



УКРАЇНА

(19) UA (11) 57076 (13) U
(51) МПК (2011.01)
G01N 33/48

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ПРИГОТУВАННЯ КОПРОФІЛЬТРАТУ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ІНТЕРЛЕЙКІНІВ КОПРОФІЛЬТРАТУ У ДІТЕЙ РАНЬОГО ВІКУ З ГОСТРИМИ КИШКОВИМИ ІНФЕКЦІЯМИ, СПРИЧИНЕНИМИ УМОВНО-ПАТОГЕННОЮ МІКРОФЛОРОЮ

1

(21) u201008799

(22) 15.07.2010

(24) 10.02.2011

(46) 10.02.2011, Бюл.№ 3, 2011 р.

(72) ЛИТВИН ГАЛИНА ОРЕСТІВНА, СІЧКОРІЗ ОРЕСТ ЄВГЕНОВИЧ, ЛАПОВЕЦЬ ЛЮБОВ ЄВГЕНІВНА, НАДРАГА ОЛЕКСАНДР БОГДАНОВИЧ

(73) ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО

(57) Спосіб приготування копрофільтрату для визначення інтерлейкінів копрофільтрату у дітей раннього віку з гострими кишковими інфекціями, спричиненими умовно-патогенною мікрофлорою, що включає додавання у фекалії буферу (pH=7,2)

2

у співвідношенні 1:1, освітлення отриманої суспензії центрифугуванням, фільтрування надосадової рідини через міліпоровий фільтр з діаметром пор 0,45 μm та використання її для визначення рівня інтерлейкінів або заморожування до -70°C для наступного використання, який відрізняється тим, що у досліджувані фекалії додають стерильний, забуферений фосфатами фізіологічний розчин і отриману суспензію центрифугують з охолодженням до постійної температури у центрифугу +4 $^\circ\text{C}$ тривалістю 40 хв. та фільтрують через міліпоровий фільтр з охолодженням до +4 $^\circ\text{C}$.

Корисна модель належить до медицини, зокрема до педіатрії, і може застосовуватися для визначення інтерлейкінів у копрофільтраті, що, у свою чергу, буде використовуватися для ранньої діагностики та прогнозування функціонального стану кишківника при гострих кишкових інфекціях (ГКІ), спричиненими умовно-патогенною мікрофлорою (УПМ).

На сьогоднішній день відомо, що на розвиток патологічного процесу в кишківнику при ГКІ впливає синтез інтерлейкінів у лімфоїдній тканині. Відомо, що до таких інтерлейкінів передусім слід віднести IL-1, IL-6 і IL-8, а також IL-11. Прозапальні властивості IL-1, зокрема IL-1 β , виражені настільки, що його можна назвати «лідером» цитокінів запалення. Прозапальний ефект цих інтерлейкінів, в першу чергу, пов'язаний зі збільшенням синтезу білків гострої фази, пірогенних субстанцій, колагену та вираженої здатності впливати на ендотелій судин [1].

В Україні визначення інтерлейкінів копрофільтрату не проводиться, тому залишається невирішеною проблемою як спосіб приготування копрофільтрату, так і сам спосіб дослідження рівнів інтерлейкінів у ньому.

Найближчим аналогом є відомий спосіб виготовлення копрофільтрату, який рекомендований А.

Tasnim [2] у 1995 р. Суть цього методу полягає у тому, що до 1 г фекалій додають 1 мл стерильного фосфатного буферу (pH=7,2) і освітлюють центрифугуванням при 20000 $\times g$. Надосадову рідину фільтрують через міліпоровий фільтр з діаметром пор 0,45 μm (фірма Sartorius, Німеччина).

Однак в описаному вище способі центрифугування проводять без охолодження, що впливає на якість отриманих результатів, у зв'язку з нестійкістю інтерлейкінів при вищій температурі. Окрім того, використовують фосфатний буфер (pH=7,2), що також знижує якість виготовленого копрофільтрату.

В основу корисної моделі поставлено завдання удосконалити спосіб виготовлення копрофільтрату для визначення інтерлейкінів у ньому у дітей раннього віку при гострих кишкових інфекціях, спричиненими умовно-патогенною мікрофлорою шляхом зміни умов центрифугування та складу буферу, що сприятиме поліпшенню якості досліджень.

Поставлене завдання вирішується тим, що у способі приготування копрофільтрату для визначення інтерлейкінів копрофільтрату, що включає додавання у фекалії буферу (pH=7,2) у співвідношенні 1:1, освітлення отриманої суспензії центрифугуванням, фільтрування надосадової рідини

(13) U

(11) 57076

(19) UA

через міліпористий фільтр з діаметром пор 0,45 μm та використання її для визначення рівня інтерлейкінів, або заморожування до -70°C для наступного використання, згідно з корисною моделлю, у дітей раннього віку з гострими кишковими інфекціями, спричиненими умовно-патогенною мікрофлорою, у досліджувані фекалії додають стерильний, забуферений фосфатами фізіологічний розчин і отриману суспензію центрифугують з охолодженням до постійної температури у центрифугу $+4^\circ\text{C}$ тривалістю 40 хв. та фільтрують через міліпористий фільтр з охолодженням до $+4^\circ\text{C}$.

Гострі кишкові інфекції у дітей, особливо раннього віку, залишаються однією з найважливіших проблем педіатрії у зв'язку з їх поширеністю, сприйнятливостю, високою контагіозністю збудників. Такий стан проблеми пов'язаний зі збільшенням спектра мікроорганізмів та чинників, які сприяють зростанню їх вірулентності, станом мікробного пейзажу (ступенем дисбіозу), перенесеними в анамнезі ГКІ, призначенням дитині антибіотиків, раннім штучним, незбалансованим харчуванням, імунологічними особливостями дитячого організму.

Основними діагностичними критеріями ГКІ, спричинених УПМ, є бактеріологічне дослідження калу та реакція аглютинації з аутоштамом.

Проте ці обстеження потребують досить тривалого часу. Тому важливими та інформативними показниками прогнозування важкості перебігу ГКІ, спричинених УПМ у дітей раннього віку, можна вважати рівень інтерлейкінів (IL-1, IL-6) копрофільтрату.

Запропонований спосіб здійснюють таким чином. 1 г фекалій ретельно змішують і розтирають у керамічній ступці, охолодженій до $+4^\circ\text{C}$, з 1 мл стерильного, забуференого фосфатами, фізіологічного розчину ($\text{pH}=7,2$). Отриману суспензію центрифугують з охолодженням до постійної тем-

ператури у центрифугу $+4^\circ\text{C}$ та тривалістю центрифугування 40 хв. для кращого осадження нерозчинних фрагментів з суспензії фекалій. Надосадову рідину фільтрують через охолоджений міліпористий фільтр з діаметром пор 0,45 μm . Отриману рідину або одразу використовують для визначення рівня інтерлейкінів, або заморожують до -70°C для наступного використання.

Для підтвердження ефективності запропонованого способу були проведені клінічні дослідження. Під спостереженням перебувало 56 дітей перших трьох років життя, які знаходились на стаціонарному лікуванні в Інфекційній клінічній лікарні м. Львова з діагнозом ГКІ, спричинених *E. aerogenes*. Пацієнти були розподілені на дві групи. До першої групи увійшло 36 дітей віком 6-24 місяців, а до другої - 20 дітей віком 24-36 місяців. Усім дітям, окрім рутинних клінічних та лабораторних обстежень, визначали рівень прозапальних інтерлейкінів (IL 1 β , IL 6) у випорожненнях методом імуноферментного аналізу ELISA, з використанням наборів реагентів фірми Diacalone (Франція). Роль *E. aerogenes* як збудника ГКІ було підтверджено за результатами реакції аглютинації з аутоштамами. Пацієнти отримували антибактеріальні препарати (цефалоспорины або ніфуроксазид, сорбенти, симптоматичну терапію.)

У динаміці захворювання у більшості пацієнтів відносно швидко спостерігалася позитивна динаміка. Так, гіпертермія на третю добу стаціонарного лікування спостерігалась лише у $19,4 \pm 2,22\%$ дітей першої групи і у $10,0 \pm 1,09\%$ пацієнтів з другої групи. Синдром діареї, в середньому, утримувався протягом $3,7 \pm 0,45$ днів, блювання - до $1,9 \pm 0,20$ днів. З третього дня перебування у стаціонарі практично всі діти отримували адекватне ентеральне харчування (Таблиця 1).

Таблиця 1

Клініко-лабораторна характеристика обстежених дітей

Клінічні ознаки	Група 1 (36 дітей)	Група 2 (20 дітей)
Блювання (в %)	$26,4 \pm 3,50$	$32,5 \pm 4,14$
Тривалість блювання (дні)	$1,56 \pm 0,05$	$1,4 \pm 0,18$
Діарея (в %)	$73,4 \pm 8,31$	$99,7 \pm 9,66$
Тривалість діареї (дні)	$3,68 \pm 0,40$	$3,73 \pm 0,22$
Гіпертермія на момент госпіталізації (%)	$88,9 \pm 6,23$	$75,0 \pm 8,50$
Гіпертермія на 3 день стаціонарного лікування (%)	$19,4 \pm 2,22$	$10,0 \pm 1,09$
Абсолютна кількість лейкоцитів ($\times 10^9/\text{л}$)	$7,82 \pm 2,64$	$8,93 \pm 3,99$
Абсолютна кількість нейтрофілів ($\times 10^9/\text{л}$)	$3,79 \pm 0,88$	$4,46 \pm 0,52$
Кількість лейкоцитів при копрологічному дослідженні (в полі зору)	$5,46 \pm 2,91$	$4,70 \pm 1,35$

Примітка: середня величина \pm стандартне квадратичне відхилення (SD)

За даними наших досліджень рівні інтерлейкінів (IL 1 β , IL 6) у копрофільтаті дітей, у яких виявлено двокомпонентні мікробні асоціації, були дос-

товірно вищими, ніж у дітей з ГКІ, зумовленим лише *E. aerogenes* (Таблиця 2).

Таблиця 2

Рівні інтерлейкінів IL 1 β та IL 6 у копрофільтратах (мг/пл.)

Інтерлейкіни	Група 1	Група 2	P
IL 1 β (копрофільтрат)	78,47 \pm 11,06	118,55 \pm 22,41	<0,05
IL 6 (копрофільтрат)	0,13 \pm 0,03	0,07 \pm 0,01	=0,08

Примітка: середня величина \pm стандартне квадратичне відхилення (SD)

Збільшення концентрації прозапальних цитокінів у копрофільтраті (IL 1 β , IL 6), обумовлюється індукцією великої кількості бактеріальних ДНК, антигенів в слизовій кишківника, визначення їх концентрацій може використовуватись для оцінки вираженості запальних змін при ГКІ, спричинених УПМ, прогнозу хвороби та ризику розвитку рецидивів. Високі рівні цих цитокінів свідчать, передусім, про поліетіологічну причину ГКІ, викликаних УПМ, у дітей перших років життя.

Таким чином, запропонований спосіб приготування копрофільтрату для визначення інтерлейкінів копрофільтрату у дітей раннього віку з ГКІ, спричинених УПМ, з використанням стерильного забуференого фосфатами фізіологічного розчину

та центрифуги з охолодженням і тривалістю центрифугування 40 хв., забезпечує приготування копрофільтрату для визначення інтерлейкінів у ньому.

Джерела інформації:

1. Муквіч О. М. Оцінка цитокінового профілю дітей із порушеннями мікробіоти кишечника та його патогенетична обумовленість // Здоров'є ребенка. - 2008. - № 4 (13). - С. 55-58.

2. Tasnim Azim, R. Chandra Haider, M. Safiullah Sarker. Cytokines in the Stools of Children with Complicated Shigellosis. - Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology, Juli 1995, p. 492-495.