



УКРАЇНА

(19) UA (11) 57944 (13) A

(51) 7 A61B10/00, G01N33/48

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДВидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ Виявлення генералізованих інфекційно-запальних захворювань у грудних дітей

1

2

(21) 2001118137

(22) 28 11 2001

(24) 15 07 2003

(46) 15 07 2003, Бюл. №7, 2003 р.

(72) Іванова Лорина Алімівна, Аль Абуд Мазен, SY

(73) БУКОВИНСЬКА ДЕРЖАВНА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ

(57) Спосіб виявлення генералізованих інфекційно-запальних захворювань у грудних дітей шляхом дослідження проби крові, який

відрізняється тим, що для підвищення точності після інкубування проби крові з нітросинім тетразолієм, при результатах тесту $\geq 17,0\%$ формазан-позитивних нейтрофілів, та кількісного визначення С-реактивного протеїну сироватки крові, при його вмісті $\geq 10,0$ мг/л, діагностується генералізований характер гострого інфекційно-запального захворювання у дітей грудного віку

Винахід відноситься до галузей медицини, зокрема неонатології та дитячих інфекційних хвороб, метою його є оптимізація діагностики генералізованих інфекційно-запальних, тобто септичних, процесів у дітей перших місяців життя.

Однією з актуальних проблем сучасної неонатології є попередження розвитку гнійно-запальних захворювань і неонатального сепсису, оскільки за останні роки не відбулось значного зменшення їх частоти [Seidel H.M., Rosenstein B.J., Pathak A. Primary Care of the Newborn /Mosby-Year Book, USA - 1993 - P. 329-383]. Клінічні прояви сепсису різноманітні, а в недоношених дітей - неспецифічні, що значно утруднює діагностичний пошук. Водночас летальність при сепсисі складає і сьогодні від 50 до 90%. Поряд із традиційними лабораторними діагностичними критеріями по загальному і біохімічному аналізах крові, мікробіологічними дослідженнями, існує чимало праць, присвячених вивченню взаємозв'язку імунологічних показників з важкістю інфекційно-запального процесу [Авалишвили Т.В. Фибронектин сыворотки и показатели НСТ-теста у недоношенных детей первых месяцев жизни при сепсисе // Педиатрия - 1997 - №3 - С. 8-10].

Загальновідомим є тест з нітросинім тетразолієм (НСТ-тест) нейтрофільних гранулоцитів крові, який знайшов своє використання в діагностиці бактеріальних ускладнень при респіраторних вірусних інфекціях [Церегородцев А.Д. НСТ-тест в диагностике бактериальных осложнений острых респираторно-вирусных заболеваний у детей//

Казанский медицинский журнал - 1979 - №1 - С. 16-18], в діагностиці пневмоній у новонароджених дітей [Способ диагностики пневмонии у новорожденных (О.И. Пикуза, Е.П. Гуревич, А.Н. Маянский, М.Е. Виксман) - Бюллетень изобретений - 30.04.1981 - №16 - АС №825012], в прогнозуванні генералізації стафілококової інфекції у новонароджених дітей [Способ прогнозирования генерализации стафилококковой инфекции у новорожденных (Е.А. Азова, Л.В. Бояринова, Н.А. Азов, А.Н. Маянский, И.Г. Шиленок) - Бюллетень изобретений - 1986 - №10 - С. 19 - АС №1217352].

Однак на показники киснево залежної мікробіцидності нейтрофільних гранулоцитів крові можуть впливати і інші, неінфекційні (наприклад, гіпоксині і гіпоксемічні) фактори [Е.А. Дегтярева, Д.Ш. Самуилова, Э.А. Островская, Т.Н. Саркисова. Значение НСТ-теста в диагностике инфекционных осложнений у больных с врожденными пороками сердца // Педиатрия - 1995 - №6 - С. 50-54], що привносить частку хибно позитивних результатів та утруднює верифікацію септичного процесу на підставі даного лабораторного методу.

Відомо також, що при сепсисі найбільш чутливим і швидким індикатором ураження є С-реактивний білок [А.Н. Татаркина. Клиническое значение исследования С-реактивного белка в детской инфектологии // Микробиология, эпидемиология и клиника инфекционных болезней. Сб. научных трудов - Харьков, 1991 - С. 73-76], концентрація якого в сироватці крові починає збільшуватись вже через 6-8 годин від початку захворюван-

(13) A
(11) 57944
(19) UA

ня, сягаючи максимального рівня (100мг/л і вище) на 2-3 добу бактеріальної інфекції [H Baumann & J Gaudie The acute phase response// Immunologie Today - 1994 - N2 - S 74-90]. На думку багатьох дослідників, концентрація С-реактивного білку в сироватці крові є одним з найкращих тестів для ранньої діагностики септицемії [C Berger, J Clehlinger, D Ghelfi et al Comprasion of C-reactive protein and white blood cell count with differential in neonates at risk for septicaemia// Eur J/ Pediatr - 1995 - Vol 154, N2 - P 138-144 Цит МРЖ - Раздел 4 - 1996 - №3 - библ 20].

Водночас в інших роботах, присвячених проблемі неонатального сепсису, заперечується інформативність цього показника щодо верифікації діагнозу сепсису, оскільки чутливість його коливається в межах 47-100%, а специфічність складає 6-97% [Powell K R, Marcy S M Laboratory aids for diagnosis of neonatal sepsis. In Remington J, Klein J, eds Infectious diseases of the fetus and newborn infant 4th ed - Philadelphia Saunders, 1995 - PP 1223-1240, D LJaye, K B Waites Clinical applications of Oreactive protein in peditrncs// Pediatr Infect Dis J - 1997 - N16 - PP 735-747].

Таким чином, недоліками цих аналогів є те, що вказані вище методи у їх відокремленому використанні дають багато хибнонегативних та хибнопозитивних результатів, що в решті знижує їх діагностичну цінність у верифікації генералізованих інфекційно-запальних процесів у новонароджених та дітей перших місяців життя.

Прототипом способу, що заявляється, є спосіб діагностики бактеріальних інфекцій неонатального періоду у дітей за допомогою показників С-реактивного протеїну, α 1-антитрипсину, гаптоглобіну, α 1-кислого глікопротеїду, α 2-макроглобуліну, С3 і С4 компонентів комплементу в сироватці крові новонароджених [Белки "острой фазы" воспаления при бактериальных инфекциях у новорожденных детей// Н Н Володин, В В Долгов, Д Н Дегтярев, С С Раков, А А Липагина, А В Кривоножко// Российский вестник перинатологии и педиатрии - 2000 - №1 - С 10-14].

Недоліками прототипу слід вважати відсутність оцінки епідеміологічної цінності вивчених гострофазових білків, використання в аналізі лише хворих на гостру пневмонію замість хворих з бактеріальними інфекціями, низьку чутливість цього методу при окремому використанні рівня С-реактивного протеїну в сироватці крові.

В основі способу, що заявляється, лежить підтвердження генералізованих інфекційно-запальних процесів у дітей грудного віку за допомогою комплексу показників вмісту С-реактивного білка та тесту нейтрофільних гранулоцитів крові з нитросинім тетразолієм для забезпечення раціональної стартової антибіотикотерапії в перші дні захворювання.

Завданням способу, що заявляється, є максимальне спрощення процесу виявлення генералізованих інфекційно-запальних процесів у дітей грудного віку для оптимізації лікувально-профілактичних заходів цій групі хворих з метою зменшення летальності та інших небажаних наслідків септичних процесів. Даний спосіб є загальнодоступним, інформативним, не потребує склад-

ної і кошовної апаратури і реактивів і дозволяє в короткий термін верифікувати наявність септичного процесу вказаній віковій групі дітей.

Поставлене завдання досягається наступним чином у хворих дітей інкубують пробу крові з нитросинім тетразолієм (НСТ-тест) з підрахунком формазанпозитивних нейтрофілів та визначають вміст С-реактивного білку за допомогою методу простої радіальної імунодифузії в агарі, та при значеннях С-реактивного протеїну сироватки $\geq 10,0$ мг/л та даних спонтанного НСТ-тесту нейтрофілів крові $\geq 17,0\%$ діагностують генералізований інфекційно-запальний процес.

Даний спосіб відрізняється від прототипу тим, що враховуються не тільки результати визначення кількості С-реактивного протеїну сироватки крові, але й показники клітинного імунітету, а саме реакція нейтрофільних гранулоцитів периферичної крові з нитросинім тетразолієм, в комплексі обстежень, спрямованих на верифікацію септичного характеру інфекційно-запальних захворювань у дітей періоду грудного віку. Ця відмінність дозволяє зробити висновок про відповідність технічного вирішення, що заявляється, критерію "новизна".

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

Спосіб здійснюють наступним чином оцінку кисневозалежної метаболічної активності нейтрофільних лейкоцитів крові проводять за НСТ-тестом, який виконується за методом Park B H та співавт (Park B H, Firkling S M, Smithwick B M Infection and nitroblue tetrazolium 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 - №6 - с 108-111).

Спосіб здійснюють таким чином

Забір венозної крові становить 0,5 мл, яку вносять в силіконізовану пробірку з гепарином (100Д/мл), до цієї пробірки фосфатний буфер (pH-7,2). Через 5 хвилин при кімнатній температурі у пробірку додається по 0,1% розчин НСТ на фосфатному буфері. Після струшування, перемішування пробу інкубують 10 хвилин при $+37^{\circ}$ в термостаті. Після 15-хвилинного охолодження при кімнатній температурі впродовж 5 хвилин пробі центрифугують (1000 G), з верхньої частини осаду роблять мазок, який висушують, фіксують 5 хвилин в метанолі (або у суміші Нікіфорова), фарбують реактивом Піралішвілі протягом 45-50 секунд та підраховують при мікроскопії (зб 900, об 90, ок 10 з використанням імерсійного масла) у 100 нейтрофілах "порожні" і такі, що профагоцитували НСТ клітини.

Кількісне визначення С-реактивного білку проводять методом простої радіальної імунодифузії в агарі [Mancini G, Garbonaro A O, Heremnus G F

Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion// Immunochemistry - 1985 - Vol 2 - 239-254]

Хід визначення

1 Розчиняють агар в 20мл дист. води на водяній бані і охолодити до 48 град С - 1,5-2% (або фосфатний буфер чи 5% NaCl)

2 Одразу змішують з підігретою до 40 град С антисироваткою до CPB в співвідношенні 1:20

3 Наносять піпеткою по 2мл суміші на 10 предметних скелець, встановлених горизонтально, у застиглому гелі готуються лунки. В кожну лунку вносять по 5мкл досліджуваного зразка і стандартну сироватку з визначеним вмістом С-реактивного білку (для побудовання калібровочного графіку, роблять ряд розведень стандарту)

4 Забір діаметру кілець преципітації проводять через 4 години, остаточний - через 24 години.

Діагностичні критерії способу, що заявляється, щодо підтвердження генералізованих інфекційно-запальних процесів у дітей грудного віку наступні при рівні вмісту С-реактивного протеїну сироватки $\geq 10,0 \text{ мг/л}$ та даних спонтанного НСТ-тесту нейтрофілів крові $\geq 17,0\%$ формазанпозитивних клітин, діагностується септичний, тобто генералізований характер гострого інфекційно-запального процесу.

Показники діагностичної цінності способу підтвердження генералізації інфекційно-запального процесу у дітей грудного віку, що заявляється, наступні: специфічність його складає - 84%, чутливість - 92%, позитивна передбачувальна цінність - 75%, негативна передбачувальна цінність - 88%. Показник валідності способу, що заявляється, який обчислюється як різниця між сумою чутливості і специфічності та 100%, складає 56%. Атрибутивний ризик (AR) наявності септичного процесу при вказаних показниках тесту з нитросинім тетразолієм нейтрофілів крові і вмісту С-реактивного протеїну дорівнює 62%, відносний ризик (RR) - 5,7 разів при відношенні ризиків (OR) - 21,0.

Таким чином, запропонований спосіб з використанням комплексу показників вмісту С-реактивного протеїну сироватки $\geq 10,0 \text{ мг/л}$ та даних спонтанного НСТ-тесту нейтрофілів крові $\geq 17,0\%$ із високою чутливістю і негативною передбачуваною цінністю при достатній специфічності дозволяє підтвердити генералізований характер гострого інфекційно-запального процесу у дітей грудного віку із достатніми показниками абсолютного та відносного ризику наявності септичного процесу.

Суть винаходу пояснюється конкретними прикладами застосування способу.

Приклад 1

Дитина Буга Юлія Петрівна, 9.06.99р народження, с. Веренчанка Заставнянського району, поступила до інфекційного відділення Обласної дитячої клінічної лікарні м. Чернівці 18.07.99р на 3 день хвороби з ознаками інтоксикації, зневоднення, підвищення температури тіла. С-реактивний білок - 120 мг/л , НСТ-тест нейтрофілів крові - 41%. Діагностований сепсис. При подальшому обстеженні діагноз підтверджений за допомогою інших клініко-інструментальних методів. Виписана на 33 добу із видужанням.

Приклад 2

Дитина Чихутін Вадим, 12.04.99р народження, Обласний будинок дитини, поступив до інфекційного відділення Обласної дитячої клінічної лікарні м. Чернівці 12.05.99р з ознаками інтоксикації, гнійничковими утвореннями на тілі, але нормальною температурою тіла. Захворювання розвинулося поступово. С-реактивний білок - 120 мг/л , НСТ-тест нейтрофілів крові - 39%. Діагностований сепсис. При подальшому обстеженні діагноз підтверджений за допомогою інших клініко-інструментальних методів. На 27 добу із видужанням переведений до Обласного будинку дитини.

Приклад 3

Дитина Владян Денис Васильович, 22.08.99р народження, с. В.Петрівці Сторожинецького району, поступив до інфекційного відділення Обласної дитячої клінічної лікарні м. Чернівці 11.10.99р з ознаками помірно інтоксикації, підвищення температури тіла. Хворіє впродовж 2-х тижнів, лікувався в районній лікарні, з покращанням переведений в обласну лікарню для більш детального обстеження. С-реактивний білок - негативний, НСТ-тест нейтрофілів крові - 15%. Діагноз сепсису не підтвердився. При подальшому обстеженні встановлено Гіпоксично-ішемічне ураження ЦНС із затримкою статокінетичних функцій. Виписаний на 9 добу з покращанням.

Приклад 3

Дитина Каламанчук Андріян Марчелович, 29.04.98р народження, с. Байраки Герцаївського району, поступив до інфекційного відділення Обласної дитячої клінічної лікарні м. Чернівці 20.10.98р з ознаками помірно інтоксикації, анемії, гіпотрофії, та неврологічною симптоматикою. Хворіє з народження. Двічі лікувався у стаціонарі. С-реактивний білок - негативний, НСТ-тест нейтрофілів крові - 14%. Діагноз сепсису не підтвердився. При подальшому обстеженні встановлено Імунodefіцитний стан. Гіпотрофію І ступеню змішаного генезу. Гіпоксично-ішемічне ураження ЦНС. Виписаний на 10 добу з покращанням.

Таким чином, використання способу, що заявляється, дозволяє з високою чутливістю підтверджувати генералізований характер гострого інфекційно-запального процесу у грудних дітей. Це, за умови простоти і доступності способу, дає можливість його використання в якості методу первинного скринінгу у дітей грудного віку із гострими інфекційно-запальними процесами, що забезпечить своєчасне вирішення питання про раціональне призначення антибактеріальних засобів та отримання позитивного економічного ефекту, зокрема за рахунок скорочення середньої тривалості перебування на ліжку та необґрунтованого призначення потужних антибіотиків і інших лікувальних засобів.

Цим забезпечується позитивний вплив на стан здоров'я дітей грудного віку, а також покращання показників малюкової смертності внаслідок септичних процесів.

