15. Kaneko H, Suzutani T, Aoki K, et al. Epidemiological and virological features of epidemic keratoconjunctivitis due to new human adenovirus type 54 in Japan. Br J Ophthalmol. 2010; [PubMed]
16. Isenberg SJ, Apt L, Valenton M, et al. A controlled trial of povidone-iodine to treat infectious conjunctivitis in children. Am J Ophthalmol. 2002;134:681-688. [PubMed]
17. Nwanegbo EC, Romanowski EG, Gordon YJ, Gambotto A. Efficacy of topical immunoglobulins against experimental adenoviral ocular infection. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2007;48(9):4171-6.
18. Toogood C, Crompton J, Hay R. Antipeptide antisera define neutralizing epitopes on the adenovirus hexon. J Gen Virol. 1992;73:1429-1435. [PubMed]
19. Lenaerts L, Naesens L. Antiviral therapy for adenovirus infections. Antiviral Res. 2006;71:172-180. PubMed

*Танилцаж, нийтлэх санал өгсөн:
Академич П.Нямдаваа*