

(19)



(10) **LT 5661 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patent numeris: **5661**

(51) Int. Cl. (2006): **G01N 33/00**
G01N 33/569

(21) Paraiškos numeris: **2008 094**

(22) Paraiškos padavimo data: **2008 11 21**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2010 05 25**

(45) Patent paskelbimo data: **2010 07 26**

(62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —

(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —

(30) Prioritetas: —

(72) Išradėjas:

Vida Elena GRAŽIENĖ, LT

(73) Patent savininkas:

Vida Elena GRAŽIENĖ, Architektų g. 66-20, LT-04113 Vilnius, LT

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:

Gediminas PRANEVIČIUS, Varul Vilgerts Smaliukas, Konstitucijos pr. 7, LT-09308 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Infektų tyrimo artritinio sąnario skystyje, panaudojant negatyvinio kontrasto elektroninę mikroskopiją (NEM), būdas

(57) Referatas:

Išradimas yra iš medicinos srities. RA ir ReA ligonių sinovinio skysčio (SS) tyrimui panaudota negatyvinio kontrasto elektroninė mikroskopija (NEM). Tyrimo tikslas - kuo anksčiau identifikuoti infektus, galimus artrito sukėlėjus. Būdo esmė - tinkamas SS paruošimas NEM tyrimui: 1) fiksacijai naudojamų komponentų skiedimas natrio kakodilato buferiu, 2) optimalus fiksuoto ir inaktyvuoto SS darbinis praskiedimas destiliuotu vandeniu; 3) panoraminio EM rastų infekčių mikrovaizdo sudarymas konkrečiam artritu sergančiam ligoniui.

Technikos sritis

Išradimas susijęs su medicina, konkrečiai - negatyvinio kontrasto elektroninės mikroskopijos (NEM) panaudojimu infektų tyrimui pakenkto sąnario skystyje.

Technikos lygis

Vienos dažniausių autoimuninių lėtinių uždegiminių sąnarių ligų yra sunkiai ir kartais labai ilgai (nuo 6 mėn. iki 2 metų) diagnozuojamas reumatoidinis artritas (RA) ir dažnai laiku neatpažįstami reaktyvieji artritai (ReA), kurių chronizacija sukelia ligoniui sunkias komplikacijas, invalidizaciją ir ankstyvą mirtį.

Dar praeitų metų publikacijose ReA buvo vertinamas kaip autoimuninis sterilus sąnario uždegimas, kurį sukelia nuotolinė infekcija, kurios patogeniniai agentai, gram-neigiamos bakterijos (*Chlamydia*, *Yersinia*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Shigella*, *Escherichia coli* ir kitos) reziduoja ligonio gleivinėse (lytinių takų ir žarnyno) ir nuotoliniu būdu pakenkia sąnarius individų, kurie turi žmogaus leukocitų antigeną (HLA) B27 (Kuuliala K, Orpana A, Leisalo-Repo, Repo H. Neutrophils of healthy subjects with history of reactive arthritis show enhanced responsiveness, as defined by CD11b expression in adherent and non-adherent whole blood cultures. *Rheumatology* 2007; 46(6): 934 – 7; Leisero-Repo M, Hann T, Mattila L. Microbial factors in spondyloarthropathies: insights from population studies. *Curr Opin Rheumatol* 2003; 15; 408 – 12; Garg AX, Pope JE, Thiessen-Philbrook H, Clark WF, Quimet J. Arthritis risk after acute bacterial gastroenteritis. *Rheumatology* 2008; 47(2): 200 - 4.). Manoma, kad net 8 *Influenzavirus* nukleoproteinai tampa specifiški citotoksinių T limfocitų klonams, persirgus natūraliai šią infekciją, ir siejami su HLA B27 artritu, koks dažniausiai yra ReA (Bowness P, Moss PA, Rowland-Jones S, Bell JI, McMichael AJ. Conservation of T cell receptor usage by HLA B27- restricted influenza-specific cytotoxic T lymphocytes suggests a general pattern for antigen-specific major histocompatibility complex class I - restricted response. *Eur J Immunol* 1993; 23(11): 1417 - 2122). Toks T limfocitų klonas yra CD8 limfocitai, randami ReA ligonių sinoviniame skystyje, kurie atakuoja HLA B27 nešiojančių individų *Salmonella* ir *Yersinia* bakterijas ir sukelia artritą (Hermann E, Yu DT, Meyer zum

Biischenfelde KH, fleischer B. HLA-B27-restricted CD8 T cells derived from synovial fluids of patients with reactive arthritis and ankylosing spondylitis. *Lancet* 1993; 342(8872): 646 - 5023).

RA yra nežinomos etiologijos autoimuninė liga sąlygojama sąveikos genetinių ir aplinkos faktorių. Dalis specifinių leukocitų antigenų yra genetiniai RA žymenys, kaip HLA-DR, ypač dvi alelės: HLA-DRB1*04 siejama su ekstrasąnarine RA liga ir reumatoidiniu vaskulitu, o HLA-DRB1*0404 alelė su antikūnais prieš citrulinintą fibrinogeną, kuri peptidylarginino diaminazės paverčia citrulinu (Deighton C, Criswell LA. Recent advances in the genetics of rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Rep* 2006; 8(5): 394 – 400; Auger I, Sebbag m, Vincent C, Balandraud N, Guis S, Nogueira L, Svensson B, Cantagrel A, Serre G, Roudier J. Influence of HLA-DR genes on the production of rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated fibrinogen. *Arthritis Rheum* 2005; 52(11): 3424 – 32). Sergantiems RA dar randami antikūnai prieš citrulinintus I ir II tipo kolagenų ir vimetino telopeptidus (Koivula MK, Aman S, Alasaarela E, Karjalainen, Hakala M, Risteli J. Inhibitory characteristics of citrullinated telopeptides of type I and II collagens for autoantibody binding in patients with Rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2006; 45(11): 1364-9; Vossenaar ER, Despres N, Lapointe E, van der Heijden A, Lora M, Sensshu T, van Venrooij W, Menard HA. Rheumatoid arthritis specific anti-sa antibodies target citrullinated vimetin. *Arthr Res Therapy* 2004; 6(2): R142-R150). Prieš juos, kaip RA autoantigenus, pakenkto sąnario sinovijoje (dangale išklojančiame vidinę sąnario ertmę) pasigamina anticitrulininiai antikūnai, ankstyvi RA ligos klinikiniai žymenys (Poulsom H, Charles PJ. Antibodies to citrullinated Vimetin are a specific marker for diagnosis of Rheumatoid arthritis. *Clin Rev Allergy Immunol* 2008; 34(1): 4-10.). Tiriant anti-CCP AK, retai randamus ligoniams infekuotiems hepatito C virusu (HCV), galima patikimai atskirti reumatologinius požymius ar Sjögreno sindromą sąlygotus HCV nuo RA (Sene D, Ghillani-Dalbin P, Limal N, Thibault V, van Boekel T, Piette JC, Cacoub P. Anti-cyclic citrullinated peptidr antibodies in Hepatitis C virus associated rheumatological manifestations and Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2006; 65(3): 394-7).

Morfologiškai tiriant sinoviją, palisadinė sinovijos fibroblastų (*SF*) proliferacija subsinoviniame sluoksnyje vertinama kaip svarbiausias RA patognominis požymis (Huber LC, Distler O, Tarner I, Gay S, Pap T. Synovial fibroblasts: key players in Rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2006; 45(6): 669-75). Proliferuojantys *SF* užaugina sinovijos panusą, pusiau vėžinį audinį, kuris pasižymi aukštu invazyvumu. *SF* panusas užpildo sąnario ertmę, apkloja sąnarių kremzlinius paviršius, išskiria metaloproteinazes,

kolagenazes, lektinus, chemokinus ir uždegiminius citokinus, kurie suardo hialininę kremzlę, kaulus, sugriauna sąnarį ir sukelia ankstyvą osteoporozę (Tolboom TCA, van der Helm van Mil, Nelissen RGHH, Bredveld FC, Toes REM, Huizinga TWJ. Invasiveness of fibroblast-like synoviocytes is of relevance for the rate of joint destruction in patients with rheumatoid arthritis and is a patients characteristic. *Arthritis Res* 2005; 7(1): P42. doi: 10.1186 / ar 1563). Šis pusiau vėžinis sinovijos panusas, atskiria RA nuo kitų uždegiminių sąnario ligų (Fassbender HG. What destroys the joint in rheumatoid arthritis? *Arch Ortop trauma Surg* 1998; 117(1-2): 2-7). Tik neseniai paaiškėjo, kad RA *SF* turi mutuotą p53 geną, kurio aktyvinimas slopina jų apoptozę, *SF* patiria fenotipinius pokyčius, tampa nemirtingais, pusiau maligniniais, įgyjančiais pre-malignines charakteristikas (Aupperle KR, Boyle DL, Hendrix M, Seftor EA, Zvaifler NJ, Barbosa M, Firestein GS. Regulation of synoviocyte proliferation, apoptosis, and invasion by the p53 tumor suppressor gene. *Am J Pathol* 1998; 152: 1091-8; Müller-Ladner U, Nishioka K. P53 in Rheumatoid arthritis: friend or foe? *Arthritis Res* 2004; 2(3): 175-8). Šios p53 geno mutacijos atsiranda ankstyvose RA ligos stadijose, kai dar nėra tikslios artrito diagnozės, bet egzistuoja per visą RA eigą. Jei p53 nėra mutuotas, jo aktyvinimas skatina *SF* apoptuoti, atstatyti DNR ir apsaugoti sinoviją nuo nesibaigiančios ląstelių proliferacijos ir vėžinės transformacijos.

Kas sukelia ankstyvą sinovijos audinio normalių fibrilinių baltymų citrulininimą ir *SF* geno p53 mutacijas - nežinoma.

2007 m. pasirodė italų reumatologų publikacija, kurioje skelbiama, kad virusų citrulininami peptidai (VCP) sukelia anti-VCP gamybą, o jų IgA izotipas atskiria RA nuo kitų lėtinių artritų (Anzilotti C, Riente L, Pratesi F, Chimenti D, Delle Sedie A, Bombardieri S, Migliorini P. IgG, IgA, IgM antibodies to a viral citrullinated peptide in patients with rheumatoid arthritis, chronic arthritides and connective tissue disorders. *Rheumatology* 2007; 46(10): 1579-82). Virusiniai komponentai ar dalelės, nustatomi sudėtingais molekulinės biotechnologijos metodais, siejami su RA ir kitomis autoimuninėmis ligomis. Su RA siejami: *Parvovirus B19* VP ir NS1 genai (Peterlana D, Puccetti A, Beri R, Ricci M, Simeoni S, Borgato L, Scilanga L, Ceru S, Corroche R, Lunardi C. The presence of Parvovirus B19 VP and NS1 genes in synovium is not correlated with Rheumatoid Arthritis. *J Rheumatology* 2003; 30: 1907 - 10. Lehmann HW, Knöll A, Küster RM, Modrow S. Frequent infection with viral pathogen, parvovirus B19, in rheumatic diseases of childhood. *Arthritis Rheumatism* 2003; 48(6): 1631-8. Mayer O. Parvovirus B19 and autoimmune diseases. *Joint Bone Spine* 2003; 70(1): 6-11), *Epstein-Barr* virusas (Balandraud N, Meynard JB, Auger I, Sovran H, Mugnier B, Reviron D,

Roudier J, Roudier C. Epstein Barr virus load in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis: accurate quantification using real-time polymerase chain reaction. *Arthritis Rheumatism* 2003; 48(5): 1223-8.), A-tipo retrovirusai (*Lentivirus*), kurių net 6% endogeninės retrovirusinės (ERVs) sekos yra inkorporuota į žmogaus genomą, o HTLV-1 viruso endogeninį retrovirusinį L1 elementą ekspresuoja RA sinoviocitai-A, panuso invazijos į kremzlę vietos (Sander DM, Szabo S, Gallaher WR, Deas JE, Thompson JJ, Cao Y, Luo-Zhang H, Liu LG, Colmegna I, Koehler J, Espinoza LR, Alexander SS, Hart DJ, Tom DM, Fermin CD, Jaspan JJ, Kulakosky PC, Tenenbaum SA, Wilson RB, Garry RF. Involvement of human intracisternal A-retroviral particles in autoimmunity. *Microsc Res Tech* 2005; 68(3-4): 222-34; Carty SM, Snowden N, Silman AJ. Should infection still be considered as the most likely triggering factor for rheumatoid arthritis. *J Rheumatology* 2003; 30: 425-9). Su kitais virusiniais elementais, tokiais, kaip žmogaus intracisterninė A-tipo retrovirusinė dalelė HIAP-II, siejami AK prieš DNR teigiamumas, sergant RA ir sisteminė raudonąja vilklige (SRV).

Epstein-Barr virusas (EBV) siejamas ne tik su RA, bet ir kitomis reumatinėmis ligomis SRV, Kawasaki liga. Persirgus EBV infekcija, ji išsivysto į visą gyvenimą persistuojančią infekciją net 90% pasaulio populiacijai. Latentiniai genai ant EBV asocijuoja su limfoepitelinėmis karcinomomis (ryklės, tonzilių, skrandžio, seilių liaukų, plaučių ir burnos ertmės). EBV genomas turi 5 miRNR, kurios arba kuri nors viena atakuoja ląstelių, ypač B limfocitų receptorių aktyvinančią imuninę sistemą, kuo aiškinamas su EBV siejamų limfomų atsiradimas (Burkito ir Hodžkinso). EBV miRNR atakuoja ir vėžio supresorinį geną p53, dar vadinamą genomo karaliumi, ir sutrikdo ląstelių apoptozę (Epstein-Barr viruses. Google <http://focosi.immunesig.org/EBV-1.gif>). Gal būt, taip yra sergantiems RA, kai sinovijos subsinovinio sluoksnio *SF* įgyja mutotą p53 receptorių, praranda gebėjimą apoptuoti, tampa nemirtingais, proliferuodami užaugina sinovijos panusą savo fermentais ir mediatoriais sugriaunanti sąnario hialininę kremzlę ir patį sąnarį.

Be to, sergantieji RA ir neuždegiminėmis raumenų-skeleto ligomis dažniau serga *Herpes zoster* virusine infekcija, nepriklausomai nuo gydymo būdo (Wolfe F, Michaud K, Chakreavarty EF. Rates and predictors of Herpes Zoster in patients with rheumatoid arthritis and non-inflammatory musculoskeletal disorders. *Rheumatology* 2006; 45(11): 1370-5), tad sergamumas negali būti siejamas su imuniteto nuslopimu vaistais.

Mikrobai (*Mycoplasma*, *Chlamydia*, *Proteus mirabilis*, *Borrelia*, *Acinobacter*) taip pat įtariami sukeliantys RA (Taylor-Robinson D. *Mycoplasmas* in rheumatoid arthritis

and other human arthritides. J Clin Pathol 1996; 49:781-2.; Schaefferbeke T, et al. Mycoplasma fermentans but not M. penetrans, detected by PCR assays in synovium from patients with rheumatoid arthritis and other rheumatic disorders. J Clin Patol 2006; 49: 824-8; Villareal C, Whittum-Hudson JA, Hudson AP. Persistent Chlamydiae and chronic arthritis. Arthritis Res 2002; 4: 5-9). Jie pagamina didžiulius kiekius mikrobinių liposacharidų (LPS), kurių randama sinovijos ekstraktuose. LPS gali surišti prokolagenus sudarydami prokolageno endotoksino kompleksus ir blokuoti tropokolageno sintezę sinovijos RA SF ląstelėse, skatinti metaloproteinazių ir kolagenazių gamybą. Pagaliau, skirtingi Borelijų genomai (*Borrelia Burgdorferi*, *B.afzelii*, *B.garinii*) sukelia sąnarių pakenkimą-poliartritą, labai panašų į RA, minkštųjų audinių pakenkimą, vadinamą *Erythema migrans*, sklerodermiją (Forlow J, Postic D, Smith KL, Jay Z, Baranton G, Keim P. Strain typing of *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia afzelii*, and *Borrelia garinii* by using multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. J C M (Journal Clinical Microbiology) 2002; 40(12): 4612-18).

Atlikus labai sudėtingą RA SF ekspresuojamų baltymų - proteosomų mRNR analizę masės spektrometru, buvo rasta 260 baltymų, kaip potencialių RA autoantigenų, iš jų 29 buvo ypač aktyvūs RA ligoniams, tarp jų BiP, colligin, HCgp-39 (Dahlmann B. Role of proteosomes in disease. BMC Biochemistry 2007; 8(Suppl 1): S3.doi:101186/147-2091-8-S1-S3). Pastarasis lektinas sulimpa su chititiniųjų patogenų (grybelių ir nematodų) chitino-tipo ligandais formuojant įgimtą imunitetą; lektiną sintezuoja RA sinoviocitai ir chondrocitai, makrofagai ir lygiųjų raumenų ląstelės. Taigi, neatmetamas grybelių ir nematodų etiopatogeninis vaidmuo sukeliant RA.

Infekcinę RA kilmę netiesiogiai rodo Toll tipo (TLR) receptorių gausa sinoviocitų paviršiuje. TLR turi informaciją apie tikslią patogenų kilmę, o imuninė sistema atsako į juos tam tikrais reagavimo būdais. Jei šis atsakas nėra tinkamai kontroliuojamas, išsivysto lėtinė uždegiminė liga. Dešimt TLR receptorių nustatyti žmogui pastaruoju metu. Trys jų: TLR4 atpažįsta gram-neigiamų bakterijų lipopolisacharidus (LPS), sukelia septinį šoką ir dešimt tūkstančių mirčių kasdieną. TLR3 sensibilizuoja virusinę dvispiralę RNR ir sukelia 1-o tipo interferonų (IFN α ir IFN β) - antivirusinių agentų gamybą, be to, TLR3 aktyvina dendritinių ląstelių diferenciaciją ir brendimą ir pradeda adaptacinį imunitetą; TLR2 aktyvuoja para-vietas, yra aptinkamas ant RA SF ir ilgai išlieka aktyvuotas (O'Neil LAJ. Innate immunity and Toll-like receptors. Arthritis Res Ther 2004; 6(Suppl 3): 42).

1959 m. Brenner ir Horne įvedė neigiamą dažymą, kuris sukėlė tikrą revoliuciją virusų elektroninėje mikroskopijoje (EM) (Brenner S, Horne RW. A negative staining

method for high resolution electron microscopy of viruses. Biochimical Biophysic Acta 1959; 34: 103-10). Išstobulius negatyvinio dažymo metodą per kelis metus gauta daug informacijos apie virusų struktūrą ir atrasti nauji virusai (Gentile M, Gelderblom HR. Rapid viral diagnosis: role of electron microscopy. The new Microbiologica 2005;28: 1-12). Pagaliau galima buvo nustatyti virusų komponentų terminiją ir juos apibūdinti morfologiškai.

Aukščiau pateikti literatūros duomenys paskatino sinovinio skysčio (SS) tyrimui naudoti NEM technologiją, tyrimo protokolą pritaikyti SS tyrimui ligoniams sergantiems RA ir ReA, gavus Lietuvos etikos komiteto leidimą. Literatūroje neaptikta darbų apie SS tyrimą NEM metodu, ieškant infekto artritų galimų sukėlėjų, išskyrus netiesioginius radinius apie infekto (virusų) DNR tyrimus labai sudėtingais molekulinės biotechnologijos metodais sinovijos audinyje ir SS ligoniams susirgus ankstyvais artritais (Stahl HD, Hubner B, Seidl B, Liebert UG, van der Heijden IM, Wilbrink B, Kraan MC, Emmrich F, Tak PP. Detection of multiple viral DNA species in synovial tissue and fluid of patients with early arthritis. Ann Rheum Dis 2005; 59, 342-6). Sinovitas reiškiasi sinovinio skysčio (SS) pagausėjimu sąnario ertmėje (nuo 2 cm³ iki 10, 20, 50 kartų). Sergantiems RA ar ReA iš pakenkto sąnario SS punktuojamas diagnostikos tikslais, po to sąnario ertmė išplaunama, į sąnario ertmę suleidžiama vaistų.

Išradimo esmė

Šiame išradime pasiūlyta RA ir ReA ligonių sinovinio skysčio (SS) tyrimui naudoti negatyvinio kontrasto elektroninės mikroskopijos (NEM) būdą. Tyrimo tikslas - kuo anksčiau identifikuoti infekto, galimus artritą sukėlėjus. Būdo esmė - tinkamas SS paruošimas NEM tyrimui: 1) fiksacijai naudojamų komponentų skiedimas kakodilato buferiu, vietoje naudojamo fosfatinio (PBS) buferio; 2) optimalus fiksuoto ir inaktyvuoto SS darbinis praskiedimas (1:50-250); 3) panoraminis infekto EM mikrovaizdų sudarymas konkrečiam artritui sergančiam ligoniui.

SS tyrimas, panaudojant NEM technologiją, atskleidė panoramą infekto, galimai dalyvaujančių artritų (RA, ReA) etiopatogenezeje, leido nustatyti jų rūšis. NEM būdas parodė, kad artritą galimai sukelia ne vienas infekto, bet visa puokštė virusų (nuo 2 iki 5 skirtingų rūšių, tarp jų agresyvūs onkovirusai), mikrobai, bakterijos, grybeliai ir parazitai, reziduojantys sąnario skystyje daugumai tirtų ligonių, tarp jų sergantiems ReA. Tai duoda klinikistui galimybę anksti atskirti šias dvi ligas ir koreguoti diagnozę, taikyti specifinį

gydymą infektais eradikuoti, išvengti artrito chronizacijos, brangaus gydymo, naudojamo dabartiniu metu sergančiam, dažnai visą likusį gyvenimą, grėsmingų komplikacijų ir ankstyvos mirties. SS tyrimas NEM modifikuotu būdu yra vertingas ir informatyvus, trunka ne daugiau 20 minučių nuo medžiagos pristatymo į EM laboratoriją iki teigiamo atsakymo.

Išradimo realizavimo aprašymas

VU EKMI Eksperimentinių Tyrimų (ET) skyriuje NEM tyrimai vykdomi nuo 2000 metų, pradėjus dalyvauti Roberto Kocho Virusologijos Instituto (RKI, Berlynas) organizuojamose Išorinės kokybės kontrolės schemose (EQA-VEM). RKI dukart per metus atsiunčia į VU EKMI ET skyrių po 6 nežinomus virusų pavyzdžius, kurie ištiriami NEM būdu, apibūdinami ir atsakymai siunčiami atgal į RKI ekspertų įvertinimui. Keli posteriai buvo skelbti Pasaulio Mikroskopijos Kongresuose: (Graziene V, Povilenaite D, Butrimiene I. Virus particles in synovial fluid of patients with various rheumatic disorders. A Conference on Modern Microscopic Methods 2001; Innsbruck, Austria. Graziene V, Povilenaite D, Butrimiene I. Virus particles in synovial fluid of patients with nondifferentiated arthritides. 16th International Microscopy Congress (IMC16) 2006; Sapporo, Japan), kurie rėmėsi preliminariais virusų NEM tyrimais SS, ligoniams sirgusiems įvairiais artritais. Deja, tik kompiuterinis panoraminių vaizdų sudarymas iš ant specialių Kodak fotoplokštelių EM nufotografuotų infekto pavyzdžių konkrečiam ligoniui atskleidė tikrą infekto panoramą, randamą SS sergantiems RA ar ReA.

Prieš NEM tyrimą atliekami šie paruošiamieji darbai:

- Paraminių varinių tinklelių diagnostinei NEM paruošimas:

Varinių tinklelių valymas, padengimas polimerine formvaro (ištirpinto dichloretano tirpiklyje) plėvele, tinklelių su polimerine plėvele padengimas anglies dulkėmis aukšto voltažo (5×10^{-6} mbar) Vaakumo poste (anglies dulkių sluoksnis turi būti nuo 2 iki 10 nm storio, šviesus-vidutiniškai pilkas); elektrostatinio krūvio pašalinimas, hidrofilinant anglies dulkių paviršių, atliekamas merkiant į 1% Alciano mėlio ar kitą tirpalą, yra svarbiausia dalelių adsorbcijos (prilipimo) prie tinklelio ir NEM dažų (ypač uranil acetato (UA) tolygaus pasiskirstymo ant pavyzdžio sąlyga. Hidrofiliškumo

pagrindas yra krūvis ant anglies paviršiaus, turi būti kaskart tikrinamas prieš negatyvinį dažymą (lašas bidestiliuoto vandens nuo tinklelio krašto turi tolygiai pasklisti ant plėvelės paviršiaus, jį nusauginus filtrinio popieriaus juostele, ant tinklelio paviršiaus turi likti šiek tiek vandens).

- Negatyvinių dažų paruošimas:

Uranil acetatas (UA): CH_3COOH)₂ $\text{UO}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (0.2 iki 2.0%), UA skiedžiamas 1% bidestiliuotu vandeniu, steriliai nufiltruojamas, pH 4,5 priartinamas 1N NaOH; laikomas tamsoje porcijomis po 1,5 ml plastikiniuose mėgintuvėliuose. Prieš dažant centrifuguojamas prie 15.000 rpm 2 minutes.

Fosforovolfraimo rūgštis (PTA): $\text{H}_3(\text{P}(\text{W}_3\text{O}_{10})_4 \times \text{H}_2\text{O}$, iki 1% skiedžiama bidestiliuotu vandeniu, pH 7,1 (beveik neutralaus) priartinamas 1N NaOH. Steriliai nufiltravus, laikoma tamsoje 1,5 ml porcijomis, prie +4 C. Prieš naudojimą centrifuguojama prie 15.000 rpm 2 minutes.

Dažai daug stabilesni EM mikroskopo elektronų srautui už UA dažus, ypač naudojant mažesnius EM padidinimus. PTA tirpalas išlieka stabilus ilgesnį laikotarpį, jei išvengiama kontakto su CO_2 skiedimo metu.

Tiriant virusus ir mikrobus pavyzdžiai būtinai dažomi abiem dažų tirpalais: keli tinkliukai su skirtingais SS praskiedimais nudažomi UA, keli PTA. UA tinka aukštai įtampai ir virusų kontrastui, stabilizuoja membranas. PTA dažai pašalina vidinius virusų ir mikrobo komponentus, nes labilizuoja membranas (pvz. poksvirusų).

- Sinovinio skysčio (SS) paruošimas NEM tyrimui: fiksacija ir infekto inaktyvacija:

SS fiksuojamas pagal protokolą. Paruošiamos pipetės, Petri lėkštelės, pincetas, tinkliukų saugojimo dėklas ir t.t.

Dažniausiai fiksuojama: *gliutaraldehido* (GA) 0.5 - 2% skiestu fosfatiniu (PBS) ar HEPES buferiais ir *paraformaldehido* (PFA) fiksatoriumi. GA yra dialdehidas, inaktyvuoja ir morfologiškai stabilizuoja bakterijų ir virusų apvalkalus prieš negatyvinį dažymą (NEM), bet gali kryžmiškai sujungti amino grupes pavyzdyje ir suklijuoti pavyzdžio detritą su agentu, kurio ieškoma. Todėl GA fiksatorius paprastai gaminamas prieš fiksaciją. Dažniausiai skiedžiant fiksatorius PBS buferiu GA + PFA fiksatorius sąveikauja ir stabilizuoja pavyzdžio antigenus, ypač jei po to reikia atlikti virusų ir

bakterijų imuno-EM. Tačiau PBS buferis dažnai palieka fosfatų nuosėdas ant pavyzdžio ir būna klaidingų interpretacijų priežastimi.

Ligonių SS fiksuojamas 1% GA ir 4% paraformaldehido fiksatoriumi, skiedžiant gamyklinius 25% GA ir 10% PFA ne PBS, bet *Na kakodilato buferyje* [$\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$], su 0.1% CaCl_2 . PFA tirpinamas Na kakodilato buferiu, pakaitintu iki $+65^\circ\text{C}$, vandens vonelėje, kratant (ne mažiau 30-45 min). Pabaigoje į karštą tirpalą praskaidrinimui įlašinami 2 lašai 10N NaOH. Tirpalą šaldomas iki kambario temperatūros, pH 7,2 pasiekiamas, atsargiai lašinant 1N HCl. *Na kakodilato* buferio privalumai: 1) leidžia išvengti netirpių kalcio fosfato precipitātų susidarymo, naudojant PBS, pastarieji dažnai padengia ieškomas daleles ir padaro jas sunkiai matomas EM; 2) Na kakodilato buferis inaktyvuoja mikrobų augimą net laikomas metus laiko, priešingai PBS, kuris laikomas ilgesnį laiką pasidengia grybeliniu apnašu; 3) Na kakodilato buferiu praskiestas GA duoda smulkesnį grūdėtumą EM, nei praskiestas PBS. Vienintelis kakodilato buferio trūkumas yra arseno druskos toksiškumas. Beje, visos kitos NEM technologijai naudojamos cheminės medžiagos GA, UA, Na kakodilato trihidratas, Na azidas, dichloretnas (paraminių plėvelių gamybai) yra labai toksiškos ir žymimos kaip pavojingos. Būtina sąlyga laikymui ir darbui yra traukos spinta.

Inaktyvuojant infekto augimą ir gyvybingumą, pavyzdys dar palaikomas Na azido (NaN_3) tirpale (1% NaN_3 praskiestas bidestiliuotu vandeniu iki darbinio tirpalo 0,02%).

Fiksuotas ir inaktyvuotas SS laikomas šaldytuve prie $+4^\circ\text{C}$. Darbinę SS suspensiją ruošiant NEM dažymui, SS skiedžiamas 50–200–250 kartų destiliuotu vandeniu, priklausomai nuo skysčio klampumo, kuris savo ruožtu, priklauso nuo uždegimo aktyvumo sinovinėje membranoje, pagaminamų baltymų, įvairių uždegiminių mediatorių (citokinių, chemokinių, antikūnų, antígeno-antikūnų baltyminių kompleksų, ląstelių, riebalų ir t.t.). Transportuojant ir paruošimo metu SS laikytinas šaltai, bet neužšaldomas. Stambesnės priemaišos iš praskiesto SS prieš pat NEM dažymą pašalinamos centrifuguojant mažo greičio centrifugoje (2.000 iki 3.000 rpm/min apie 10 min.), pakartojant procedūrą.

- SS suspensijos NEM dažymas:

Traukos spintoje patiesiamas Parafilmo lakštas, kaip dėklas, negatyvinio dažymo procedūrai atlikti.

SS praskiedžiamas 1:50-250 kartų bidestiliuotu vandeniu, stambesnės priemaišos pašalinamos, centrifuguojant mažo greičio centrifugoje (2.000-3.000 rpm apie 10 min.), pakartojant procedūrą.

Uždedamas skaidraus supernatanto lašas ant Parafilmo, laukiama apie 10 min., kol susidarys ant lašo plėvelė, ant jos uždedamas hidrofiliškas vario tinklelis ir laukiama 10 min. kol suspensijoje esantys infektai adsorbuosis.

Vario tinklelis su adsorbuotais infektais pernešamas ant 50 µl lašo 2% PTA, pH 7,2, tinklelis paliekamas 30 sek. Atatinkamai: dažoma 1 – 2% UA, prieš tai išvalant pavyzdžio fosfatų jonus, jei naudotas PBS, bidestiliuoto vandens 3-5 lašuose.

Dažų perteklius pašalinamas nusauginus filtrinio popieriaus juostele ir tinkleliai pernešami į Petri lėkštelę, išklota filtriniu popieriumi, sunumeruojami pagal laboratorijos protokolą.

Kol tinklelis tikrinamas EM, pavyzdžio lašas laikomas ant Parafilmo, apdengtas nuo dulkių ir išdžiūvimo. Tai padeda sutrumpinti preparato paruošimo laiką, jei reikia papildomai paruošti ir nudažyti SS pavyzdžius ant vario tinklelių.

Nudažyti pavyzdžiai laikomi tinklelių specialiuose dėkluose, sunumeruoti pagal tyrimo protokolą iki EM tyrimo.

SS pavyzdžių tyrimas EM

Pavyzdžiai ištirti JEM100B elektroniniu mikroskopu, prie padidinimo 80 000 kartų, infekto vaizdai fotografuoti Kodak EM fotoplokštelėse.

Išryškinti ir fiksuoti fotoplokštelių negatyvai perkeliama į kompiuterį. Kiekvieno ligonio skirtingų infekto vaizdai iš plokštelių fotopozityvų kompiuteryje iškerpami ir sumontuojamas kiekvieno ligonio visų infekto, rastų SS, panoraminis vaizdas.

Infektai išmatuojami ultrastruktūrinių dydžių matuokliu, apibūdinami pagal šeimininką, dydį (diametrą), formą, struktūrinius požymius (simetriją, apvalkalą, nukleosomą, kapsomerus ir jų išmatavimus, spaikus, gaurelius), naudojant virusų kompiuterines programas.

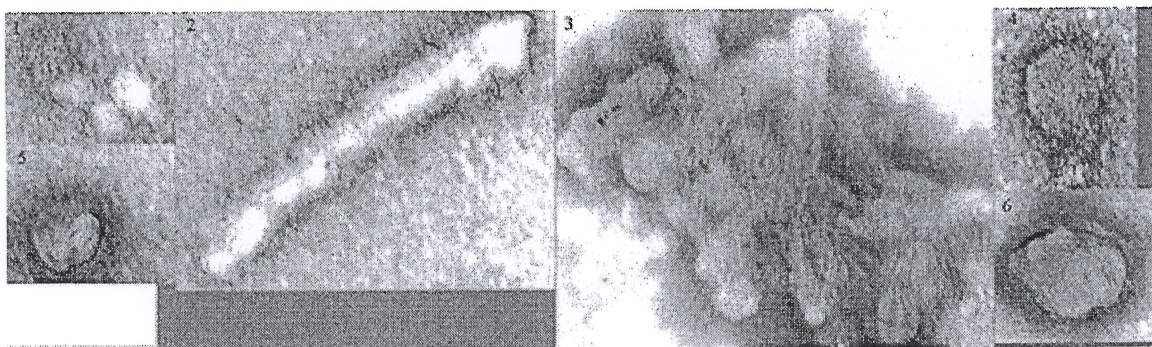
Panoraminis infekto vaizdas leido susidaryti pilną visų infekto, randamų konkretaus ligonio sergančio RA ar ReA sinoviniame skystyje, vaizdą. Tuo tarpu, ieškant infekto sąnarių skystyje klinikiniais ar molekulinės biotechnologijos metodais (PCR, imunoEM, genetinių žymenų) galima aptikti tik vieno infekto vieną žymenį. Gauti infekto, rastų ligonių sergančių RA ir ReA, SS panoraminiai vaizdai leido suabejoti artrito

diagnoze ir taikomu gydymu ir ateityje juos koreguoti, įdiegus NEM tyrimo būdą į praktiką. Mokslininkams-reumatologams teoretikams atvėrė galimybę tikslinti RA ir ReA etiopatogenezę, o vaistų kompanijoms - kurti naujus vaistus infekto eradikavimui ankstyvose artrito stadijose, kol liga neperėjo į lėtinę sisteminę autoimuninę fazę ir nesukėlė nepagydomų komplikacijų.

Konkretūs šio išradimo NEM būdo realizavimo rezultatai

Panoraminiai vaizdai infekto RA ligonių sinoviniame skystyje:

RA. Ligonė Nr.2, kodas (AG)



1 (UA) dalelė 20-25 nm diametro, simetrija icosohedrinė, be apvalkalo, nukleokapsidė apvali 18-22 nm diametro, kapsomerai nematomi. Įtariamas *Parvovirus B19*.

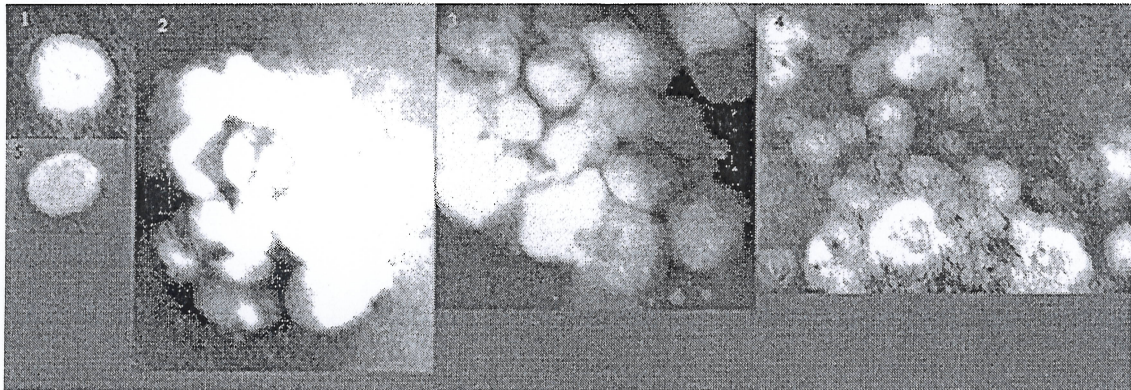
2 (UA) ir 3 (PTA) bakterijų sanaua 45 nm diametro, 362 nm ilgio. Matoma kapsulė, sienelė, plazminė membrana, ribojanti optiškai šviesų citoplazmos turinį. Bakterijų sanauoje nėra grandinėlių, kai kur išryškėja nukleoidas (PTA). Įtariama *Yersinia enterocolytica*.

4 (UA) ir 5 (PTA) dalelės 70-90 nm diametro, apvali taisyklinga icosohedrinė simetrija, izometriškas, nukleosoma 8-9 nm izometriška, smulkūs filamentai. Įtariamas *Adenovirus*.

6 (PTA) 100 nm diametras, 130 nm ilgis, kiek pleomorfiškas su apvalkalu, nukleokapsidė izometriška (106-112 nm), simetrija icosohedrinė. Įtariamas *Herpesvirus*.

IŠVADA: *Yersinia enterocolytica* bakterija ir 3 virusai (*Parvovirus B19*, *Adenovirus*, *Herpesvirus*).

RA. Ligonė Nr.6, kodas (LK).



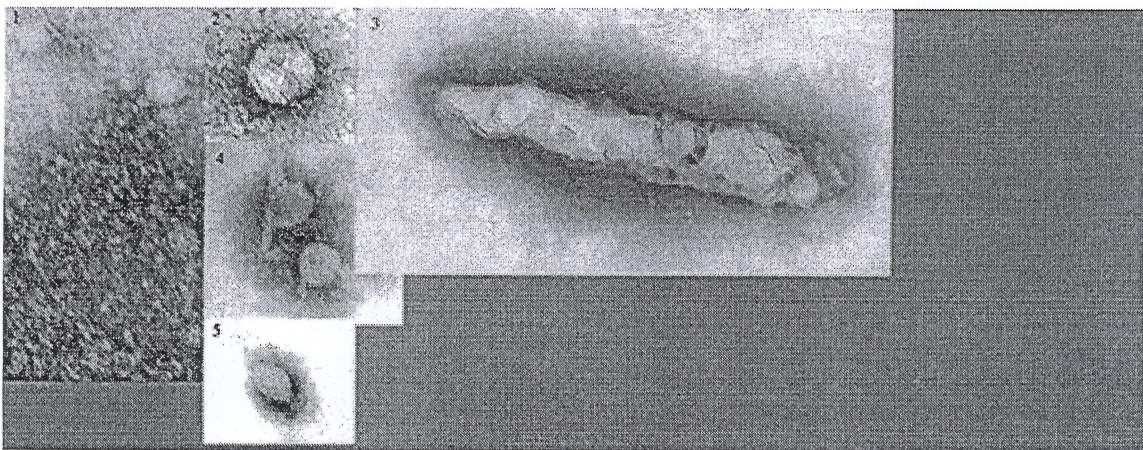
1 (UA) ir 3 (PTA) sandaupa 70-90 nm diametro, izometriški, be apvalkalo, simetrija icosohedrinė, nukleokapsidė aplipusi kapsomerais (UA). Įtariamas *Adenovirus*.

2 (PTA) sunkiai aprašomų dalelių sandaupa.

4 (PTA) ir 5 (UA) sandaupa. 62 nm diametro sferoidas, be projekcijų, su 12 nm diametro apvalkalu, nukleokapsidė izometriška, polihedrinė. Įtariamas *Hepatitis C virus* (HCV).

IŠVADA: 2 skirtingi virusai (*HCV* ir *Adenovirus*).

RA. Ligonė Nr. 7, kodas (AG).



1 (UA) dalelė 20-25 nm diametro, simetrija icosohedrinė, be apvalkalo, nukleokapsidė apvali 18-22 nm diametro, kapsomerai nematomi. Įtariamas *Parvovirus B19*.

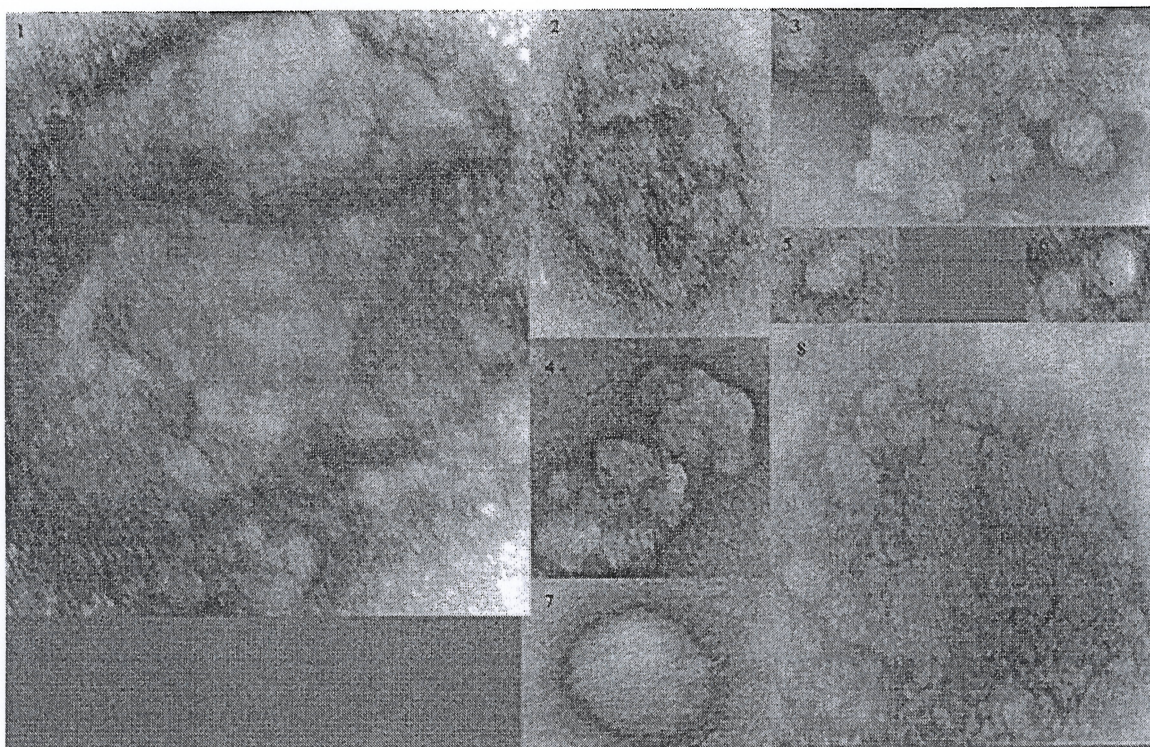
2 (PTA) dalelė 75 nm diametro, izometriška, be apvalkalo, simetrija icosohedrinė, nukleokapsidė aplipusi kapsomerais (UA). Įtariamas *Adenovirus*.

3 (PTA) dalelė: Bakterija 387 nm ilgio, 62 nm diametro, su matoma kapsule ir standžia grumstine sienele. Įtariama bakterija *Helicobacter pylori*.

4 ir 5 dalelės (PTA): 44 nm diametro su apvalkalu ir apvalia nukleosoma, viena, dviem aiškiomis projekcijomis. Įtariami *Flaviridae* (*Hepatitis B virus, HBV?*) šeimos virusai.

IŠVADA: *Helicobacter pylori* bakterija ir 3 skirtingų rūšių virusai (*Parvovirus B19, Adenovirus, HBV?*).

RA. Ligonė Nr.10, kodas (AG).



1 (UA) dalelė stambi pagal dydį (520 X 560nm), labiau panaši į sinovinio skysčio ląstelę.

2 (UA) dalelė pleomorfiška, 200-250 nm diametro. Sudaryta iš susisukusių 25 nm diametro projekcijų ir spaikų. Nukleokapsidė optiškai tamsi, neapibrėžtos formos. Įtariamas *Parainfluenzavirus*.

3 (PTA) dalelių sanauka ir 6 (UA) dalelė. Įtariamas Hepadnavirus šeimos virusas (*HCV*)

4 (UA) dalelė, pleomorfiška, 112 nm X 137 nm, paviršiuje matomi stambūs 50 nm diametro kapsomerai. Nukleosoma šviesi optiškai (gal lipoproteidinis apvalkalas). Įtariamas *Influenzavirus*.

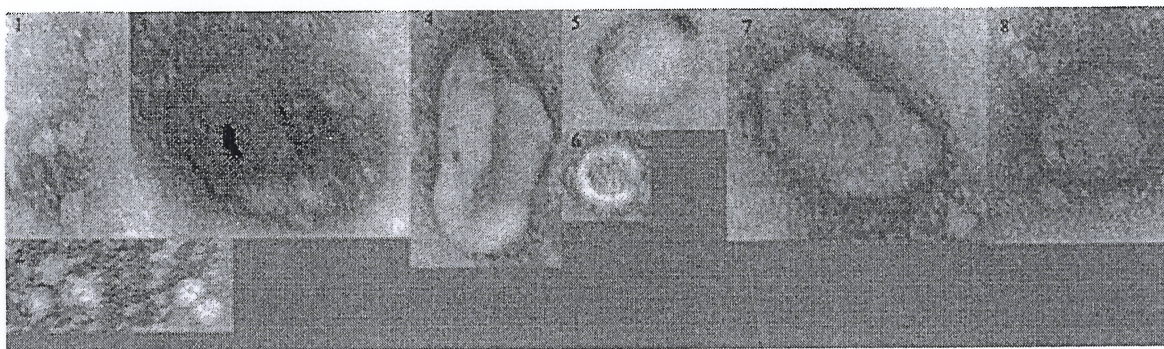
5 (UA) dalelė 50 nm diametro, 62 nm ilgio, ovali su paviršiuje išžiūrimais smulkiais spaikais, nukleosoma optiškai šviesi (lipidų dangalas) neapibrėžta. Nežinomas virusas.

7 (UA) dalelė (106 nm X 144 nm) dydžio ovalas hexagonalinės icozohedrinės simetrijos, su gaureliais paviršiuje, nukleosoma optiškai šviesi (lipoproteidinė) ikozohedrinė (81 X 94 nm). Įtariamas *Epstein Barro virusas*.

8 (UA) dalelė stambi, 330 X 375 nm, kiek ovali, pleomorfiška. Paviršiuje matomi stambūs (44 X 75, 62 X 94, 62 X 75), koncentriškai išsidėstę kapsomerai, nevienalytis apvalkalas ir smulkūs gaureliai. Nukleosoma optiškai tamsi (įtariama icozohedrinė simetrija). Įtariama bakterija *Chlamydia (pneumoniae)*.

IŠVADA: *Chlamydia (pneumoniae)* bakterija ir 6 skirtingų rūšių virusai (*Parainfluenzavirus*, *Influenzavirus* ar *EBV*, *HCV*, neatpažintas virusas).

RA. Ligonė Nr.11, kodas (JČ).



1 (PTA), 2 (UA) dalelės. Įtariamas jau aprašytas *Parvovirus B19*.

3 (UA), 7 (PTA) dalelės. Įtariamas jau aprašytas *Cytomegalovirus (CMV)*.

4 dalelė (UA) suspausta 100 nm diametro 200 nm ilgio ovali dalelė su optiškai šviesiu apvalkalu ir daugybe trumpų spaikų per visą paviršių, sunkiai įžiūrima nukleosoma. Įtariamas *Retrovirus*.

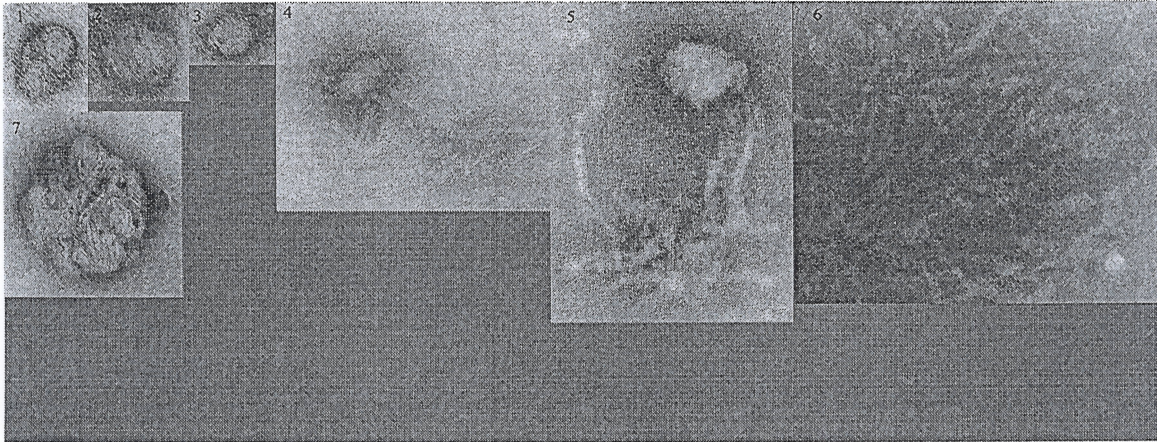
5 dalelė (UA) Įtariamas jau aprašytas *Epstein Barr virus (EBV)*.

6 dalelė (UA) 50 nm diametro ovalas, su matomu apvalkalu optiškai šviesiu aplipusiu trumpais spaikais ir nukleosoma su nukleokapsidėmis. Įtariamas *HCV* (vienspiralinės RNR) virusas.

7, 8 dalelės (UA) Įtariamos *Cytomegalovirus* nukleosomos (100 nm, 80 nm diametro, 125, 175 nm ilgio) icozohedrinės simetrijos.

IŠVADA: 5 skirtingų rūšių virusai (*Parvovirus B19*, *Cytomegalovirus*, *EBV*, *HCV*, *Retrovirus*).

RA. Ligonė Nr.12, kodas (OJ).



1 (PTA) dalelė. Virusas 57 nm diametro, 75 nm ilgio, ovali icosometrinės simetrijos dalelė su apvalkalu ir nukleosoma kuri su optiškai šviesiu apvalkalėliu. Neatpažintas virusas.

2 (PTA) dalelė. Virusas 62,5 nm diametro, 69 nm ilgio, kiek ovalus su gaureliais ir viena projekcija, nukleokapsidė su optiškai šviesiu (lipoproteidiniu) apvalkalu. Įtariamas *Influenzavirus*.

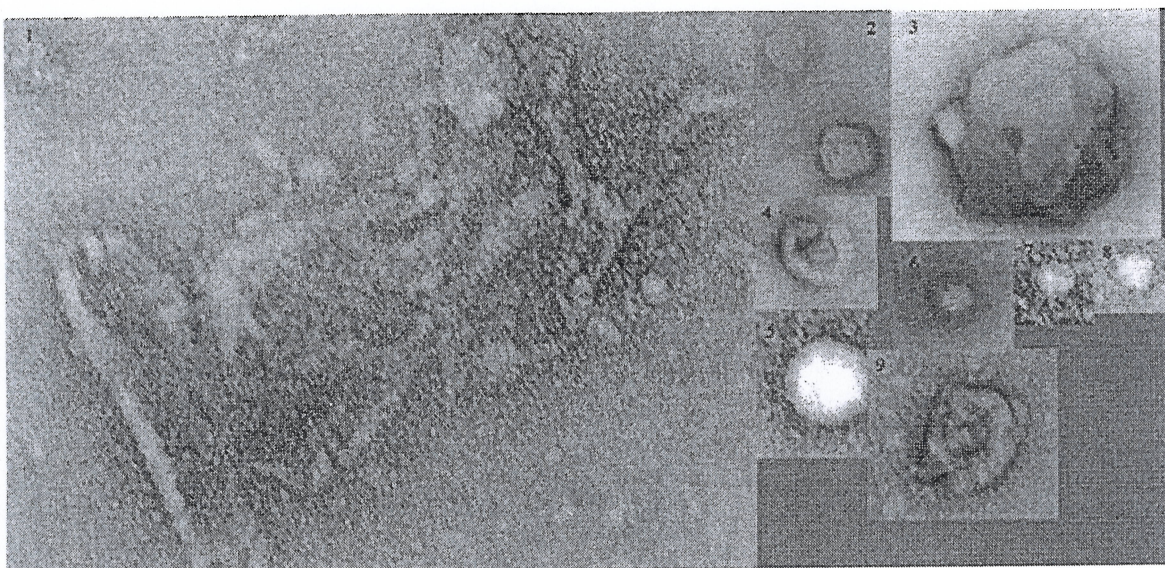
3 dalelė panaši į 4, 5 dalelių bakterijų kūną (37,5 nm diametro, 44 nm, 75 nm ilgio) optiškai šviesią (lipoproteidinę) kapsulę, aptirpusiais žiuželiais. Įtariama bakterija *Escherichia coli*.

6 dalelė. Bakterijų žiuželinis substratas.

7 dalelė (PTA). Virusas 125 nm diametro, kiek pleomorfiškas, su optiškai tamsiu (persisunkusiu dažais) apvalkalu, nukleokapsidė optiškai šviesi, pleomorfiška. Įtariamas *Herpesvirus* virusas.

IŠVADA: bakterija *Escherichia coli* ir 3 skirtingų rūšių virusai (*neatpažintas virusas*, *Influenzavirus*, *Herpesvirus*) ir žiuželinis bakterijos substratas.

RA.Ligonė Nr. 15, kodas (GOB).



1 (UA) dalelė, bakterija vingiuotu kūnu, aptirpusia kapsule. Įtariama *Borrelia Burgdorferi*.

2 dalelė (PTA). Virusas 30 nm, 44 nm diametro 44 nm, 50 nm ilgio kiek ovali dalelė, su apvalkalu ir ovalia icosohedriškos simetrijos nukleosoma. Įtariamas *HCV* (Flaviridae šeimos virusas) .

3 (PTA) virusas 162 nm diametro, 187 nm ilgio, kiek ovalus icozohedrinės simetrijos, su apvalkalu, pleomorfiška nukleosoma su optiškai šviesiais keliais kūneliais ant apvalkalo. Įtariamas *Herpesvirus*.

4 dalelė (PTA) 57 nm diametro, 75 nm ilgio, kiek ovali icosohedriškos simetrijos su apvalkalu 12,5 nm diametro, optiškai šviesiu (lipoproteidiniu) apvalkalu ir nukleosoma, persunkta dažais. Įtariamas *Influenzavirus* (*Orthomyxoviridae* šeima).

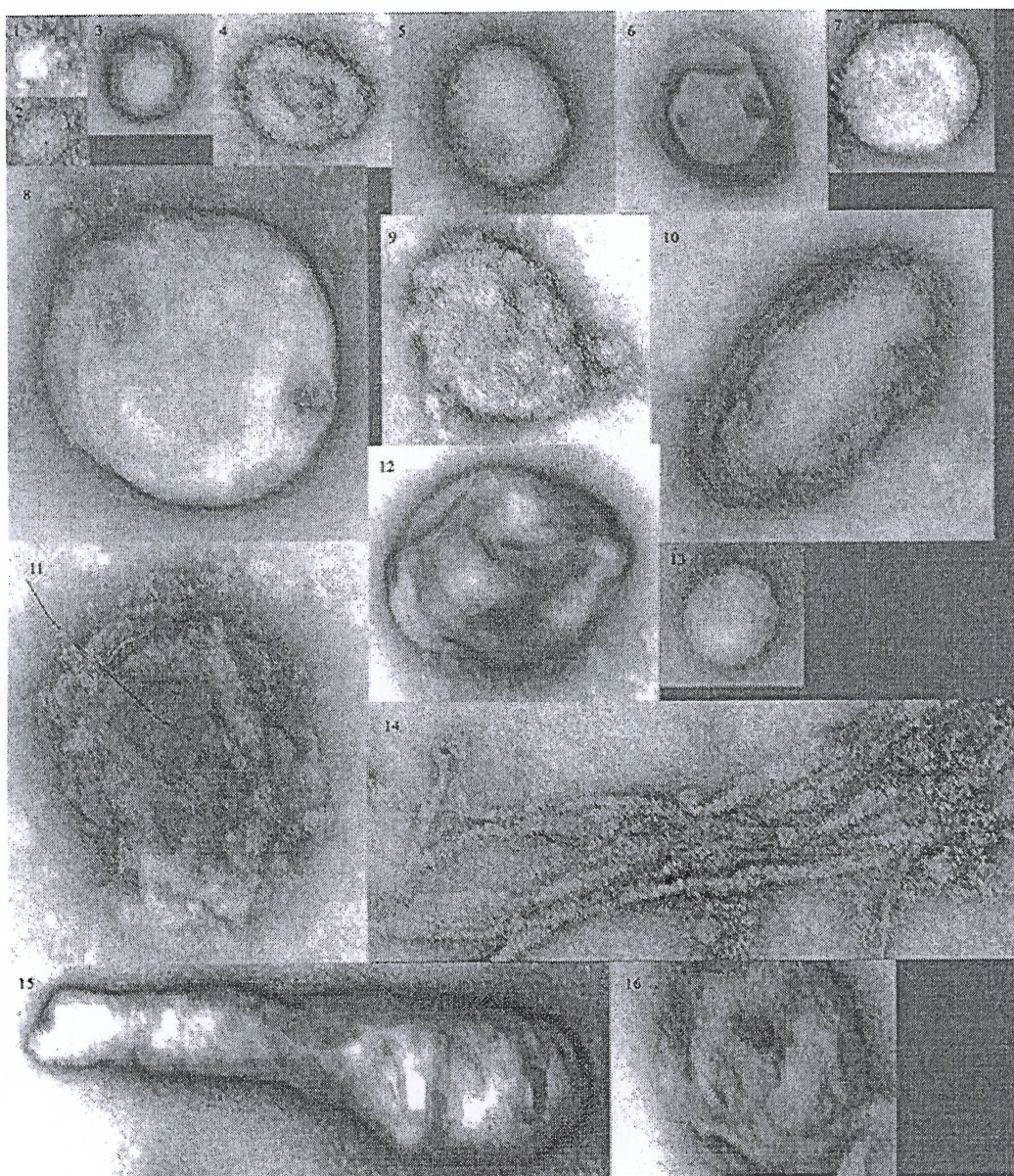
5(UA) dalelė. Virusas 75 nm diametro, icosohedriškos simetrijos, su optiškai šviesiu apvalkalu (lipoproteidiniu), pilnai padengtu smulkiais kapsomerais. Įtariamas *Adenovirus*.

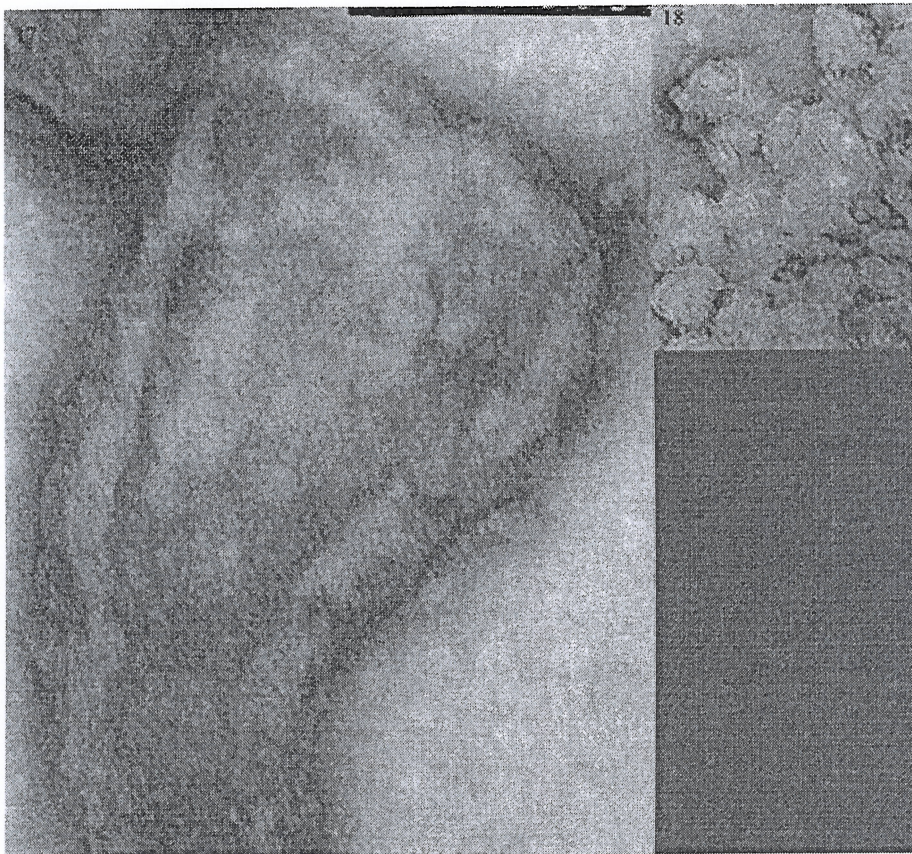
6 (PTA) ir 7 ir 8 (UA) dalelės. Virusas. Įtariamas jau aprašytas *Parvovirus B19*.

9 (UA) dalelė. Virusas 87 nm diametro, 94 nm ilgio, su apvalkalu (iki 19 nm diametro), aplipusiu smulkiais gaureliais, apvalia nukleosoma. Įtariamas *Influenzavirus*.

IŠVADA: *Borrelia Burgdorferi* bakterija ir 5 rūšių virusai (*HCV*, *Herpesvirus*, *Adenovirus*, *Parvovirus B19*, *Influenzavirus*).

RA. Ligonė Nr.21, kodas (G).





1, 2 (UA) ir 18 (PTA) 50 nm diametro, apvalkalas aplipęs smulkiais spaikais, su polihedriniu nukleosoma. Įtariamas *HBV*?

3 (PTA) 87 nm virionas icosohedrinės simetrijos su dažais persunktu apvalkalu ir lipoproteidiniu apvalkalu nukleokapside. Įtariamas *Influenzavirus*.

4 (UA) 125 nm diametro 150 nm ilgio ovoidas, storu apvalkalu ir pleomorfinu nukleokapside, abu aplipę spaikais,

Įtariamas *Rhinovirus* (*Picornaviridae* šeimos).

5 (UA), 6 (PTA), 13 virionai 137,5 nm, 165 nm diametro, 162,5 nm, 200nm ilgio ovoidas ir 100nm diametro nežymus ovoidas aplipęs tolygiai aiškiais kapsomerais (UA), ir spaikais su apvalkalu, icosohedrinės simetrijos nukleosoma. Įtariamas *Herpesvirus*.

7 (UA) ir 8 (PTA) 150nm ir 312,5 nm diametro sferoidai, pirmasis tolygiai aplipęs ir spaikais, antrasis lipoproteidiniu apvalkalu su 2 matomais dažų prisigėrusiais kūneliais. ?

9 (UA) neapibrėžtų dalelių sanakaupa.

10 (UA) 200 nm diametro ir 337,5 nm ilgio ovoidas su dažais persunktu apvalkalu ir optiškai šviesia lipoproteidine nukleosoma, aplipusia smulkiomis nukleokapsidėmis.. ?

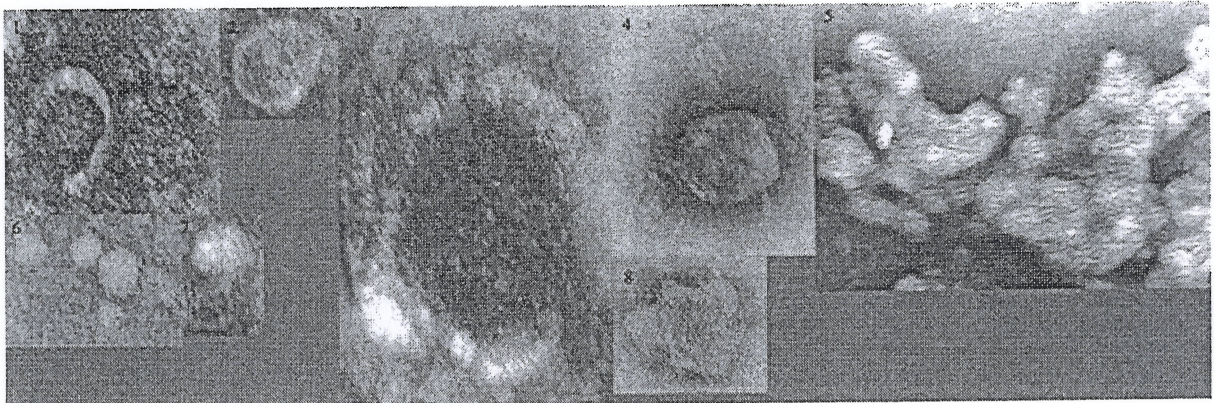
11, 16 (UA) 312 nm diametro, 375 nm ilgio kamuoliuose susisukę pleomorfiški filamentai 25 nm skersmens, dalis šakojasi. Virionas be apvalkalo. Prasišviečia nukleokapsidė tankia šerdinio. Įtariami *Paramyxoviridae*.

14 (UA) Įtariami ilgi *Candida albicans* hifai.

12, 15, 17 (UA) įtariami Protozoa parazitai *Toxoplasma gondii*.

IŠVADA: *Candida albicans*, *Toxoplasma gondii* ir 5 skirtingi virusai (*Paramyxoviridae*, *HBV*, *Influenzavirus*, *Herpesvirus*, *Rhinovirus*).

RA. Ligonė B-790, kodas (OP).



1 ir 2 (UA) dalelės, 44 nm diametro, 62.5 ilgio ovalas (112 X 62.5 ilgio) su optiškai šviesiu apvalkalu nuo 12.5 iki 25 nm diametro be projekcijų, nukleosoma 56 X 75, icozohedriška su smulkiomis nukleokapsidėmis. Įtariamas *HCV*.

3 (UA) dalelė, stambi 237 nm, diametro 312 nm ilgio, icozohedrinės simetrijos ovalas su apvalkalu (nuo 19 iki 31 nm diametro), aplipęs aiškiai matomais gaureliais. Nukleosoma icozohedrinė 137 X 230 nm dydžio su nukleokapsidėmis ir keliais lipoproteidiniais kūneliais. Įtariamas *Cytomegalovirus*.

4 (PTA) dalelė. Įtariamas jau aprašytas *Adenovirus*.

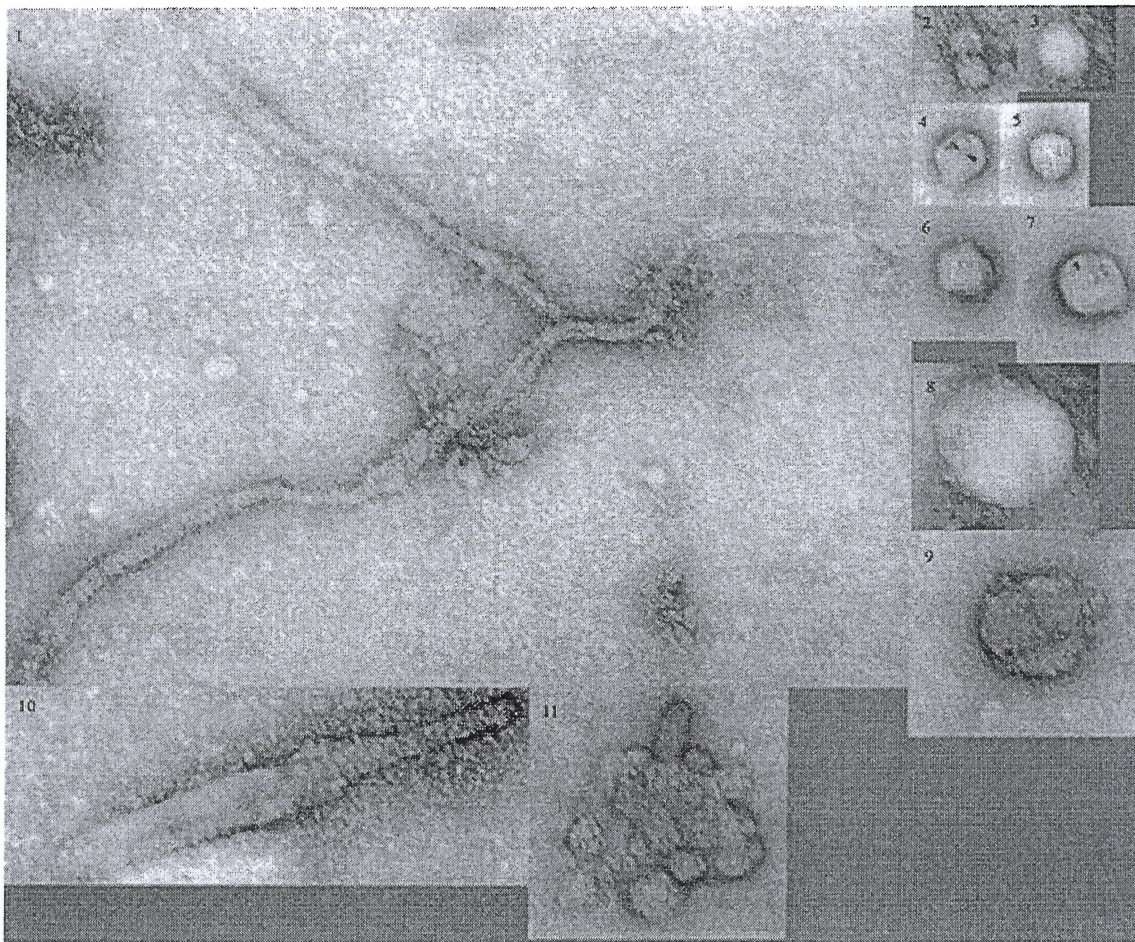
5 (PTA) sunkiai apibrėžiamų dalelių sanakaupa.

6 ir 7 (UA) dalelės. Įtariamas jau aprašytas *Parvovirus B19*.

8 (UA) dalelė, pleomorfinės formos ovalas 75 nm diametro, 94 nm ilgio, su apvalkalu nuo 6 nm iki 25 nm diametro, viena projekcija. Nukleokapsidė ovali 31 nm diametro 56 nm ilgio, turi lipoproteidinį (optiškai šviesų) apvalkalą. Įtariamas *Influenzavirus*.

IŠVADA: 5 skirtingų rūšių virusai (*Parvovirus B19*, *HCV*, *Cytomegalovirus*, *Adenovirus*, *Influenzavirus*).

RA. Ligonė B-876, kodas (DCh).



1 dalelė (UA), ilgas vingiuotas be atskirų fragmentų bakterijos kūnas su kapsule, apvalkalėliu ir nukleoidu., įtariama *Borrelia Burgdorferi*.

2 dalelė (UA). Įtariamas *Parvovirus B19*.

3 (UA), 4, 5, 6 ir 11 (PTA), dalelių sanauka. 50 nm diametro su optiškai šviesiu (lipoproteininiu) apvalkalu ir kapsomerais (matomais po UA nudažymo). Nudažius PTA dalelės, kūnas sumažėjo iki 44 nm diametro, nukleokapsidė izometriška polihedrinės simetrijos. Įtariamas *HCV*.

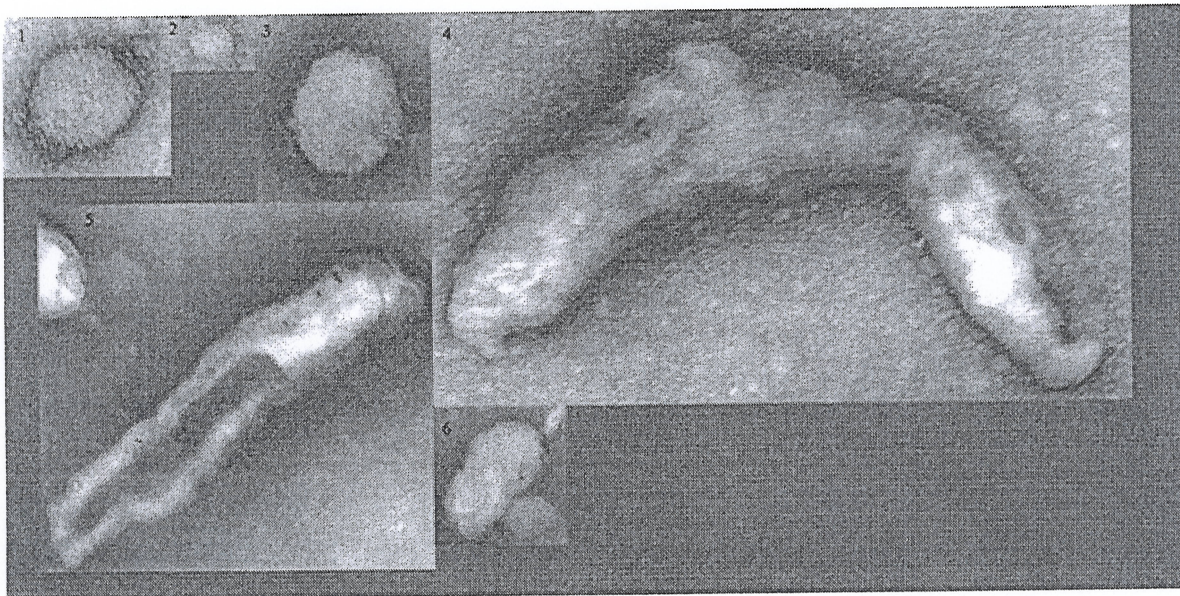
7 (PTA) dalelė, 75 nm diametro, izometriška, nukleokapsidė 8-9, nm. Įtariamas *Adenovirus*.

8 (UA) ir 9 (PTA) dalelės 119-137 nm diametro; 100-125 nm ilgio icosometrinės simetrijos su optiškai šviesiu apvalkalu (lipoproteidinis), aplipusiu gaureliais. Įtariamas *Influenzavirus*.

10 (UA) dalelė, bakterija kuokos formos 25-50 nm diametro, 480 nm ilgio su apvalkalu, sienele ir nukleoidu. Neatpažinta bakterija (gal *Mycoplasma pneumoniae*).

IŠVADA: *Borrelia Burgdorferi* ir neatpažinta kuokos formos (*Mycoplasma pneumoniae*?). bakterijos; 4 skirtingų rūšių virusai (*Parvovirus B19*, *HCV*, *Adenovirus* ir *Influenzavirus*).

RA. Ligonis B-885, kodas (GS).



1 (UA), 3 (PTA) dalelės, 120 nm diametro. Virionas su apvalkalu kiek pleomorfiškas, spaikai per visą paviršių. Nukleokapsidė izometriška. Simetrija icosohedrinė. Įtariamas *EBV*.

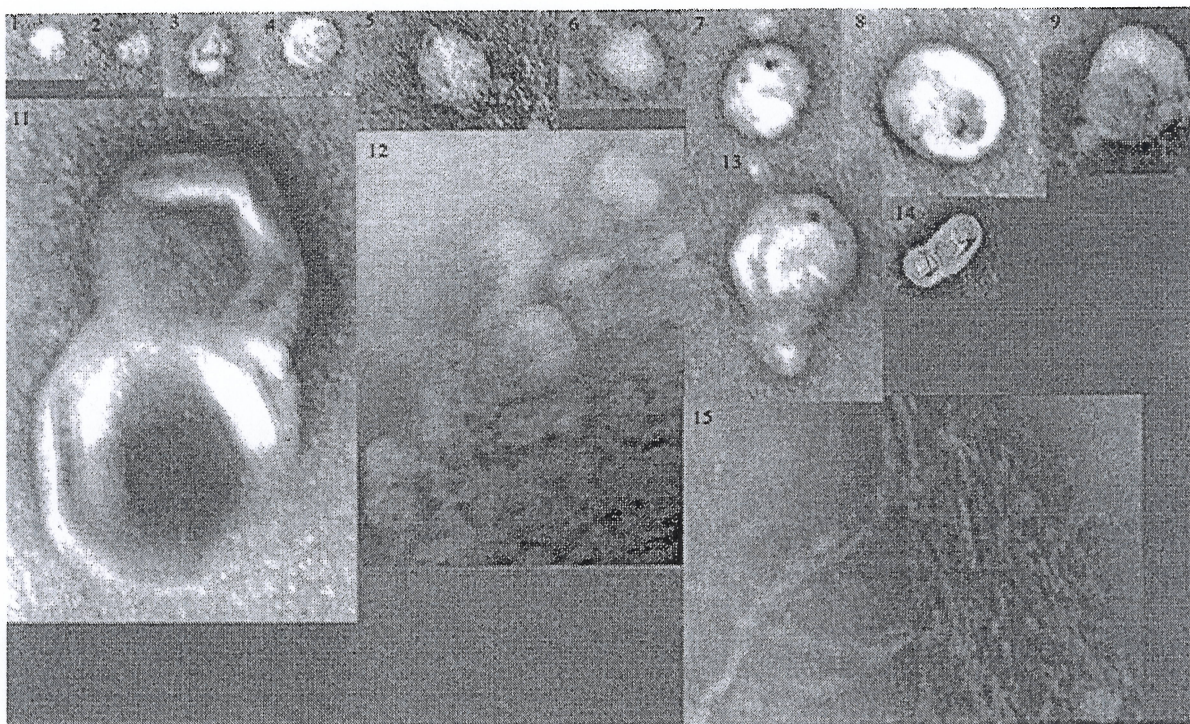
2 (UA) dalelė. 25 nm diametro, nukleokapsidė 18-22 nm diametro, simetrija icosohedrinė, apvali su kapsomerais. Įtariamas *Parvovirus B19*.

4 (UA) lazdelė, 5 (PTA) lanko forma, pleomorfiška, 1,2-5 mikronų vid.ilgis, matoma kapsulė, sienelė, plazmos membrana, citoplazma ir nukleoidas. Įtariama *Helicobacter pylori*.

6 (PTA) dalelė 50-62,5 diametro, pailga, su kapsule, lipoproteidiniu nukleoidu, paviršius lygus. Įtariama *Ureaplasma urealytica* mikrobai.

IŠVADA: *Helicobacter pylori* ir įtariama *Ureaplasma urealytica* ir 2 rūšių virusai (*Parvovirus B19*, *EBV*).

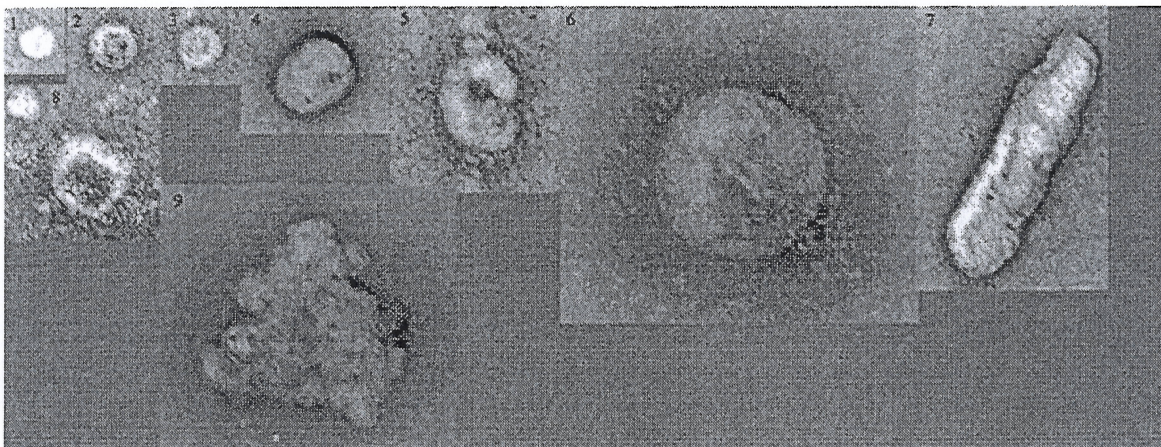
RA. Ligonis B-895, kodas (JG).



- 1 (UA) ir 2 (PTA) dalelės 31 nm diametro. Įtariamasi jau aprašytas *Parvovirus B19*.
- 3 (PTA) ir 4 (UA) dalelės 37,5 nm, 50 nm diametro, 50 nm ilgio, Įtariamasi jau aprašytas Hepadnaviridae šeimos atstovas (*HBV*).
- 5 (UA) ir 6 (PTA) dalelės 12 (PTA) dalelių sandara 62,5 nm diametro, 75 nm ilgio, apvalkalas su projekcijomis. Nukleokapsidė turi lipoproteidinį apvalkalą. Įtariamasi *HCV*.
- 7 (PTA) dalelė ir 69 nm diametro, 75 nm, 81 nm ilgio, 112 nm ilgio. Įtariamasi *Adenovirus*.
- 8 (PTA) ir 9 (UA) ir 13 (PTA) dalelės 100 nm, 106 nm diametro, apvalkalas storas iki 31,5 nm diametro, nukleosoma apvali 31,5 nm diametro. Įtariamasi *Influenzavirus*.
- 11 (PTA) 2 tokios pat rūšies dalelės, viena 181 nm, kita 200 nm diametro, 194 nm ir 250 nm ilgio, atitinkamai. icosohedrinės simetrijos su apvalkalu (optiškai šviesiu) ir optiškai tamsia, persunkta dažais nukleosoma (115 - 137 nm diametro, 175 - 206 nm ilgio). Įtariamasi *Cytomegalovirus*.
- 14 (PTA) dalelė 37,5 nm diametro, 112 nm ilgio lazdelė su kapsule, apvalkalu ir nukleoidu. Įtariama viena iš *Salmonella* ar *Ureaplasma* bakterijos kūnas.
- 15 (PTA) siūlų (žiuželių) sandara įtariama iš bakterijų.

IŠVADA: Žiuželinė bakterija (įtariama *Salmonella* ar *Ureaplasma urealytica*) ir 5 skirtingos rūšys virusų (*Parvovirus B19*, *HBV*, *HCV*, *Adenovirus*, *Cytomegalovirus*).

RA. Ligonė B-898, kodas (OS).



1 (UA) ir 8 (PTA) dalelės. Įtariamas *Parvovirus B19*.

2 ir 3 dalelės (PTA) ir 9 dalelių krūvelė. Apvalios 44 nm diametro, simetrija icosohedrinė, optiškai šviesiu (lipoproteidiniu) apvalkalu su smulkiais gaureliais per visą paviršių. Įtariamas Hepadnaviridae šeimos atstovas (*HBV*).

4 (UA) ir 5 (PTA) dalelės 62,5 nm, 75nm diametro apvalus icosohedrinės simetrijos su šviesiu optiškai apvalkalu ir keliais smulkiais spaikais. Įtariamas jau aprašytas *Influenzavirus*.

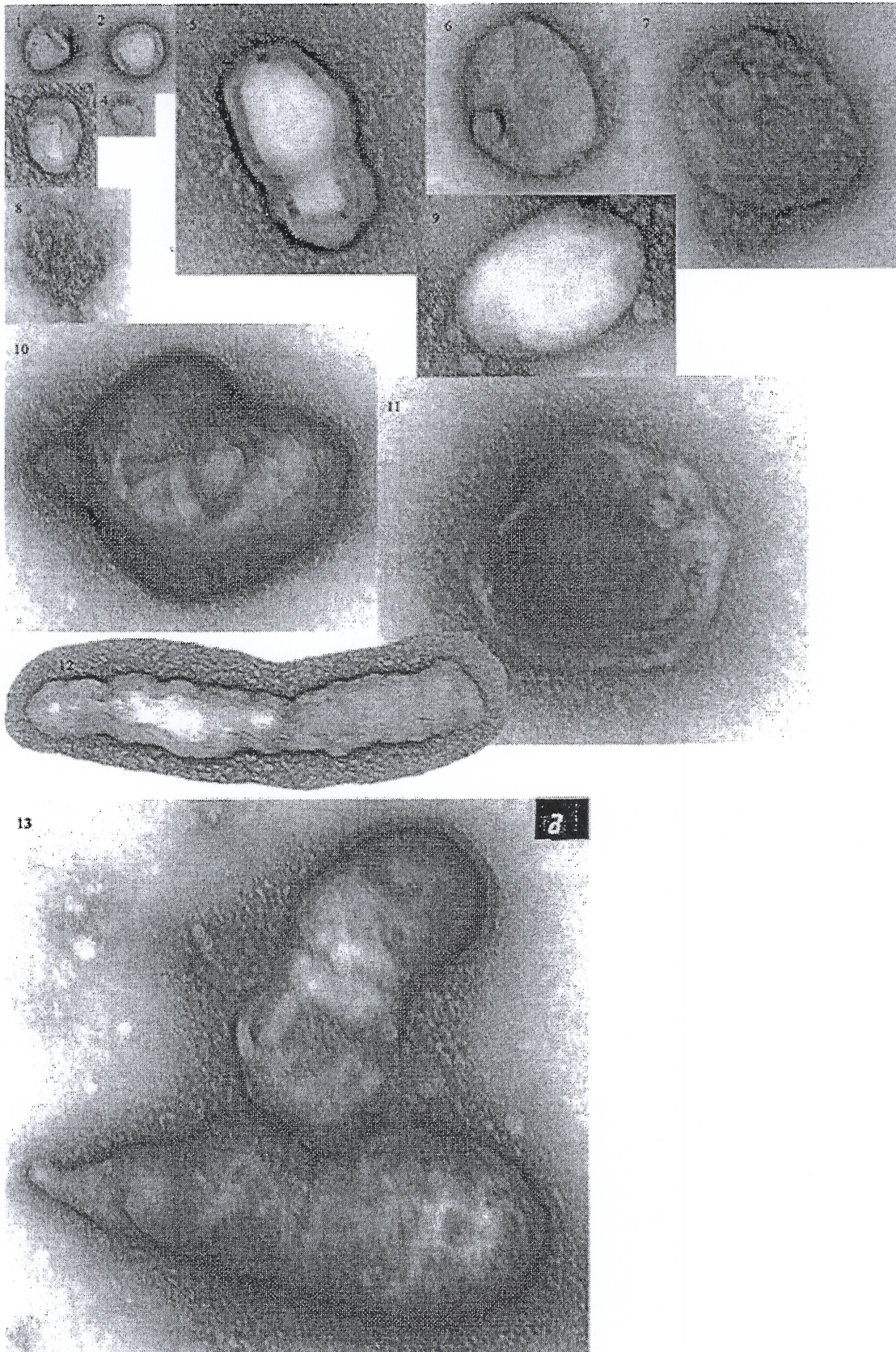
6 (PTA) dalelė 170 nm apvali icosohedrinės simetrijos. Virionas su apvalkalu kiek pleomorfiškas, apvalkalas optiškai tankus, spaikų nesimato. Nukleokapsidė izometriška, persunkta dažais. Įtariamas *Herpesvirus*.

7 dalelė (PTA). Įtariama *Helicobacter pylori* lazdelė.

8 (UA) dalelė panaši į aprašytą *HCV*.

IŠVADA: bakterija *Helicobacter pylori* ir 4 skirtingų rūšių virusai (*Parvovirus B19*, *HBV*, *Influenzavirus*, *Herpesvirus*, *HCV*).

RA. Ligonis B-956. kodas (RC).



RA. Ligonis B-956. kodas C (tęsinys)



1 (PTA) ir 2 (UA) dalelės- 62,5 nm diametro su apvalkalu 12,5 nm diametro, aplipusiu smulkiais spaikais, icosohedrinė simetrija, nukleosoma optiškai šviesi, įžiūrimos 4-ios apvalios nukleokapsidės. Įtariamas *HBV*.

3 (UA) dalelė 68,75 nm diametro, 93,75 nm ilgio ovalas su apvalkalu 25 nm diametro, aplipusiu spaikais, nukleokapsidė optiškai šviesi (lipoproteidinė). Įtariamas *Influenzavirus*.

4 (PTA) dalelė 25 nm diametro, 50nm ilgio ovalas, virionas aplipęs spaikais, be apvalkalo su vienu kūneliu. Įtariamas *Herpesviridae*.

5 (UA) 150 nm diametro, 256,25 nm ilgio netaisyklingas ovalas su apvalkalu tankiai aplipusiu gaureliais, nukleokapsidė lipoproteidinė (optiškai šviesi) be matomų nukleokapsidžių. Įtariamas *Influenzavirus*.

6 (PTA) 145 nm diametro, 187,5 nm ilgio ovalas be apvalkalo, su keliais gaureliais ir nukleokapsidė turi vieną apvalų kūnelį. Įtariamas *Herpevirus*.

7, 10, 11 ir 13 (UA) galėtų būti parazitas su vidine struktūra (7, 10, 11) ir parazito kūnas (13) 2-3 μm storio ir 5 μm ilgio konoidas, nusmailėjusiu apikaliniu galu (siurbtuku) ir apvaliu distaliniu galu (stora uodega), su matomu apvalkalu, Įtariama Protozoa parazito *Toxoplasma gondii* tachyzoitai.

8 (UA) neaiškaus apirusio viruso (panašu į *Parainfluenzavirus*) detritas.

12 (UA) įtariama *Yersinia enterocolytica*.

14 (PTA) įtariamas *Toxoplasma gondii* trophozoitas.

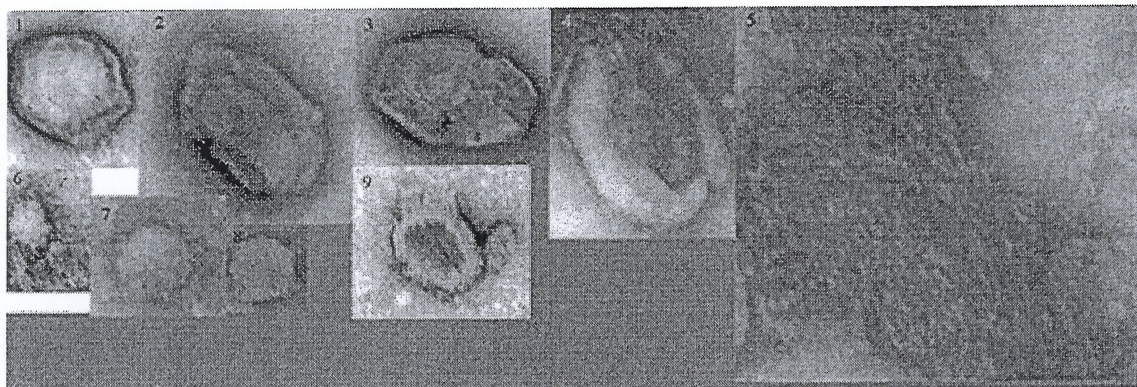
IŠVADA: Bakterija (*Yersinia enterocolytica*), įtariamasis *Protozoa* parazitas (*Toxoplasma gondii*) ir 4 virusai (*Influenzavirus*, *Herpesvirus* ir neatpažintas).

Kaip matyti iš panoraminių vaizdų, ištyrus šio išradimo NEM metodu 14 RA ligonių sinovinį skystį, 11-ai RA ligonių rasta 10 skirtingų bakterijų ir tik 3-ims bakterijų nerasta. Kartu su bakterijomis visiems RA ligoniams rasta nuo 2 iki 5 rūšių virusų. Trijų RA ligonių SS rasti vien tik virusai: vienam - 2 virusai (*HCV* ir *Adenovirus*), abu gausiai po vieną dalelę ir sankaupomis EM regėjimo lauke, tad galbūt ligonis sirgo ne RA, o turėjo artritą, sukeltą lėtinės *HCV* infekcijos; kitiems dviems rasta po 5 virusus, iš kurių 4 kartojosi (*Parvovirus B19*, *HCV*, *Cytomegalovirus*, *Influenzavirus*), penktas buvo arba *EBV* ar neapibūdintas *Herpesvirus*. Taigi, šie RA ligoniai turėjo kelio sąnario SS net po kelis onkogeninius virusus.

IŠVADA: Vaizdai, gauti NEM technologijos pagalba, kurie leidžia daryti prielaidą, kad tik trims ligoniams iš 14-os RA klinikinė diagnozė buvo teisinga, jų SS turėjo po kelis onkogeninius virusus, o kiti 11 sirgo ne RA, bet lėtiniu ReA (du - *Yersinioze*, du *Borrelioze*, vienas *Chlamyidioze*, du turėjo žiuželines bakterijas) ir du turėjo *Helicobacter pylori* bakteriją, kurios vaidmenį RA etiopatogenezei ar ligos komplikacijoms sergantiems RA dar reikia įvertinti. Vieno RA ligonio SS turėjo *Yersinia enterocolytica* ir protozoa parazitą (*Toxoplasma gondii*) kartu ir 4 virusus. Vienas ligonis su *HCV* viremija sinoviniame skystyje galėjo sirgti artritu, sąlygotu lėtinės *HCV* infekcijos.

Panoraminiai vaizdai infektų ReA ligonių sinoviniame skystyje, gauti šio išradimo NEM būdu:

ReA. Ligonis Nr. 3, kodas (IN).



1 (PTA) dalelė 125 nm diametro, apvalus izohedrinės simetrijos virionas su apvalkalu, matomi smulkūs spaikai per visą paviršių. Nukleokapsidė optiškai šviesi su lipoproteidiniu apvalkalu. Įtariamas *Influenzavirus*.

2 (PTA) ovali optiškai tamsi icozohedrinės simetrijos nukleosoma (94 nm diametro ir 156, 175 nm ilgio) iškritusi iš žmogaus *Herpesvirus*, gal būt *Cytomegalovirus* struktūros.

3 (PTA) dalelė pagal kristalinę formą labiau panaši į *Ca pyrofosfatų kristalą*.

4 (PTA) 124 nm diametro 186 nm ilgio dalelė, icozohedrinės simetrijos ovalas su lipoproteidiniu storu apvalkalu ir nukleosoma (94 nm diametro 156 nm ilgio) icozohedrinės

simetrijos su matomomis nukleokapsidėmis. Įtariamas *Cytomegalovirus*.

5 (PTA) žiuželnis bakterijų substratas.

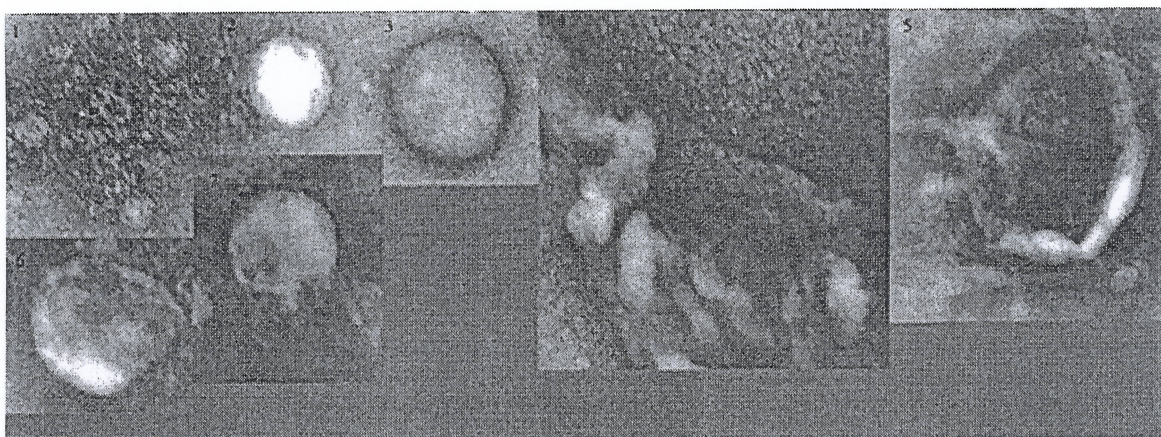
6 (UA) dalelė jau aprašytas *Parvovirus B 19*.

7 (UA) ir 8 (PTA) dalelės jau aprašytos kaip *Adenovirus*.

9 (UA) dalelė. 62,5 nm diametro ir 94 nm ilgio ovalas su šviesiai optišku apvalkalu per visą paviršių smulkiais gaureliais, ir optiškai tankia nukleosoma (37 nm diametro ir 62,5 nm ilgio) ovalas pentagonalinės simetrijos. Įtariamas filamentinės formos *Influenzavirus*.

IŠVADA: žiuželinė bakterija ir 4 skirtingų rūšių virusai (*Influenzavirus*, *Cytomegalovirus*, *Parvovirus B19*, *Adenovirus*) ir įtariamas *Ca pyrofosfato* kristalinė struktūra.

ReA. Ligonė Nr.4, kodas (AL).



1 (UA) dalelė aprašyta kaip *Parvovirus B19*.

2 (UA) dalelė 75 nm diametro 93 nm ilgio taisyklingos icozohedrinės simetrijos ovalas, išžiūrėti keli filamentai. Apvalkalas aplipęs gaureliais. Optiškai šviesi nukleosoma taisyklingos icozohedrinės simetrijos. Įtariamas *Adenovirus*.

3 (PTA) dalelė 112 nm diametro, 124 nm ilgio ovalas, gaureliai nematomi dėl PTA poveikio, bet galima įtarti, icozohedrinę simetriją, nukleosoma šviesi optiškai (lipoproteidinė), neišmatuojama. Įtariamas jau aprašytas *Herpesvirus 4 (EBV)*.

4 (UA) dalelių (pailgų) sudarančių grandinėles bakterijų sankaupa, diametras 31-44 nm, ilgis 187- 250 nm, matoma tik kapsulė. Įtariama *Yersinia (Y.enterocolytica)*.

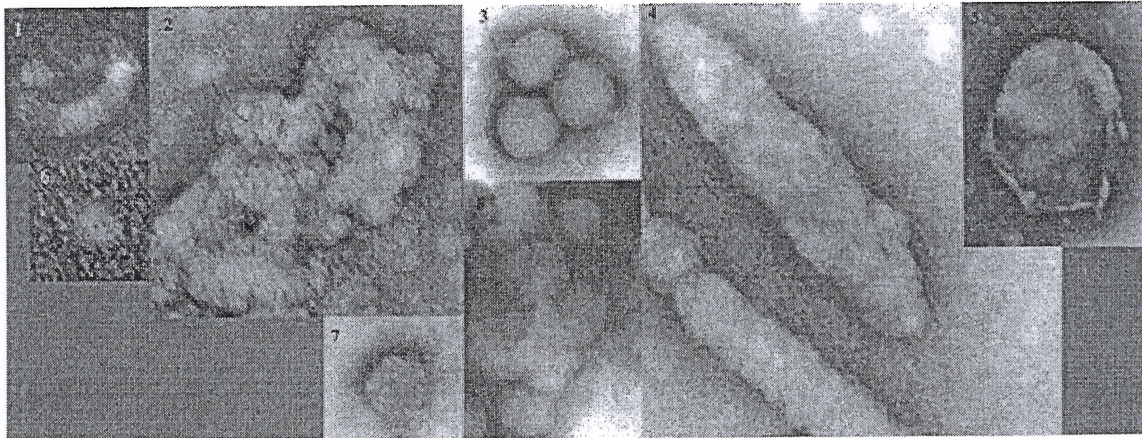
5 (PTA) dalelė, 175 nm diametro 206 nm ilgio, icozohedrinės simetrijos su apvalkalu optiškai šviesiu (nuo 12 iki 19 nm diametro), nukleosoma 125 nm diametro, 175 nm ilgio optiškai tamsi. Įtariamas *Cytomegalovirus* apvalkalas.

6 (PTA) dalelės 125 nm diametro 144 nm ilgio dalelė gerokai apirusi, todėl sunkiai apibudinama.

7 (PTA) dalelė. 94 nm diametro apvalus izometriškos simetrijos su optiškai šviesiu apvalkalu ir vienu matomu spaiku, ekscentriška pailga optiškai tamsi nukleosoma. Įtariamas *Retrovirus*.

IŠVADA: įtariama *Yersinia* ir 5 skirtingų rūšių virusai (*Cytomegalovirus* ir *EBV*, *Adenovirus*, *Parvovirus B19*, *Retrovirus*, aptirpęs nežinomas).

ReA. Ligonis Nr. 5, kodas (MM).



1 (UA) dalelė - 94 nm diametro 125 nm ilgio pailga icozohedrinės simetrijos, su optiškai šviesiu lipoproteidiniu apvalkalu (31 nm diametro) su vos matomis projekcijomis, icozohedrinės simetrijos nukleosoma. Įtariamas *Influenzavirus*.

2 (UA) dalelių (UA) sandara 125 nm diametro, 156 nm ilgio, storu apvalkalu 50 nm diametro, aplipusiu pleomorfiškais kapsomerais, nukleokapsidė opt. tamsi. Įtariamas žmogaus *Parainfluenzavirus*.

3, 7, 8 (PTA) dalelės (PTA) ir jų sandaros (po du, tris ir stambios sandaros). Įtariamas jau aprašytas *Adenovirus*.

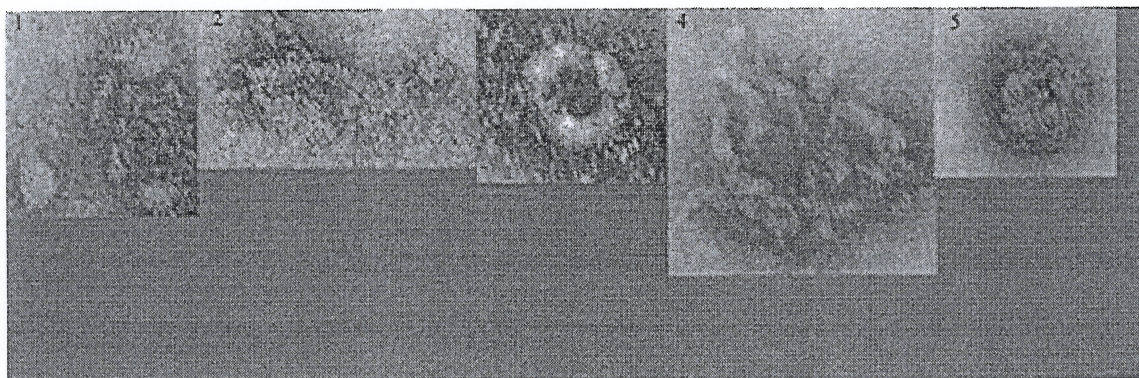
4 (UA) dalelės. Įtariamos *Yersinia enterocolytica* bakterijos.

5 (PTA) dalelė nukleosoma icozohedrinės simetrijos 125 nm diametro, 169 nm ilgio. Įtariama *Cytomegalovirus* nukleosoma.

6 (UA) 37 nm diametro 44 nm ilgio kiek ovali dalelė, visas paviršius aplipęs smulkiais gaureliais, nukleokapsidė optiškai šviesi. Neatpažintas virusas.

IŠVADA: Įtariama *Yersinia enterocolytica* ir 5 skirtingų rūšių virusai (*Influenzavirus*, *Parainfluenzavirus*, *Adenovirus*, *Cytomegalovirus* ir neatpažintas smulkus virusas).

ReA. Ligonis Nr. 8, kodas (MŠ).



1 (UA) dalelė - jau aprašytas *Parvovirus B19*.

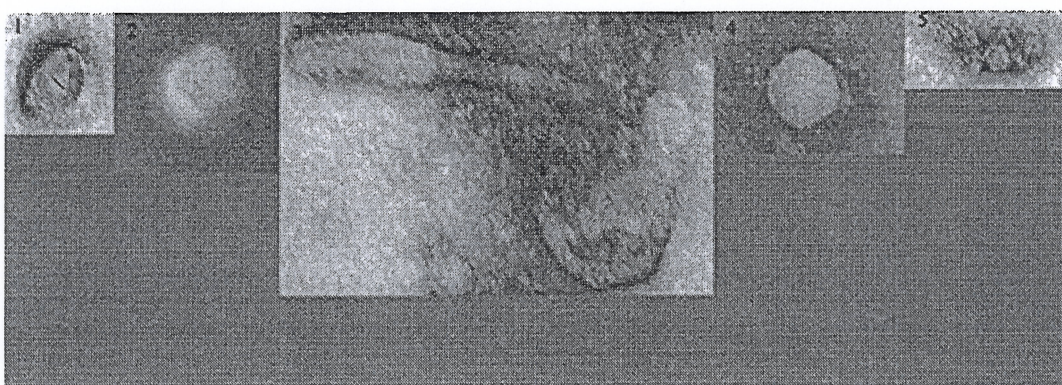
2 (UA) dalelė 75 nm diametro, 156 nm ilgio pleomorfiška, storu šviesiu optiškai apvalkalu (25 - 37 nm diametro) aplipusiu įvairiomis projekcijomis. Nukleokapsidė optiškai tamsi pleomorfinė. Įtariamasis žmogaus *Parainfluenzavirus*.

3 (UA) ir 5 (PTA) dalelės 44 ir 62,5 nm diametro 87 nm ilgio kiek ovalios su optiškai šviesiu apvalkalu aplipusiu įvairiomis projekcijomis, nukleokapsidė opt. tamsi pailga ar neapibrėžta. Įtariamasis *Influenzavirus*.

4 (UA) pleomorfiška 156 nm diametro 200 nm ilgio, sudaryta iš susisukusių 25 nm diametro projekcijų ir spaikų. Nukleokapsidė optiškai tamsi, neapibrėžtos formos. Dalelė panaši į žmogaus *Parainfluenzavirus*.

IŠVADA: Bakterijų nerasta, rasti 3 rūšių virusai (*Influenza* ir *Parainfluenza* ir *Parvovirus B19*).

ReA. Ligonis Nr. 9, kodas (DŽ).



1 (PTA) ir 2 (PTA) dalelės 62,5 nm diametro, apvali su apvalkalu iki 19 nm diametro storio be projekcijų, nukleokapsidė izometriška. Įtariamasis *HCV*.

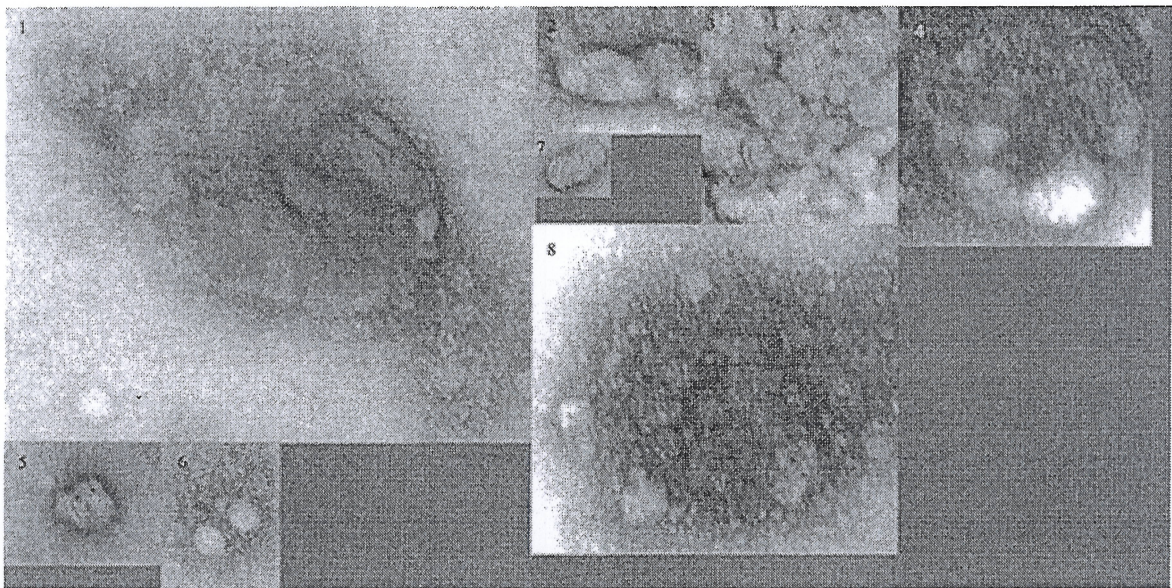
3 (UA) dalelė Įtariamas jau aprašytas *Cytomegalovirus* virusas su kuokos formos neatpažinta bakterija 25, 31 nm diametro, įtariama *Mycoplasma pneumoniae*?

4 (PTA) dalelė Įtariamas jau aprašytas *Adenovirus*.

5 (UA) dalelė. Įtariamas jau aprašytas *Parvovirus B19*.

IŠVADA: Įtariama *Mycoplasma pneumoniae* ir 4 rūšių virusai (*Cytomegalovirus*, *HCV*, *Adenovirus*, *Parvovirus B19*). (Ligonui kliniškai nustatyta *Chlamydia trachomatis*).

ReA. Ligonis Nr.13, kodas (AJ).



1, 4 ir 8 (UA) dalelės 250, 280 nm diametro, 312 nm ilgio apvalūs ar kiek ovalūs mikrobai su apvalkalu aplipusiu gaureliais, nukleosoma 130 nm diametro, 175 nm ilgio) persunkta dažais su pleomorfinėmis nukleokapsidėmis (25, 37, 50 nm diametro). Įtariama *Chlamydia trachomatis*.

3 (UA, dvi dalelės) ir 3 (PTA, dalelių sankaupa). Virusai 37,5 nm diametro 87,5 nm ilgio sunkiai apibudinami, storu lipoproteidiniu apvalkalu, nukleosoma nematoma. Įtariamas *Influenzavirus*.

5 (PTA) dalelė panaši į jau aprašytą Hepadnavirus šeimos virusą *HBV*.

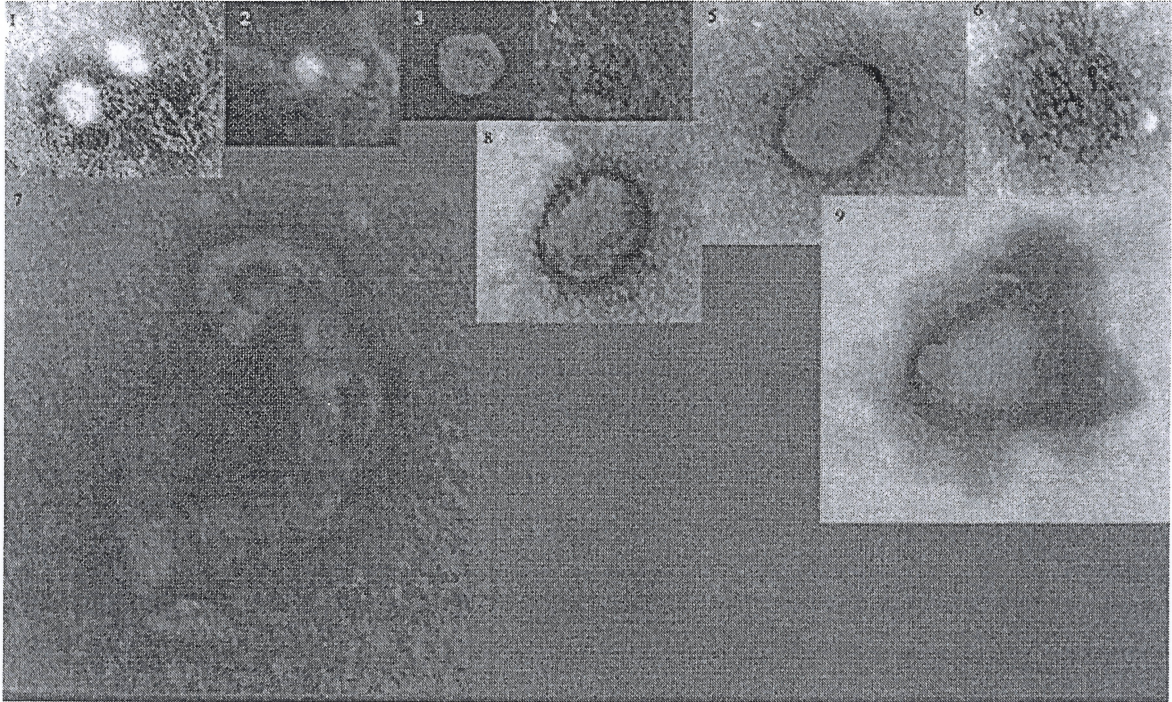
6 (UA) dalelė. Virusas panašus į jau aprašytą *Parvovirus B19*.

7 (UA) dalelė 31 nm diametro, 62,5 nm ilgio pailga, paviršius aplipęs gaureliais, nukleosoma neapibrėžta. Panaši į *Ureaplasma urealytica* bakterijos kūną.

IŠVADA: Įtariama *Chlamydia trachomatis* ir *Ureaplasma urealytica* bakterijos ir 3 skirtingų rūšių virusai (*HBV*, *Influenzavirus*, *Parvovirus B19*). Ligonui kliniškai nustatyta

Mycoplasma hominis ir *Ureaplasma urealyticum*; *Chlamydia trachomatis* IF metodu - neigiama.

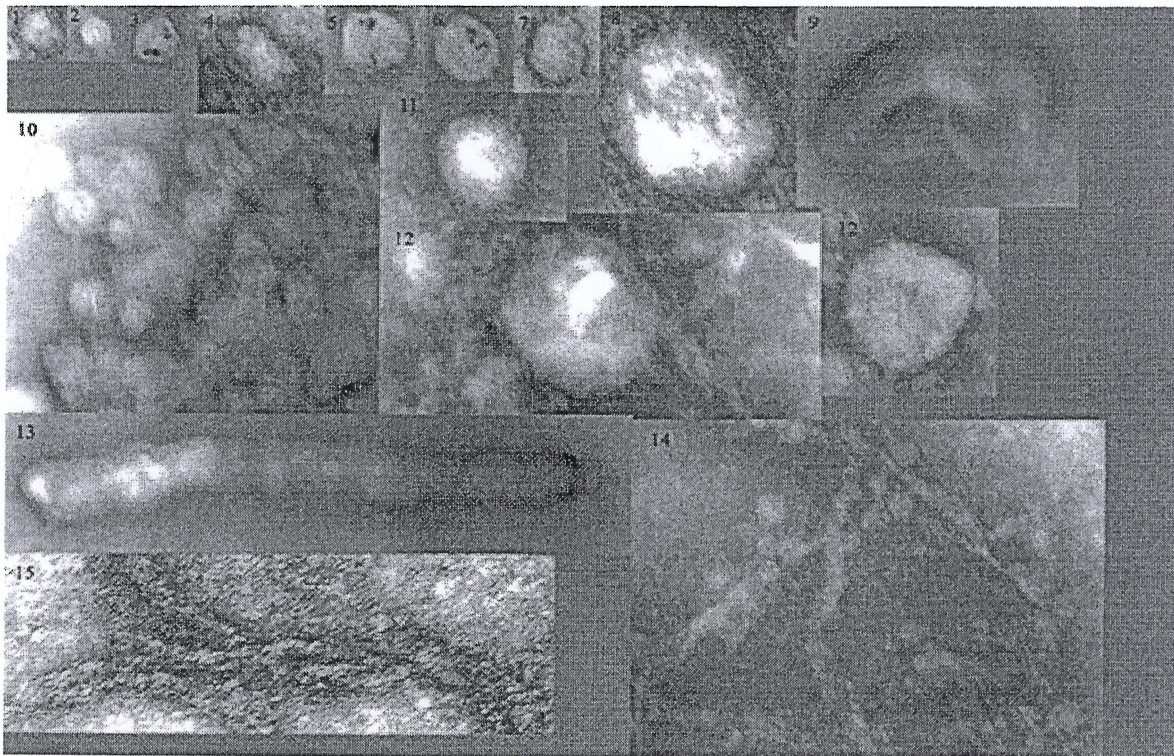
ReA. Ligonis Nr. 14, kodas (ATZ).



- 1 (UA) ir 2 (PTA) dalelės panašios į jau aprašytą *Parvovirus B19*.
- 3 (PTA) ir 4 (UA) dalelės panašios į jau aprašytą *Adenovirus*.
- 5 (PTA), 8 (PTA) ir 9 (PTA) dalelės panašios į jau aprašytą *Herpesvirus*.
- 6 (UA) dalelė panaši į jau aprašytą filamentinės formos *Influenzavirus*.
- 7 (PTA) dalelė. Itiriamas *Parainfluenzavirus*.

IŠVADA: Bakterijų nerasta, rasta 5 skirtingos virusų rūšys (*Herpesvirus*, *Parvovirus B19*, *Adenovirus*, *Retrovirus* ir *Parainfluenzavirus*). Ligonui kliniškai nustatyta *Chlamydia trachomatis* infekcija.

ReA. Ligonis Nr. 16, kodas (RO).



1 (UA) ir 2 (PTA) dalelės 25 nm diametro. Įtariamas jau aprašytas *Parvovirus B19*.

3 (PTA) ir 10 (UA) 25 nm diametro 37,5 nm ilgio, su apvalkalu ir apvalia nukleosoma dalelės ir jų sandauga. Įtariamas *HBV*.

4 (UA) dalelė kulkos išvaizdos 44 nm diametro, 81 nm ilgio, icosohedrinės simetrijos su siauru apvalkalėliu ir optiškai šviesia nukleokapside. Neatpažintas virusas.

5 ir 6 (PTA) ir 7 (UA) dalelės 50, 56 nm diametro, 62,5 nm ilgio su apvalkalu ir smulkiomis projekcijomis, nukleokapside izometriška simetrija polihedrinė. Neatpažinti virusai.

8 ir 12 (PTA) 119 nm 219 nm ilgio, 125 nm diametro 156-162 nm ilgio ovalios dalelės kiek icosohedrinės simetrijos su apvalkalu be gaurelių ir projekcijų, nukleosoma su lipoproteidiniu apvalkalu. Įtariama *Mycoplasma hominis*.

11 (PTA) 75 nm, 81 nm diametro icosohedrinės simetrijos su apvalkalu. Nukleosoma su lipoproteidiniu apvalkalu ir nukleokapsidėmis. Įtariamas *Influenzavirus*.

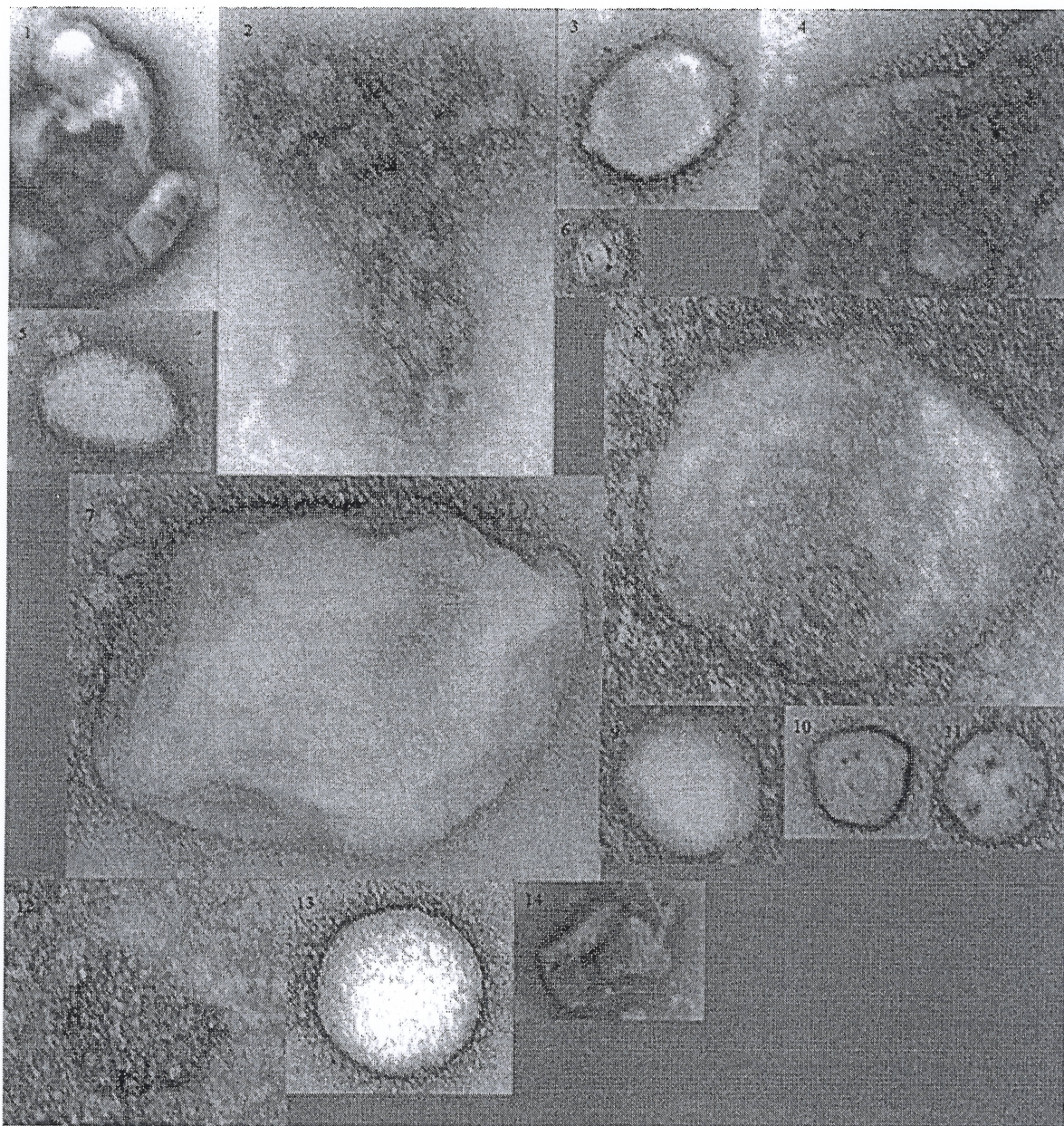
9 (PTA) dalelė 94 nm, 112 nm diametro 94 nm, 125 nm ilgio virionas su apdangalu iki 44 nm diametro. Nukleokapside optiškai tamsi persunkta dažais. Įtariamas *Retrovirus*.

13 (PTA) dalelė 62,5 nm diametro 500 nm ilgio bakterija su sienele, apvalkalu ir nukleoidu. Įtariama jau aprašyta *Yersinia enterocolytica* bakterija.

14 (UA) ir 15 (PTA) įtariami grybelių hifai (*Candida albicans*).

IŠVADA: Įtariama *Yersinia enterocolytica* bakterija ir *Candida albicans* hifai šalia 6 virusai (*Parvovirus B19*, *Rabies virus?* *HBV*, *Influenza*, *Retrovirus*, neatpažintas virusas). Ligonui kliniškai rasta *Yersinia enterocolytica*.

ReA. Ligonis Nr.19 (kodas VB).



1 (UA), 14 (PTA) - Neidentifikuotos (gal bakterijų *Ureaplasma urealytica*) dalelės.

2 (UA) - sugriuvusio mikrobo kapsomerinis detritas.

3, 5, 9 (UA), 13 - 156, 162,5, 175 nm ilgio, 75, 125, 131,25, 162 nm diametro su išoriniu riebalų sluoksniu ir 1 šoniniu kūneliu kiek ovalios formos virionai. Įtariami *Picornaviridae* atstovai (*Rhinovirus*, *Enterovirus*).

4 (UA), 6 (PTA)- 62,5nm diametro, 68,75 nm ilgio sferoidai, be ar smuliomis projekcijomis, izometriška nukleokapside, polihedrinės simetrijos. Įtariamas *HCV*.

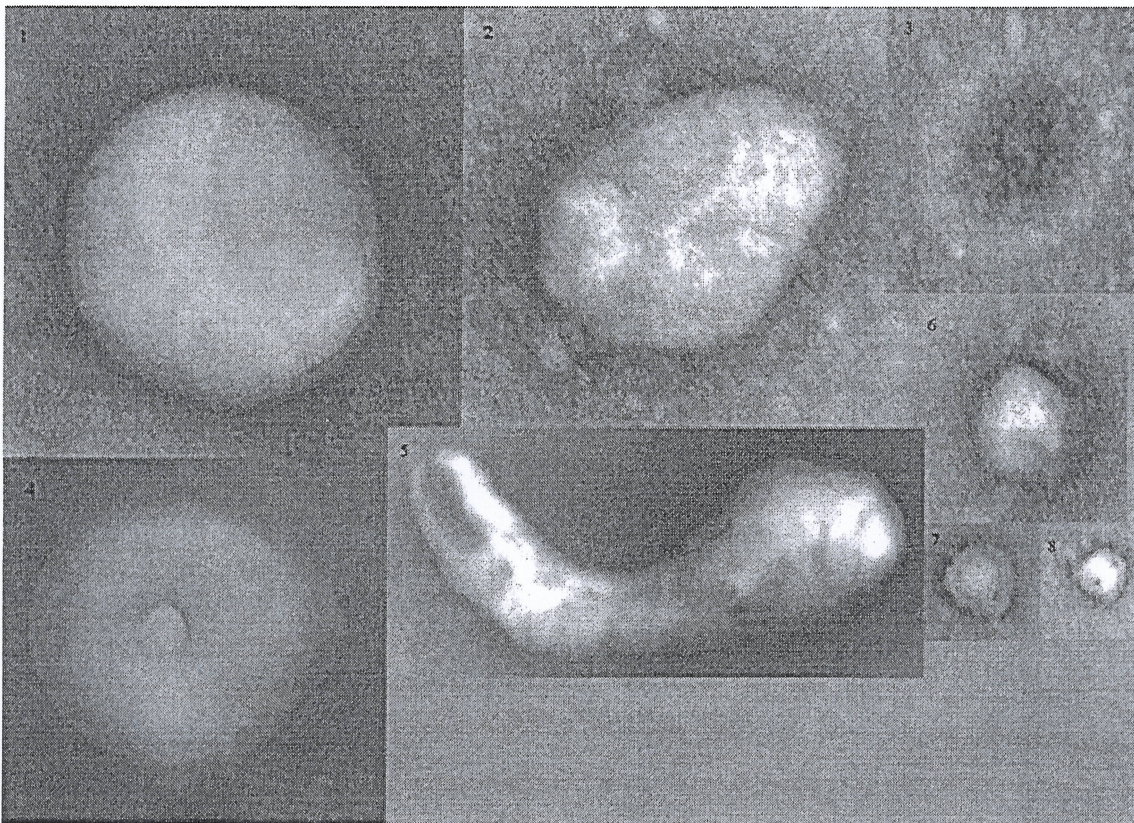
7 (PTA), 8 (UA) 400nm diametro, 375, 525nm ilgio polihedrinės dalelės labiau panašios į sinovinio skysčio ląsteles.

10, 11 (PTA) 112,5 nm ilgio, 93,75, 112,5 nm diametro virionai, storu apvalkalu, aplipusiu smulkiais gaureliais ir polihedrine nukleokapside. Įtariami *Influenzavirus*.

12 (UA) – 287nm diametro apvalus su apvalkalu, aplipusiu smulkiais plaukeliais ir dažais persunkta polihedrine nukleosoma, su centre susitelkusiais nukleokapsidžių siūlais. Įtariama *Mycoplasma hominis*.

IŠVADA: *Mycoplasma hominis* ir įtariama *Ureaplasma urealytica* bakterijos ir virusai (*HCV*, *Influenzavirus*, ir *Picornaviridae* šeimos atstovai).

ReA. Ligonis Nr.27, kodas VJŽ.



1 (PTA) 162 nm diametro kiek ovali dalelė icosohedrinės simetrijos, šviesiu apvalkalu. Neidentifikuotas virusas.

2, 3 (UA) ir 4 (PTA) įtariamoms bakterijoms *Mycoplasma hominis*.

5 (PTA) lenkta dalelė, apikalinis galas suplonėjęs, distalinis storas, matomas sienelė, ir vidinė struktūra. Įtariama *Toxoplasma gondii*.

6 (UA) - dalelės 75 nm, 81 nm diametro dalelė kiek ovalios icosohedrinės simetrijos su optiškai šviesia nukleosoma aplipusia nukleokapsidėmis. Įtariamas *Influenzavirus*.

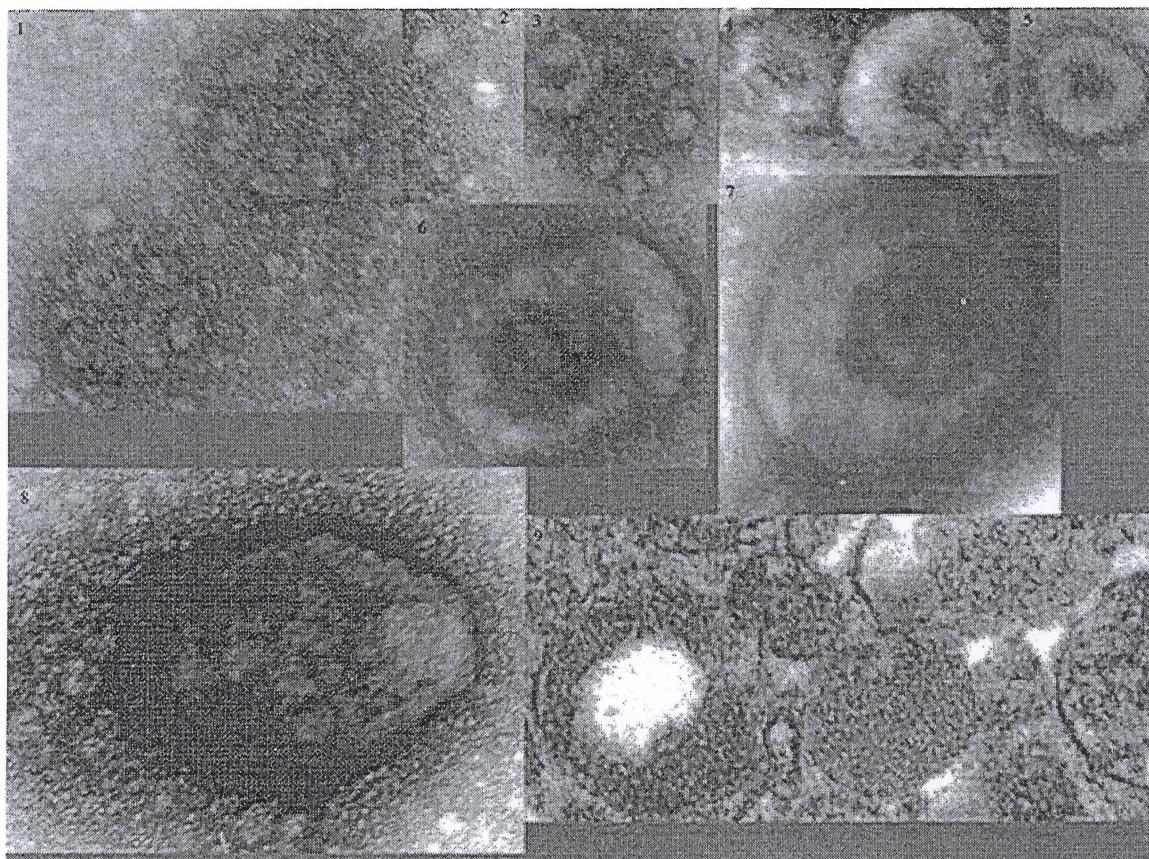
7 (PTA) 62,5 nm diametro su apvalkalu 12,5 nm diametro, aplipusiu smulkiais spaikais, icosohedrinė simetrija, nukleosoma optiškai šviesi, įžiūrimos 4-ios apvalios nukleokapsidės.

8 (UA) 50 nm diametro su optiškai šviesiu (lipoproteininiu) apvalkalu ir kapsomerais. Įtariamas smulkus *Influenzavirus*.

IŠVADA: Įtariamoms *Mycoplasma hominis* bakterijoms, *Toxoplasma gondii* ir 4 virusai (*Influenzavirus* ir 2 neidentifikuoti)

Artropatija sergant Krono liga:

Ligonis B-920, kodas (MN).



1, 3 (UA, x160.000) ir 9 (TEM, x 200 000) dalelės apvalios ar kiek ovalios 187, 312, 340 nm diametro su apvalkalu aplipusiu stambiais kapsomerais, neapibrėžtos gal icosohedrinės simetrijos, nukleoidas su pleomorfinėmis stambiomis rozetinėmis nukleokapsidėmis (25, 37, 50 nm diametro). Įtariama *Chlamydia trachomatis*.

2 (UA) dalelė įtariamas jau aprašytas *Parvovirus B19*.

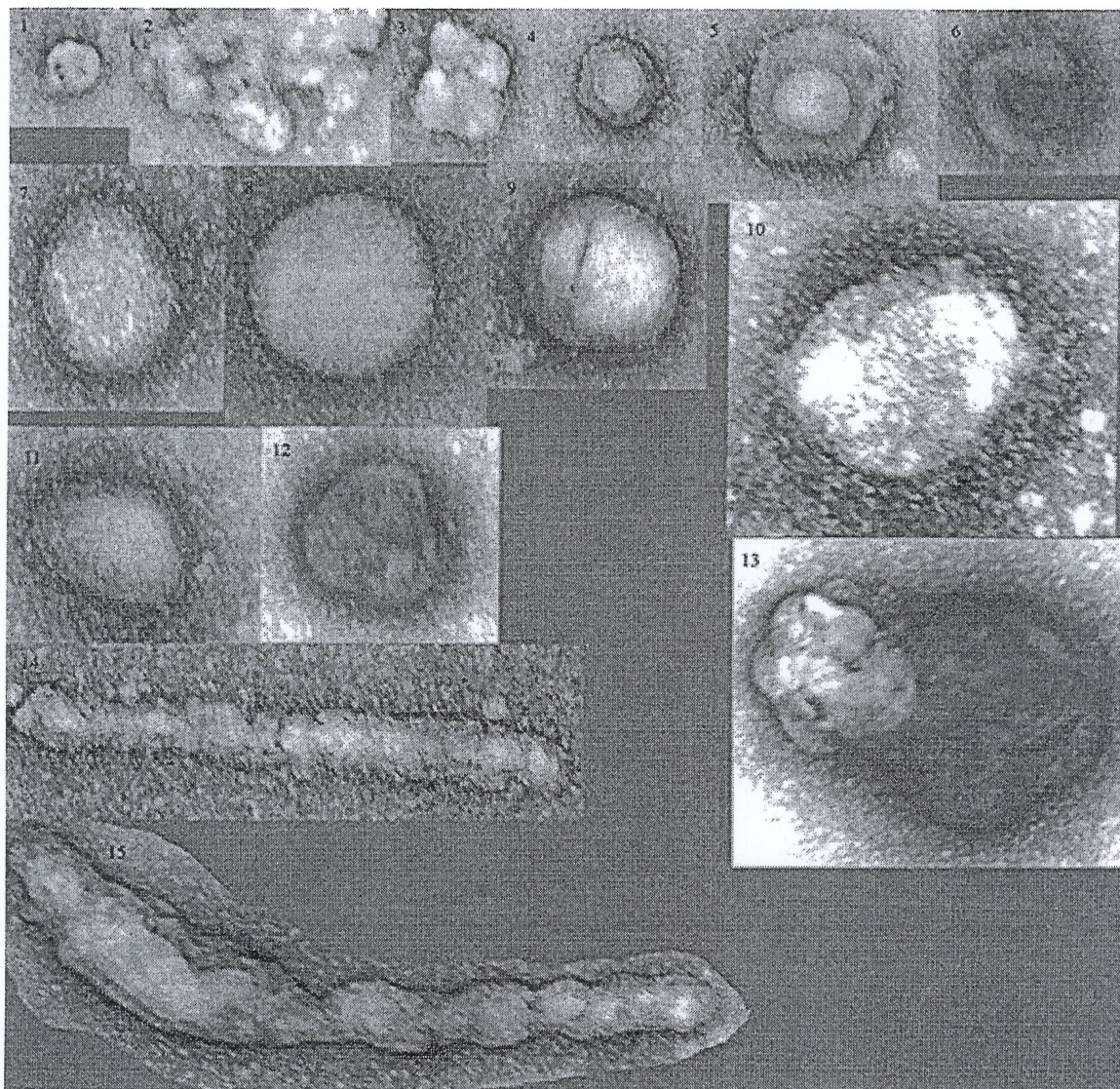
4, 5 (UA) dalelės 100-120 nm diametro 200 nm ilgio ovalas ar pleomorfiškas su optiškai šviesiu apvalkalu aplipusiu daugybe trumpų gaurelių - spaikų per visą paviršių, optiškai tamsia nukleosoma. *Retroviridae* ar *Coronaviridae* šeimos virusai (įtartinas dėl SARS arba HIV infekcijos).

6, 7 (UA) dalelės 150-200 nm diametro, 200-235 nm ilgio ovalios icosohedrinės simetrijos, su apvalkalu vietomis iki 70 nm diametro aplipusiu smulkiais gaureliais, nukleokapsidė icosohedrinė (110 nm diametro, 150 nm ilgio). Įtariamas jau aprašytas *Cytomegalovirus*.

8 (UA, TEM x200 000) dalelė 250 nm diametro, 325 nm ilgio icozohedrinės simetrijos su apvalkalu, matomos pleomorfiškos nukleokapsidės. Įtariama nukleosoma *Cytomegalovirus*.

IŠVADA: *Chlamydia trachomatis* ir 3 virusai (*Parvovirus B19*, *Cytomegalovirus*, ir į *SARS* ar *Retrovirus (HIV)* panašus virusas).

ReA. Ligonis B-955, kodas (VZ).



1 (PTA) vienas ir 2 (UA), 3 (UA) sankaupos 56,25 nm diametro virionų sferoidai su keliomis projekcijomis, nukleokapsidė izometriška, polihedrinė. Įtariamas *HBV*.

4 (UA) 95 nm diametro virionas su apvalkalu, aplipusiu spaikais per visą paviršių. Kapsidė sferiška lipoproteidinė. Įtariamas *Retrovirus*.

5 (UA), 7 (UA), 8, 9 (PTA), 10, 11 (UA) 143,75- 180 nm diametro, virionai kiek pleomorfiški su apvaskalu 56 nm pločio, aplipusiais spaikais per visą paviršių. Nukleokapsidė ovali, lipoproteidinė su smulkiais kapsomerais. Įtariamas *Influenzavirus*.

6 (UA), 12 (UA) ir 13 (PTA) 150-137, 5-250 nm diametro virionai, su apvaskalu 31,25 nm storio, keliomis projekcijomis, aplipęs spaikais per visą paviršių, nukleokapsidė pleomorfiška, persunkta dažais. Įtariami *Herpesviridae* virusai.

14, 15 – bakterija pailga lazdelė 525 nm ilgio su sienele, kapsule plazmine membrana, matomas nukleoidas. Įtariama *Yersinia enterocolytica*.

IŠVADA: *Yersinia enterocolytica* ir 4 virusai (*Influenzavirus*, *HBV*, *Herpesviridae* šeimos virusai, *Retrovirus*).

Tuo būdu, ištyrus 10 ReA ligonių kelio sąnario sinovinį skystį šio išradimo NEM metodu, tik dviems ligoniams neradome bakterijų, tačiau vienam iš jų kliniškai rasta *Chlamydia trachomatis*, tai rodo, kad neradus bakterijų NEM metodu dar nereiškia, kad jų ten nėra. Tuo tarpu, galimus artrito sukėlėjus radome tiesiogiai ReA ligonių pakenkto sąnario sinoviniame skystyje t.y. pakenkimo židinyje. Panašu, kad ReA artritą sukelia ne lytinių takų ar žarnyno nuotolinė, bet ir tiesioginė infekcija, reziduojanti pakenktame sąnaryje. Tad ReA gali būti vertinamas kaip bakterijų sukeltas artritas, kartu pakenkiantis sąnarius ir lytinių takų bei žarnyno gleivines, panašiai, kaip sergantiems spondiloartropatijomis (psoriazinio artritu PsA) ar sisteminėmis minkštųjų audinių autoimuninėmis ligomis pakenkiama oda (SRV, SSD) ir sąnariai kartu asmenims, turintiems genetinę predispoziciją. Dar 2007 m. mokslinėje spaudoje buvo rašoma, kad sergant ReA sinovinis skystis yra *sterilus* su bakterijomis artrito sukėlėjomis, reziduojančiomis žarnyne ar lytinėje sistemoje. Šalia bakterijų ReA ligonių SS radome nuo 3 iki 5 skirtingų rūšių virusus, vyraujant ligonių sinoviniame skystyje (*Parvovirus B19*, *Influenzavirus*, *Herpesvirus*, *HBV* ir *HCV*, *Retrovirus*) virusams. Manome, kad jie taip pat vaidina svarbų vaidmenį ligos etiopatogenezėje, greičiausiai modifikuodami pakenkiamų audinių ląstelių genus, apie ką jau rašo mokslinė spauda ir šį vaidmenį dar reikės patikslinti ateityje. Gal būt, ReA gydymui šalia specifinio gydymo bus reikalingi priešvirusiniai agentai.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Infektų tyrimo artritinio sąnario skystyje, panaudojant negatyvinio kontrasto elektroninę mikroskopiją (NEM), būdas, apimantis
 - a) paraminių varinių tinklelių paruošimą diagnostinei NEM;
 - b) negatyvinių dažų paruošimą;
 - c) sinovinio skysčio (SS) paruošimą NEM tyrimui;
 - d) paruoštos SS suspensijos dažymą;
 - e) SS pavyzdžių tyrimą EM; ir
 - f) rastų infektų identifikavimą,besiskiriantis tuo, kad SS paruošimo NEM tyrimui stadijoje c)
 - SS fiksuoja 1% gliutaraldehido (GA) ir 4% paraformaldehido (PFA) fiksatoriumi, praskiestu natrio kakodilato $[\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$ buferyje su 0,1% CaCl;
 - PFA tirpina natrio kakodilato buferiu, pakaitintu iki $+65^\circ\text{C}$, vandens vonelėje, kratant 30-45 min.;
 - į karštą tirpalą praskaidrinimui įlašina 2 lašus 10N NaOH;
 - gautą tirpalą atšaldo iki kambario temperatūros;
 - lašina 1N HCl iki pH 7,2;
 - inaktyvuoja mikrobus ir virusų dauginimąsi, SS palaikant 0,02% Na azido (NaN_3) bidestiliuoto vandens tirpale;
 - fiksuotą ir inaktyvuotą SS praskiedžia destiliuotu vandeniu iki optimalaus santykio 1:50-250;ir tuo, kad stadijoje f) iš EM mikrofotografijų sudaro SS rastų infektų panoraminį vaizdą konkrečiam ligoniui.
2. Būdas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad jį naudoja RA ir ReA artritų ankstyvai ir/arba diferencinei diagnozei.