



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **114595**

(13) **U**

(51) МПК

G01N 21/76 (2006.01)

G01N 21/77 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2016 10031	(72) Винахідник(и): Пипа Лариса Володимирівна (UA), Мургіна Марина Миколаївна (UA)
(22) Дата подання заявки: 03.10.2016	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.03.2017	(73) Власник(и): ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. М.І. ПИРОГОВА, вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, 21018 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.03.2017, Бюл.№ 5	

(54) СПОСІБ ДИФЕРЕНЦІЙНОЇ ДІАГНОСТИКИ ГЕНЕРАЛІЗОВАНОГО ТА ЛОКАЛІЗОВАНОГО ГНІЙНО-СЕПТИЧНОГО СТАНУ У ДІТЕЙ

(57) Реферат:

Спосіб диференційної діагностики генералізованого та локалізованого гнійно-септичного стану у дітей, що передбачає визначення рівня пресепсину. Дітям визначають рівень пресепсину сироватки крові хемілюмінесцентним методом із використанням аналізатора PATHFAST і при значенні пресепсину в межах 200-450 пг/мл діагностують локалізовану інфекцію, при рівні вище 500 пг/мл - генералізований інфекційний процес, а при рівні пресепсину до 160 пг/мл - це здорова дитина.

UA 114595 U

Корисна модель належить до медицини, зокрема до педіатрії, дитячої хірургії, дитячих інфекційних хвороб і може бути використана для діагностики локалізованої чи генералізованої інфекції у дітей.

Сучасні принципи діагностики генералізації інфекційного процесу полягають у визначенні клініко-лабораторних критеріїв синдрому системної запальної відповіді (ССЗВ) та виявлення за допомогою клінічних та параклінічних досліджень вогнища інфекції. Додатково для оцінки розвитку органної недостатності визначається - рівень артеріального тиску, необхідність іонотропної підтримки, зменшення парціального тиску кисню та збільшення парціального тиску вуглекислого газу в артеріальній крові, необхідність респіраторної підтримки, подовження симптому "білої плями", олігурія, збільшення рівню лактату в сироватці крові, наявність метаболічного ацидозу, зниження кількості тромбоцитів, підвищення рівня креатиніну, білірубину, АЛТ. (Goldstein B., Giroir B., Randolph A. et al. International pediatric sepsis consensus conference: Definition for sepsis and organ disfunctions in pediatrics // *Pediatr. Crit. Care Med.* - 2005. - Vol. 6 (1). - P. 2-8).

В багатьох випадках рання діагностика сепсису є утрудненою, але дуже важливою, оскільки своєчасне та в повному обсязі лікування є визначальним в прогнозі захворювання.

В основі корисної моделі поставлена задача створити "Спосіб диференційної діагностики генералізованого та локалізованого гнійно-септичного стану у дітей", при якому визначають рівень пресепсину сироватки крові у дітей, хворих на локалізовані та генералізовані інфекції, його референтних значень, які будуть слугувати критерієм для діагностики генералізації, і тим самим забезпечать своєчасну та адекватну терапію даного процесу, що покращить прогноз хвороби та зменшить смертність.

Поставлена задача вирішується шляхом визначення рівня пресепсину сироватки крові імуно-хемілюмінісцентним методом із застосуванням аналізатора PATHFAST (Mitsubishi Chemical Medience Corporation, Japan). Рівень пресепсину, більше 500 пг/мл, свідчить про генералізовану інфекцію у дитини, якщо рівень пресепсину сироватки крові знаходиться в межах 200-450 пг/мл - у дитини має місце локалізована інфекція. У здорових дітей рівень пресепсину не перевищує 160 пг/мл.

CD14 - білок мембрани макрофагів. Дана молекула є тим рецептором, який "розпізнає" наявність бактерій, які викликають інфікування, запускають каскад неспецифічного імунітету та запальний процес, що пов'язаний з ним. CD14 існує у двох формах: розчинний (sCD14) та зв'язаний з мембраною (mCD14), останній знаходиться на мембранній поверхні моноцитів і макрофагів і являється рецептором для ліпополісахариду (ЛПС).

sCD14 - це маркер відповіді моноцитів на дію ЛПС, при відсутності ендотоксину він здатний індукувати в моноцитах синтез найважливішого прозапального цитокіна TNF- α (Tumor necrosis factor). Важливим є те, що він може індукувати синтез запальних цитокінів в клітинах, в мембранах, в яких відсутній mCD14. Підвищення рівня sCD14 спостерігається при СНІДІ, системному червоному вовчаку, гострому дистрес синдромі тощо, тому він не може бути специфічним маркером розвитку сепсису.

Пресепсин (sCD14-ST) - це вкорочений sCD14. В 2005 г. в крові септичних хворих було виявлено невідому раніше форму sCD14. Це був фрагмент sCD14, який відщеплювався від комплексу sCD14-ЛПС-ЛСБ під дією протеази, що циркулює у крові. В результаті цього утворюється вкорочена форма sCD14, яка складається із 64 амінокислотних залишків, і спочатку була названа субтипом sCD14 (subtype sCD14-ST) та згодом назву було змінено на пресепсин. Білок з молекулярною масою 13 кДа, містить N-термінальну ділянку CD14 та не містить C-термінальний кінець, який відповідає за зв'язування з ЛПС.

Пресепсин - це високочутливий, високоспецифічний маркер.

Дослідження в даному напрямку у дітей не проводилося.

На даний час для диференційної діагностики генералізованого і локалізованого інфекційного процесу найчастіше використовують наступні біомаркери: С-реактивний білок (СРБ), прокальцитонін (ПКТ), інтерлейкін -6 (ІЛ-6), інтерлейкін -10 (ІЛ-10), фактор некрозу пухлин (ФНО), пресепсин.

Однак, підвищення традиційних білків гострої фази (СРБ, ІЛ-6, ІЛ-10, ФНО) відбувається при запаленні не лише інфекційної етіології, тому вони не можуть слугувати надійними маркерами саме інфекційного запалення.

Прокальцитонін – маркер, який не чутливий до запалення імунного ґенезу, проте його рівень може збільшуватися після масивного руйнування власних тканин організму (поширені опіки, масивне хірургічне втручання тощо), тому в ранньому післяопераційному періоді його рівень може бути хибно позитивним при відсутності інфекції, а подальше зростання при вторинному

інфікуванні відбувається через 24-48 годин від початку інфекційного процесу, тому прокальцитонін не може бути надійним маркером відображення інфекційного процесу "on-line".

Пресепсин в свою чергу є нечутливим до запалення імунного генезу та не збільшується при руйнуванні власних тканин організму, зростає в перші 12 годин після інфікування, стійкий в зразках крові, рівень його чітко корелює із важкістю інфекційного процесу.

Дослідження проводили шляхом визначення рівня пресепсину за допомогою хемілюмінісцентного методу на аналізаторі PATHFAST (Mitsubishi Chemical Medience Corporation, Japan),

Для проведення аналізу використовувалась сироватка крові. Дослідження проводиться методом хемілюмінесцентного імуноферментного аналізу з використанням технології MAGTRATION® (технологія розподілу зв'язаного та вільного матеріалу, з промивкою магнітних частинок в наконечнику). Поліклональні антитіла до пресепсину, які пов'язані із лужною фосфатазою та моноклональні антитіла Пресепсин-зразка зв'язується з антитілами до нього та утворюють імунокомплекси із міченим ферментом антитілами та антитілами до магнітних частинок. Після виділення незв'язаного матеріалу до імунного комплексу додається хемілюмінісцентний субстрат. Після короткої інкубації під дією ферментної реакції в суміші починається люмінесценція, інтенсивність якої залежить від кількості пресепсину у зразку. Розрахунок результату проводиться по стандартній калібровочній кривій.

Нами було проведено обстеження 56 дітей (30 із локалізованими та генералізованими інфекціями і 26 дітей контрольної групи без ознак інфекційного процесу). Генералізована інфекція реєструвалася на основі критеріїв педіатричного сепсису, прийнятих на Міжнародній погоджувальній конференції з питань педіатричного сепсису (IPSSC 2005).

Діти дослідної групи та групи порівняння знаходились на лікуванні в Хмельницькій міській дитячій лікарні та Хмельницькій міській інфекційній лікарні протягом 2014-2016 рр. Вік дітей - від 4 міс. до 17 років (середній вік склав 6,29 років. Ді 95 % [4,41-8,17]) Дослідна група (діти із генералізованим інфекційним процесом) склали 16 осіб. Розподіл по статі був наступний: 9 хлопчиків та 7 дівчаток. У групу порівняння ввійшли діти із локалізованим інфекційним процесом - 14 осіб. Розподіл по статі: 10 хлопчиків та 4 дівчаток. Групу контролю склали 26 дітей (10 дівчаток та 16 хлопчиків), які знаходились на лікуванні в Хмельницькій обласній дитячій лікарні в 2014 році в кардіоревматологічному відділенні з функціональними розладами з боку ССС, на момент забору крові у них не було ознак інфекційного процесу.

В усіх групах розподіл показника пресепсину був відмінний від нормального, що було перевірено за допомогою критерію Колмогорова - Смирнова, тому середні значення результатів досліджень представлені у вигляді медіани із визначенням інтерквартильного інтервалу.

В результаті дослідження було отримано наступні результати в основній групі 1887,5 пг/мл (505,5-3702,5 пг/мл); група порівняння - 313,5 пг/мл (208-376 пг/мл); та у здорових дітей групи контролю 109 пг/мл (77,5-160 пг/мл).

Приклад: Хвора Г., 5 років, історія хвороби № 2067, переведена в Хмельницьку міську дитячу лікарню із Хмельницької обласної дитячої лікарні 04.03.2016 року у важкому стані зі скаргами на підвищення температури до 39 °С, сухий малопродуктивний кашель, біль в грудній клітці, зниження апетиту, загальну слабкість.

Перші симптоми захворювання з'явилися 20.02.16 р., коли відзначався підйом температури до 39 °С та з'явився кашель. Лікувалася амбулаторно, отримувала муколітичні засоби. Температура тіла нормалізувалась, кашель в динаміці зменшився. Стан погіршився 1.03.16 р., коли повторно з'явилась гіпертермія, збільшився кашель. Батьки звернулись в Хмельницьку обласну дитячу лікарню, куди дитина була госпіталізована для обстеження та лікування. Стан при надходженні важкий виражена слабкість, в'ялість, дитина відмовляється від їжі, турбує сухий малопродуктивний кашель, біль в грудній клітині, утруднене дихання в спокої. Температура тіла 38,9 °С, дитина в свідомості, шкірні покриви бліді, кінцівки холодні на дотик, симптом білої плями 5 секунд. Периферичних набряків немає. Частота дихань 34 в хв., без дотації кисню сатурація 88-90 %, дитина отримувала оксигенотерапію через лицьову маску. Перкуторно - притуплення легеневого звуку над лівою легенєю, аускультативно - різко ослаблене дихання зліва, крепитуючі хрипи з обох сторін. АТ-120/55 мм рт. ст., ЧСС - 152 в хв., тони серця звучні, ритмічні, тахікардія. Живіт доступний глибокій пальпації, печінка на 2 см виступає з-під реберної дуги, селезінка не збільшена. Перистальтика вислуховується. Діурез достатній.

В загальному аналізі крові: гемоглобін - 84 г/л, еритроцити $3,08 \times 10^{12}$ /л, КП 0,81, лейкоцити $15,9 \times 10^9$ /л, ШОЕ - 65 мм/год., тромбоцити - 210×10^9 /л, лейкоцитарна формула: паличкоядерні нейтрофіли - 28 %, сегментоядерні нейтрофіли - 48 %, лімфоцити - 19 %, моноцити - 4 %, еозинофіли - 1 %, токсична зернистість нейтрофілів - 45 %.

Клінічний аналіз сечі: питома вага - 1012, с\ж, білок - сліди, цукор 0,8 %, лейкоц. - 2-4 в п/з, ер. - 2-5 в п/з.

Біохімічний аналіз крові: загальний білок - 76,4 г/л, загальний білірубін - 9,14 ммоль/л, АЛТ - 0,81 Од/л, АСТ-1,06 Од/л, креатинін - 78,4 ммоль/л. Натрій - 124,6 ммоль/л, калій - 2,67 ммоль/л, глюкоза крові - 4,5 ммоль/л. СРБ - 4 мг/л.

Дитині проведено рентгенографію ОГК - діагностовано тотальну лівобічну пневмонію, плеврит.

Враховуючи ознаки ССЗР (тахікардію, тахіпноє, гіпертермію, гіперлейкоцитоз із збільшенням кількості незрілих форм нейтрофілів), чіткі дані за наявність інфекційного вогнища, ознаки розладів мікроциркуляції, дихальної недостатності, появи ознак токсичного ураження печінки у дитини запідозрено важкий сепсис. Для підтвердження генералізованого інфекційного процесу дитина була обстежена на рівень пресепсину крові, який склав 18809 пг/мл, що у 100 разів перевищує значення у групі здорових дітей.

Приклад 2: Хворий П., 5 років. Історія хвороби № 4148 був прийнятий 13.05.2014 року у Хмельницьку міську дитячу лікарню зі скаргами на субфербрильну температуру (37,8 °С), болі в животі, нудоту.

Зі слів батьків перші скарги у вигляді підвищення температури тіла та болів в животі з'явилися 11.05.2014 року. 13.05 звернулись в Волочиську ЦРЛ, де діагностовано позитивні симптоми подразнення очеревини був направлений у відділення дитячої хірургії Хмельницької міської лікарні.

Стан при надходженні важкий, обумовлений больовим синдромом та інтоксикацією. Шкірні покриви чисті, блідо-рожеві. Теплі на дотики. Симптом білої плями 3 сек. Слизові чисті, вологі, рожеві. Температура тіла 37,9 °С. ЧСС - 100 уд./хв. АТ-100/60 мм рт. ст. Аскультативно тони серця звучні, ритмічні. ЧД - 22 в хв. Грудна клітина приймає участь в акті дихання, втягнення міжреберних проміжків немає. Перкуторно над легеньками ясний легеневий звук, аскультативно - везикулярне дихання. Живіт не приймає участі в акті дихання, доскоподібний. При пальпації різко позитивні симптоми подразнення очеревини. Печінка на рівні правої реберної дуги, селезінка не пальпується. Перистальтика ослаблена. Діурез збережений.

Загальний аналіз крові: гемоглобін - 122 г/л, еритроцити $4,95 \times 10^{12}$ /л, КР 0,9, лейкоцити $20,1 \times 10^9$ /л, ШОЕ - 38 мм/год., тромбоцити - 270×10^9 /л, лейкоцитарна формула: паличкоядерні нейтрофіли - 3 %, сегментоядерні нейтрофіли - 84 %, лімфоцити - 9 %, моноцити - 4 %, еозинофіли - 0 %, токсична зернистість нейтрофілів - 20 %.

Клінічний аналіз сечі: питома вага - 1010, с\ж, білок - сліди, цукор невиявлено, лейкоц. - 2-4 в п/з, ер. - 0-1 в п/з.

Біохімічний аналіз крові: загальний білок - 68 г/л, загальний білірубін - 12,75 ммоль/л, креатинін - 61,6 ммоль/л. сечовина - 1,34 ммоль/л, Натрій - 136,2 ммоль/л, калій - 3,8 ммоль/л, глюкоза крові - 11,7 ммоль/л. СРБ - 96 мг/л.

Дитині проведено УЗД органів черевної порожнини - ознаки інфільтрації в ділянці апендикулярного відростку, наявність вільної рідини в черевній порожнині.

Для диференціювання ступеня розповсюженості інфекції дитині було проведено визначення рівню пресепсину - 436 пг/мл, що свідчить про локалізовану інфекцію. Дитині встановлено діагноз - Гострий гангренозно-перфоративний апендицит. Гнійний тазовий перитоніт.

Отже, запропонований метод раннього виявлення генералізації інфекційного процесу за допомогою визначення рівня пресепсину є ефективним та високочутливим.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб диференційної діагностики генералізованого та локалізованого гнійно-септичного стану у дітей, що передбачає визначення рівня пресепсину, який **відрізняється** тим, що дітям визначають рівень пресепсину сироватки крові хемілюмінесцентним методом із використанням аналізатора і при значенні пресепсину в межах 200-450 пг/мл діагностують локалізовану інфекцію, при рівні вище 500 пг/мл - генералізований інфекційний процес, а при рівні пресепсину до 160 пг/мл - це здорова дитина.

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601