



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) UA

(11) 85751

(13) U

(51) МПК

G01N 33/48 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2013 07990**

(22) Дата подання заявки: **25.06.2013**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **25.11.2013**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **25.11.2013, Бюл.№ 22**

(72) Винахідник(и):

**Незгода Ірина Іванівна (UA),
Науменко Ольга Миколаївна (UA),
Макух Галина Василівна (UA),
Тиркус Марта Ярославівна (UA)**

(73) Власник(и):

**ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. М.І.
ПИРОГОВА,
вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, 21018 (UA)**

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ЛАКТАЗНОЇ НЕДОСТАТНОСТІ У ДІТЕЙ РАНЬОГО ВІКУ З РОТАВІРУСНОЮ ІНФЕКЦІЄЮ

(57) Реферат:

Спосіб діагностики первинної лактазної недостатності у дітей раннього віку з ротавірусною інфекцією передбачає проведення молекулярно-генетичного дослідження, встановлення поліморфізму 13910 С>Т гена LCT з подальшим аналізом генотипів, що асоціюються з непереносимістю лактози.

UA 85751 U

Корисна модель належить до медицини, а саме до дитячої гастроентерології та дитячих інфекційних хвороб, і стосується діагностики первинної лактазної недостатності у дітей раннього віку з ротавірусною інфекцією.

Однією з важливих проблем сучасної гастроентерології є захворювання органів травлення, що супроводжуються порушенням кишкового всмоктування, так званім, синдромом мальабсорбції. Найбільш часто зустрічається мальабсорбція дисахаридів: лактози, сахарози, мальтози, ізомальтози [Мисник В.П. Непереносимость лактозы. Современные принципы патогенетической терапии / В.П. Мисник // Therapia.-2007. - № 12. - С. 60-64].

Зниження активності ферменту лактази призводить до неможливості розщеплення та засвоєння молочного цукру - лактози. Лактазна недостатність (ЛН) - вроджений чи набутий стан, що характеризується непереносимістю молока через відсутність або знижену активність ферменту лактази [Делягин В.М. Полиморфизм гена лактазы у детей с atopическими заболеваниями / В.М. Делягин, К.Г. Каграманова, Е.Г. Шугурина, И.В. Сичинава, М.В. Соколова, С.А. Боринская, Н.К. Янковский // Педиатрия.-2008. - № 4, том 87. - С. 15-18.].

Проблема ЛН найбільш актуальна для дітей раннього віку, тому що саме в даний віковий період, молоко та молочні продукти складають основну частку в раціоні дитини [Нагорная Н.В. Лактазная недостаточность у детей / Н.В. Нагорная, Е.В. Бордюгова, А.В. Дубовая // Здоровье ребенка.-2012. - № 7 - С. 107-114.].

Відомо, що здатність розщеплювати молочний цукор пов'язана з активністю ферменту лактаза-флоризингідролази, більш відомого як лактаза або β -D галактозидгідролаза. Лактаза-флоризингідролаза кодується єдиним геном (LCT), що локалізується на 2 хромосоми [Basso MS. Association between celiac disease and primary lactase deficiency / Basso MS, R Luciano, F Ferretti, M Muraca, F Panetta, F Bracci, S Ottino, A Diamanti // Eur J Clin Nutr.-2012. - № 66 (12). - P. 1365-1365.]. Ген LCT складається із 17 екзонів, кодує мРНК, яка копіює 6274 нуклеотиди, й препропротеїн, що складається з 1927 амінокислотних залишків. Звільнений в результаті протеолізу попередник лактази, під час транспортування в цитоплазмі піддається серії О- та N-глікозилювань, після чого і утворюється активний фермент - лактаза [Heyman M.B. Lactose intolerance in infants, children and adolescents / M.B. Heyman // Pediatrics.-2006. - Vol. 118 (3). - P. 1279-1286.].

Сьогодні ротавірусна інфекція вважається домінуючим етіологічним фактором гострих кишкових інфекцій (ГКІ) у дітей. Щороку в світі реєструється більш ніж 138 млн. випадків даного захворювання серед дитячого населення [Крамарев С.А. Ротавирусная инфекция: эпидемиология и профилактика / С.А. Крамарев, Л.В. Закордонец // Здоровье ребенка.-2011. - № 1 (28). - С. 53-55.].

Останні наукові дослідження показали, що ротавірусний протеїн NSP4 є специфічним ентеротоксином, здатним викликати секреторну діарею і запускати механізми розвитку дисахаридазної недостатності. При цьому дисахаридазна недостатність обумовлена не загальною зрілих ентероцитів, як вважалось раніше, а блокадою функціонування SGLT1 (strong inhibition of both Na (+) - d-glucose) залежного симпорту Na+-D-глюкози, що веде до зменшення всмоктування дисахаридів і реабсорбції води з кишечника. Також показано, що саме протеїн NSP4 викликає дефіцит фермента лактази-флоризингідролази, за рахунок пригнічення активності його вивільнення з ентероцитів, при цьому виникає вторинна ЛН [Абатуров А.Е. Подходы до лечения ротавирусной инфекции у детей / А.Е. Абатуров, Ю.Ю. Степанова, О.Л. Кривуша, О.М. Герасименко // Современная педиатрия.-2013. - № 1 (49). - С. 37-41]. Ступінь цієї лактазної недостатності може варіювати від мінімальної до найбільш вираженої, це обумовлено, насамперед, генетично детермінованою активністю лактази, адже є відсоток дітей, в яких діагностується первинна лактазна недостатність.

Діагноз ЛН встановлюють на основі характерної клінічної картини і підтверджують наступними методами: [Нагорная Н.В. Лактазная недостаточность у детей / Н.В. Нагорная, Е.В. Бордюгова, А.В. Дубовая // Здоровье ребенка.-2012. - № 7 - С. 107-114.]

- визначення рН калу (в нормі 5,5), який знижується при ЛН, даний метод малоінформативний і низькоспецифічний, адже зниження рН у фекаліях спостерігається при мальабсорбції не лише лактози, а й інших дисахаридів;

- визначення загального вмісту вуглеводів у випорожненнях. Спосіб оцінює загальну здатність засвоювати вуглеводи і не дозволяє диференціювати різні види дисахаридазної недостатності. Вміст вуглеводів у випорожненнях не повинен перевищувати 0,25 г%, лактози - 0,07 г% (у дітей старше 1 року вони відсутні). Підвищений рівень вуглеводів в калі відображає зниження здатності мікрофлори розкладати і утилізувати лактозу;

- визначення вмісту водню та метену або міченого ^{14}C CO_2 у видихуваному повітрі. Метод відображає активність мікрофлори щодо ферментації лактози. Діагностичним критерієм

вважається підвищений вміст водню у видихуваному повітрі після навантаження лактозою (1 г/кг маси тіла, але не більше 50 г). Обмеження методу: висока вартість дослідження, необхідність призначення лактази, не проводиться дітям віком до 3 років.

5 - глікемічний навантажувальний тест з лактозою. Рівень глікемії, що реєструється до і після навантаження лактозою, відображає сумарний результат розщеплення і всмоктування лактози в тонкій кишці. В нормі протягом 60 хв. після прийому лактози (1 г/кг маси тіла, але не більше 50 г) рівень глюкози в крові повинен збільшитись не менш ніж на 20 % від вихідного рівня. Рівень глюкози визначають натще і через 15, 30 і 60 хв. після навантаження. Перед дослідженням необхідно визначити толерантність до глюкози.

10 - визначення активності лактази в біоптатах слизової оболонки тонкої кишки. Даний метод є золотим стандартом діагностики ЛН, однак інвазивність, складність і висока вартість обмежують його застосування в практичній медицині, тим паче в педіатрії.

15 Всі відомі способи діагностики первинної ЛН мають ряд значних недоліків: низька специфічність, неможливість віддиференціювати окремий вид дисахаридазної недостатності, обмеження для застосування у дитячому віці, складність, інвазивність та висока вартість дослідження.

20 - генетичне дослідження. Для первинної ЛН характерна наявність гену C/T13910, що розташований на хромосомі 2q21. Первинна гіполактазія і, відповідно, здатність утилізувати лактозу повністю корелює з поліморфізмом C>T в позиції 13910 гена лактази (LCT). Ділянка поліморфізму гена розташований вище точки початку транскрипції, тобто в регуляторній області гена лактази. Генотип C/C-13910 відповідає практично повній відсутності лактази. Генотип C/T-13910 асоціюється зі зниженим рівнем лактази, але достатнім для нормальної дигестії. Генотип T/T-13910 свідчить про високу активність даного ферменту [Десягин В.М. Поліморфізм гена лактази у дітей с atopическими заболеваниями / В.М. Десягин, К.Г. Каграманова, Е.Г. Шугурин, И.В. Сичинава, М.В. Соколова, С.А. Боринская, Н.К. Янковский // Педиатрия.-2008. - № 4, том 87. - С. 15-18.].

Отже, серед відомих способів діагностики первинної ЛН найбільшу увагу заслуговує генетичне дослідження.

30 Варто відмітити, що роботи по вивченню поліморфізму C>T в позиції 13910 гена лактази (LCT) у дітей з ротавірусною інфекцією в Україні не проводились.

В основу корисної моделі поставлено задачу виявити генотипи, які відповідають за розвиток первинної ЛН у дітей раннього віку.

35 Поставлена задача вирішується за рахунок способу, що передбачає проведення молекулярно-генетичного дослідження, згідно з корисною моделлю, встановлюють поліморфізм 13910 C>T гена LCT з подальшим аналізом генотипів, що асоціюються з непереносимістю лактози.

Спосіб здійснюється таким чином: у хворого на ротавірусну інфекцію забирають зразок венозної крові (2-4 мл) у спеціальну пробірку з EDTA.

40 Проводиться виділення та очищення ДНК з лейкоцитів периферійної крові методом висолювання [Пат. 32044 UA, МПК G01N 33/49 (2006.01) Спосіб виділення ДНК з лейкоцитів периферійної крові / Макух Г.В., Заставна Д.В., Тиркус М.Я. [та ін.], заявник ДУ "Інститут спадкової патології АМНУ". - № u200801896; заявл. 14.02.2008; опубл. 25.04.2008, Бюл. № 8.]. Ампліфікація послідовностей ДНК in vitro проводиться за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції [Me. Pherson M.J., Quirke P., Taylor G.R. PCR a Practical Approash. Oxford University press / Me. Pherson M.J. [et al.] // New York: Oxford University press, 1993.-253 p.]. ПЛР проводиться в автоматичному режимі на термоциклері "Терцик" (ДНК-технологія, Росія). Для ідентифікації мутацій 13910 C>T гена LCT застосовується метод рестрикційного аналізу продуктів ПЛР відповідних послідовностей [Mulcare CA, Weale ME, Jones AL, Connell B, Zeitlyn D, Tarekegn A, Swallow DM, Bradman N, Thomas MG. The allele of a single-nucleotide polymorphism 13.9 kb upstream of the lactase gene (LCT) (C-13.9 kbT) does not predict or cause the lactase-persistence phenotype in Africans. Am J Hum Genet. 2004;74:1102-1110. doi: 10.1086/421050.]. У роботі використовується ендонуклеаза рестрикції Hinf I виробництва фірми НВО "СибЭнзим" (Росія) Продукти ампліфікації візуалізуються шляхом проведення електрофорезу в 2 % агарозному гелі, який містить бромистий етидій та сканується на ультрафіолетовому транслюмінаторі "ECX-15. M" (VILBER LOURMAT, Франція). Отримані сигнали порівнюються з маркерами довжин, і на основі цього детектуються розміри отриманих фрагментів. Результати сканування агарозних гелів знімаються цифровою камерою "Gel Imager" (HELICON, Росія). Обробка зображень здійснюється на комп'ютері за допомогою програм Adobe Photoshop CS та Gel Explorer 2.0.

Приклад. Хвора С., 6 місяців, перебувала на стаціонарному лікуванні у Вінницькій обласній клінічній дитячій інфекційній лікарні з 15.03.2013 по 24.03.2013 з діагнозом: Гостра кишкова інфекція. Гострий гастроентерит зумовлений ротавірусом, середнього ступеня важкості.

Дитина від першої вагітності, перших термінових пологів шляхом кесарського розтину, маса тіла при народженні 2360 г. На грудному вигодовуванні. З народження у дитини періодично спостерігається рідкий стілець та кишкові кольки, повільно набирає вагу. Батько дитини не переносить коров'ячого молока. Скарги при надходженні: підвищення температури тіла до 38,5, блювання, рідкий пінистий, водянистий стілець жовтого кольору до 15 разів на добу, зниження апетиту, метеоризм, кишкові коліки. Дані мікробіологічного дослідження фекалій: патогенні організми - не виділені. За допомогою імунохроматографічного та імуноферментного аналізу ідентифікований ротавірус (вірусне навантаження складала 3,023). Дані копрологічного дослідження: консистенція - водянистий, колір - жовтий, нейтральний жир велика кількість в п/з, неперетравлена клітковина 2-3 в п/з, крохмаль - велика кількість в п/з, лейкоцити 1-2 в п/з. За даними молекулярно-генетичного дослідження встановлено генотип С/С-13910, який відповідає за непереносимість лактози, отже у дитини діагностовано первинну лактазну недостатність.

Спосіб діагностики первинної лактазної недостатності у дітей раннього віку використано у 100 хворих з ротавірусною інфекцією. Встановлено ряд закономірностей розподілу генотипів по важкості перебігу ротавірусної інфекції у дітей, особливості ротавірусної моно- і мікст-інфекції з умовно-патогенними мікроорганізмами, в залежності від встановленого генотипу.

Таким чином, даний спосіб діагностики первинної лактазної недостатності у дітей раннього віку високоінформативний, дає змогу прогнозувати перебіг даної інфекції в залежності від встановленого генотипу та покращити підходи до лікування у вигляді застосування без- чи низьколактозної дієти. Простий у використанні, неінвазивний, і може бути використаний для ранньої діагностики первинної лактазної недостатності у дітей раннього віку. Методика проста, доступна, ефективна, інформативна, не дороговартісна і може знайти широке використання в практичній дитячій гастроентерології та в клініці дитячих інфекційних хвороб.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб діагностики первинної лактазної недостатності у дітей раннього віку з ротавірусною інфекцією, що передбачає проведення молекулярно-генетичного дослідження, який **відрізняється** тим, що встановлюють поліморфізм 13910 С>Т гена LCT з подальшим аналізом генотипів, що асоціюються з непереносимістю лактози.

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

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

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