



УКРАЇНА

(19) UA (11) 30180 (13) A

(51) 6 G01N33/72, A61B5/14

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЯВЛЕННЯ АТОПІЧНОЇ РЕАКТИВНОСТІ У ДІТЕЙ В СТАНІ КЛІНІЧНОГО БЛАГОПОЛУЧЧЯ

(21) 98010220

(22) 15.01.1998

(24) 15.11.2000

(33) UA

(46) 15.11.2000, Бюл. № 6, 2000 р.

(72) Безруков Леонід Олексійович, Богуцька Наталя Казимірівна, Колоскова Олена Костянтинівна, Ластівка Ірина Володимирівна, Ященко Юрій Борисович, Дмитришин Анатолій Андрійович, Гінгуляк Микола Георгієвич

(73) НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ІНСТИТУТ МЕДИКО-ЕКОЛОГІЧНИХ ПРОБЛЕМ МОЗ УКРАЇНИ, БУКОВИНСЬКА ДЕРЖАВНА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ

(57) Спосіб виявлення atopічної реактивності у дітей в стані клінічного благополуччя шляхом дослідження проби крові, який відрізняється тим, що після інкубування проби крові з нітросинім тетразолієм без пірогеналу та з його додаванням, визначають кількість формазанпозитивних еозинофілів, які враховують, поряд з відносним вмістом еозинофільних лейкоцитів крові, при обчисленні сумарного коефіцієнту показників еозинофілів крові (СКПЕк), та при його значеннях 3,0 та більше діагностують наявність atopічної реактивності у дитини.

Винахід відноситься до галузі медицини та, конкретно, дитячої алергології, для виявлення atopічної реактивності у дітей, що знаходяться в стані клінічного благополуччя.

Відомими є декілька напрямів у діагностиці алергічних захворювань у дітей. Так, описаний констеляційний метод виявлення даної патології, заснований на використанні виключно клініко-анамнестичних та епідеміологічних даних про перебіг алергічних захворювань у дітей (И.И. Балаболкин, А.В. Смирнов, М.К. Ермакова та співавт. Метод раннего прогнозирования развития аллергических болезней у детей // Вопросы охраны материнства и детства. - 1989. - Т. 34. - № 2. - С. 19-22; А.В. Кузнецова, Е.В. Бегичева, Р.А. Заринов та співавт. Диагностическая значимость определения уровня иммуноглобулина Е у новорожденных с аллергическим диатезом у их матерей // Казанский мед. Журнал. - 1988. - Т. 69. - № 3. - С. 180-181; В.В. Яздовский, И.Б. Резник, П.С. Бачурин, Л.П. Алексеев. Система HLA и предрасположенность к поливалентной сенсibilизации при атонических заболеваниях у детей // Педиатрия. - 1988. - № 2. - С. 110-111). Загальними недоліками цих аналогів можна вважати по-перше, високу коштовність пропонованих методів та, по-друге, високу частку суб'єктивності яка притаманнабору генеалогічного анамнезу, який не сягає більше ніж до третього покоління, і, по-третє, низьку інформативність (так, відносний ризик виникнення сенсibilізації за умов наявності антигену HLA В3 2 збільшується лише в 1,5-3,2 рази).

Прототипом способу, який заявляється, є спосіб діагностики алергії, що полягає у вивченні форми та структури еозинофілів периферичної крові із наступним розрахунком показника пошкодження еозинофілів, який за умов досягнення рівня 0,45 вважається значущим у діагностиці алергії (Е.С. Нишева, Н.А. Потихонова, Р.Д. Попова Спосіб діагностики алергии с помощью изучения морфологии эозинофилов // Клиническая лабораторная диагностика. - 1995. - № 2. - С. 29-32). Як і у способі, що дається, в якості найбільш інформативного об'єкту обрані еозинофіли крові, участь яких в алергічних реакціях не підлягає сумнівам. Однак, прототипу притаманний ряд суттєвих недоліків: 1) використання в якості маркеру алергічної реактивності морфологічних, а не метаболічних особливостей еозинофілів; 2) відсутність показників діагностичної цінності тесту по відношенню до прототипу, який включав визначення специфічного імунoglobуліну Е, у зв'язку із використанням неадекватного методу аналізу, який вказував на наявність відмінностей у розподілі ознак, а не чутливість та специфічність способу діагностики.

В основі способу, лежить виявлення atopічної реактивності організму у вигляді спадкової схильності до алергічних захворювань та конституційнальних їх проявів у дітей, які знаходяться в стані повного клінічного благополуччя, шляхом обчислення сумарного коефіцієнту показників еозинофілів крові (СКПЕк), щоб забезпечити високу специфічність діагностичного процесу.

Даний спосіб відрізняється від прототипу тим, що вираховується сумарний коефіцієнт показників

(19) UA (11) 30180 (13) A

еозинофілів крові (СКПЕК), компонентами якого виступає не тільки відносний вміст цих гранулоцитів у крові, але й показники їх кисневозалежного метаболізму у вигляді результатів тесту з нітросинім тетразолієм (НСТ-тест) в його спонтанному та стимульованому варіантах. Ця відмінність дозволяє зробити висновок про відповідність технічного вирішення, що заявляється, критерію "новизна".

Суттєва ознака, яка відрізняє технічне вирішення, від прототипу, не виявлена у інших технічних вирішеннях при вивченні даної та суміжних галузей науки та, таким чином, забезпечує відповідність способу, критерію "суттєва відмінність".

Спосіб здійснюють наступним чином. Оцінку кисневозалежної метаболічної активності еозинофілів крові, з врахуванням їх стимуляції пірогеналом, проводять за НСТ-тестом, який виконується за методом Park B.H. та співавт. (Park B.H., Fikrmg S.M., Smithwick B.M. Infection and nitroblue tetrasolium reduction by neutrophils: a diagnostic aid. // Lancet. - 1968. - Vol. 11. - P. 534-536) у модифікації Маянського А.Н. та співавт. [Маянский А.Н., Вискман М.Е., Котельников П.Н., Молчанов И.В. Характеристика функциональной активности нейтрофилов крови человека с помощью реакции восстановления нитросинего тетразолия. // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. - 1977. - N 6. - С. 108-111). Дві проби крові по 0,5 мл вміщують у сіліконізовані пробірки зі 100 ОД, гепарину в кожній. У першу пробірку додають 0,2 мл пірогеналу (бактеріальний ліпосахарид) у фосфатному буфері при рН 7,2. Через 5 хвилин у обидві пробірки додають по 0,5 мл 0,1% розчину нітросинього тетразолю у фосфатному буфері при рН 7,2 та інкубують у термостаті при температурі 37°C протягом 30 хвилин. Після центрифугування із швидкістю 1000 g протягом 5 хвилин з верхнього шару осаду кожної пробірки готують по 3 мазки, які висушують на повітрі, потім фіксують метанолом протягом 10 хвилин. Мазки для ідентифікації еозинофілівних гранулоцитів профарбовують реактивом Піралішвілі протягом 40-50 секунд. Реакцію оцінюють при мікроскопіруванні (збільшення 900, об'єктив 90, окуляр 10) у 50 еозинофілах. В залежності від вмісту гранул нерозчинного формазану виділяють три ступені вираженості НСТ-тесту: 0 ступінь - цитоплазма еозинофілів без гранул, I ступінь - мікрогранули займають 1/4-1/3 цитоплазми, II ступінь - гранули займають більше, ніж половину цитоплазми, III ступінь - гранули заповнюють всю цитоплазму. Результати реакції виражають у відсотках формазанопозитивних клітин.

Сумарний коефіцієнт показників еозинофілів крові (СКПЕК) розраховують наступним чином:

$$\text{СКПЕК} = \frac{\text{еоз.}, \%}{4} + \frac{\text{НСТсп.}, \%}{12} + \frac{\text{НСТст.} - \text{НСТсп.}, (\%) }{\text{НСТст.} - \text{НСТсп.}, (\%) + 1}$$

де: СКПЕК - сумарний коефіцієнт показників еозинофілів крові; еоз., % - відносна кількість еозинофілів у периферичній крові; НСТсп, % - відносна кількість формазанопозитивних еозинофілів у спонтанному варіанті НСТ-тесту еозинофілів крові; НСТст., % - відносна кількість формазанопозитивних еозинофілів у стимульованому пірогеналом варіанті НСТ-тесту еозинофілів крові; 4 - верхня межа нормативних показників відносного вмісту еозинофілів у периферичній крові (Р.Е. Берман, В.К. Воган. Педиатрия (Болезни глаз. Болезни ко-

жи. Токсикология. Проблемы подросткового возраста. Лабораторные тесты) Пер. с англ. - 2-ое изд. - М.: Медицина, 1994. - С. 500); 12 - середнє значення спонтанного НСТ-тесту еозинофілів крові у дітей контрольної референтної групи (% формазанопозитивних клітин).

У тих випадках, коли СКПЕК складає 3,0 та більше, діагностують наявність атонічної реактивності організму у дітей, що знаходяться на момент обстеження у стані повного клінічного благополуччя.

Діагностичні критерії способу виявлення атопічної реактивності у дітей в періоді клінічного благополуччя, наступні: специфічність його складає 93%, чутливість способу - 33%. Показник валідності способу, який обчислюється як різниця між сумою чутливості і специфічності та 100%, складає 26%.

У дітей за умов наявності у них показника СКПЕК більше 3,0 відношення ризику алергологічної обтяженості спадкового анамнезу збільшується у 4,2 рази ($\chi^2=4,7$; $P<0,05$), ризик виявлення спадкової алергологічної обтяженості та клінічних проявів алергії - вище у 6,1 рази ($\chi^2=6,6$, $P<0,02$). За умови значення СКПЕК менше 1,5, відношення ризику алергічних проявів у дітей знижується у 5,3 рази ($\chi^2=4,7$, $P<0,02$).

Таким чином, запропонований спосіб з використанням СКПЕК дозволяє з високою специфічністю визначати наявність атопічної реактивності у дітей в стані клінічного благополуччя і, таким чином, підтвердити алергічну природу їх захворювання після первинного клінічного скринінга за умов значення цього показника, що перевищує 3,0.

Клінічні приклади.

1. Хворий Т.Є., 21.08.1988 р.н., історія хвороби N 1310, знаходився на стаціонарному лікуванні з 14.11.1994 по 18.11.1994 р. у обласному радіаційно-екологічному диспансері. Клінічний діагноз: Дифузний зоб I ступеня, клінічно еутіреодний. Зубний карієс. З 2-х років спостерігається в групі часто та тривало хворіючих дітей з проявами обструктивного бронхіту. Дані параклінічного обстеження: відносний вміст еозинофілів у периферичній крові - 4%, НСТ-тест еозинофілів спонтанний - 12%, НСТ-тест еозинофілів крові стимульований - 0. СКПЕК=3,09. При детальному збиранні анамнезу з'ясовано наявність клінічних проявів харчової алергії при вживанні шоколаду, алергічну реакцію на введення ампіциліну; у матері - астматичний бронхіт, у бабусі по лінії матері - алергічний дерматит. Атонічна реактивність у даного хворого є вірогідною.

2. Хворий Д.І., 10.04.1991 р.н., історія хвороби N 1435, знаходився на стаціонарному лікуванні з 8.12.1994 по 15.12.1994 р. у обласному радіаційно-екологічному диспансері. Клінічний діагноз: Полідефіцитна анемія I-II ступеня. Аденоїдні вегетації I-II ступеня. Рецидивуючий обструктивний бронхіт, стадія ремісії. З 2-х років спостерігається в групі часто та тривало хворіючих дітей. Дані параклінічного обстеження: відносний вміст еозинофілів у периферичній крові - 4%, НСТ-тест еозинофілів спонтанний - 40%, НСТ-тест еозинофілів крові стимульований - 36%. СКПЕК=5,7. У бабусі по лінії матері - бронхіальна астма. Хлопчик часто хворіє

на бронхіти з обструктивним компонентом. Атонічна реактивність хворого є достовірною.

3. Хвора М.О., 18.10.1888 р.н., історія хвороби N 546, знаходилась на стаціонарному лікуванні у обласному дитячому радіаційно-екологічному диспансері з 10.05.1995 по 15.05.1995 року. Клінічний діагноз: Дискінезія жовчно-вивідних шляхів по гіперкінетичному типу. Зубний карієс. В анамнезі вказівки на часті гострі респіраторні захворювання, а також перенесену гостру пневмонію. Дані параклінічного обстеження: відносний вміст еозинофілів у периферичній крові - 2%, НСТ-тест еозинофілів спонтанний - 12%, НСТ-тест еозинофілів крові стимульований - 34%. СКПЕк2,4б. Спадковий та особистий алергологічний анамнез не обтяжені.

Атонічна реактивність у даної хворої заперечується.

Таким чином, використання способу, що заявляється, дозволяє з високою специфічністю виявляти атонічну реактивність організму дітей, які обстежені в стані клінічного благополуччя. Це, за умов простоти і доступності способу, дає можливість його використання в якості підтвердження даних клінічного скринінга у відношенні алергічної природи захворювань у дітей з метою націоналізації профілактичних, лікувальних і реабілітаційних заходів. Цим забезпечується позитивний вплив на стан здоров'я дітей, а також отримання позитивного економічного ефекту в процесі їх медичного обслуговування.

ДП "Український інститут промислової власності" (Укрпатент)
Україна, 01133, Київ-133, бульв. Лесі Українки, 26
(044) 295-81-42, 295-61-97

Підписано до друку _____ 2002 р. Формат 60x84 1/8.
Обсяг _____ обл.-вид. арк. Тираж 35 прим. Зам. _____

УкрІНТЕІ, 03680, Київ-39 МСП, вул. Горького, 180.
(044) 268-25-22
