



УКРАЇНА

(19) UA (11) 66906 (13) U  
(51) МПК  
G01N 33/48 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

ОПИС  
ДО ПАТЕНТУ  
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ДИСБІОЗУ КИШЕЧНИКА У ДІТЕЙ РАНЬОГО ВІКУ

1

2

(21) u201107738

(22) 20.06.2011

(24) 25.01.2012

(46) 25.01.2012, Бюл.№ 2, 2012 р.

(72) НЕЗГОДА ІРИНА ІВАНІВНА, НАУМЕНКО  
ОЛЬГА МИКОЛАЇВНА, ОБЕРТЮХ ЮРІЙ ВОЛО-  
ДИМИРОВИЧ

(73) ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ  
УНІВЕРСИТЕТ ІМ. М.І. ПИРОГОВА

(57) Спосіб діагностики дисбіозу кишечника у дітей раннього віку, що передбачає проведення мікробіологічного дослідження, який **відрізняється** тим, що додатково вивчають вміст активних метаболітів - летких жирних кислот та за концентраціями окремих кислот та анаеробним індексом діагностують ступінь дисбіотичних порушень кишечника.

Корисна модель належить до медицини, а саме до дитячої гастроентерології та дитячих інфекційних хвороб, і стосується діагностики дисбіозу кишечника у дітей раннього віку.

Серед багатьох найбільш обговорюваних питань в сучасній педіатрії чільне місце посідає проблема дисбіозу кишечника. Це обумовлено значним розповсюдженням дисбіотичних порушень. За даними вітчизняних науковців в Україні близько 90 % дітей різного віку мають ті чи інші порушення складу нормальної мікрофлори [Профілактика та лікування мікроекологічних порушень у дітей раннього віку: Методичні рекомендації / Ю.Г.Антипкін, О.Г.Шадрін, О.М.Муквіч. - Київ, 2010р.-32с.]. Представники нормальної мікрофлори існують в організмі людини у вигляді фіксованих до визначених рецепторів мікроколоній, які оточені тришаровим слизом і формують біоплівку, яка розглядається як метаболічний матрикс кишечника, адже саме в ній відбуваються основні процеси біохімічних реакцій, таких як синтез амінокислот, вітамінів, органічних жирних кислот і інших метаболітів [Ильина Т.С. Биопленки как способ существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина: феномен, генетический контроль и системы регуляции их развития / Т.С.Ильина, Ю.М.Романова, А.Л.Гинцбург // Генетика.-2004. - №11. - С.1-12].

В нормальних умовах під дією індигенної, переважно анаеробної мікрофлори кишечника, в процесі ферментативних процесів утворюється ряд метаболітів з низькою молекулярною масою - летких жирних кислот [Ардатская М.Д. Летучие жирные кислоты и их диагностическое и прогностическое значение в гастроэнтерологической

практике / М.Д.Ардатская, О.Н.Минушкин, Н.И.Прихно // Рос. Журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.-2000. - №5. - С.63-70.]. Леткі жирні кислоти - це монокарбоніві кислоти з ланцюгом до 8 молекул вуглецю. В англійській літературі їх називають "short certain fatty acidis" (SGFA). До них належать оцтова кислота (C2), бактерії-продуценти: більшість анаеробних видів а також E. coli, Staphlococcus, Proteus і інші; пропіонова кислота (C3), продуценти: Veilonella, Propionibacterium, Bacteroides, Fuzobacterium, Clostridium; масляна (C4), продуценти: Fuzobacterium, Eubacterium, Coprococcus, Bacteroides, Megasphaera, Clostridium, Peptococcus; ізомасляна (iC4), бактерії: Bacteroides, Megasphaera, Peptostreptococcus; валер'янова кислота (C5) - Megasphaera, Clostridium, Peptococcus, Peptostreptococcus; ізо-валер'янова (iC5), продуценти - Clostridium, капронова (C6) - Megasphaera, Eubacterium, Peptococcus; та ізокапронова кислота (iC6): Peptostreptococcus, Clostridium, Candida. [Белобородова Н. В. Метаболиты анаэробных бактерий (летучие жирные кислоты) и реактивность макроорганизма / Н.В.Белобородова // Антибиотики и химиотерапия.-2000. №2. - С.28-35.]. Леткі жирні кислоти володіють антибактеріальною активністю і завдяки тому є важливим фактором у підтримці балансу мікробної екосистеми. Вони можуть як перешкоджати колонізації кишечника патогенними мікроорганізмами, так і слугувати промоторами росту деяких анаеробів. Доведено, що всі ефекти нормальних та ізоформ летких жирних кислот концентратозалежні, і їх гіперпродукція, так як і нестача, може викликати негативний вплив на організм

UA (19) 66906 (11) (13) U

[Кондракова О.А., Бабин В.Н., Грубова Е.А. Комплексная оценка микробиологических и функциональных нарушений толстого кишечника для обеспечения этиотропной терапии. [Пособие для врачей] / О.А.Кондракова, В.Н.Бабин, Е.А.Грубова - М., 2003г.-128с]. Відповідно відхилення від фізіологічної норми рівня і спектра цих метаболітів можуть виступати біохімічними маркерами структурних і функціональних порушень мікробіоценозу кишечника.

Відомий спосіб діагностики дисбіозу кишечника полягає у мікробіологічному дослідженні фекалій та дозволяє виявити кількісні і якісні зміни порожнинної популяції мікрофлори кишечника при наявності ряду поживних середовищ [Дисбактеріоз кишечника (клініка, діагностика, лечение): [Руководство для врачей.] / Ю.В.Лобзин, В.Г.Макарова, Е.Р.Корякова, С.М.Захаренко. - СПб: ООО "Издательство ФОЛИАНТ", 2006.-256С.].

Недоліком методу є тривалий термін виконання (7-10 днів), дорога вартість поживних середовищ, неможливість охоплення всієї популяції мікроорганізмів, необхідність швидкого дослідження для попередження інактивації флори, потреба у додаткових технічних установках для визначення анаеробів. Неможливість ранньої, доклінічної діагностики дисбіотичних порушень. Являючись кількісним методом, аналіз на дисбактеріоз не дозволяє визначити метаболічну активність анаеробної мікрофлори і тим самим не дає можливість оцінити взаємопов'язані мікроекологічні і функціональні порушення травного тракту [Дисбактеріоз кишечника как клинко-лабораторный синдром: современное состояние проблемы. / В.М.Бондаренко, Т.В.Мацулевич. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007.-304С.].

В основу корисної моделі "Спосіб діагностики дисбіозу кишечника у дітей раннього віку" поставлено задачу виявити наявність активних метаболітів (летких жирних кислот) у зразках фекалій дітей раннього віку.

Поставлена задача вирішується способом, що передбачає проведення мікробіологічного дослідження і, згідно з корисною моделлю, що додатково вивчають вміст активних метаболітів - летких жирних кислот, за концентраціями окремих кислот та анаеробним індексом діагностують ступінь дисбіотичних порушень кишечника.

Спосіб здійснюється таким чином: у хворого забирають зразок фекалій у одноразову стерильну пробірку. Наважку фекалій, вагою більше 0,1г, поміщають у пробірку з конічним дном, доливають 1 % розчин фосфорної кислоти у співвідношенні 1:4, закривають щільною пробкою і перемішують шляхом струшування протягом 10 хвилин. Після цього зразки поміщають у холодильник (t +4 °C) на 12 годин, перемішуючи зразки шляхом струшування кожні 6 годин. Через 12 годин зразки фільтрують за допомогою фільтрувального паперу до отримання прозорого розчину.

Газохроматографічний аналіз проводять на газово-рідинному хроматографі Хром-5 (Чехія).

Мікрошприцом вводять пробу (відфільтрований прозорий розчин) близько 2мкл у випаровувач

хроматографа з полум'яно-іонізаційним детектором іонізації.

Режим роботи хроматографа ізотермічний, з температурою термостата 200-220 °C, температурою випаровувача і детектора 250 °C. Для аналізу використовують колонку заповнену Porapak Q. Швидкість газу-носія азоту - 30, водню - 50 і повітря 500мл/хв. Чутливість приладу -  $3,2 \times 10^{-3}$ . Час хроматографування близько 8хв.

Вміст індивідуальних кислот у зразку визначається по формулі:

$$C_i = \frac{S_1 \cdot C_{st} \cdot f_i}{S_2} \cdot R,$$

де  $C_i$  - концентрація органічної кислоти в зразку, %;

$S_1$  - площа піка речовини, що визначається,  $mm^2$ ;

$S_2$  - площа піка внутрішнього стандарту,  $mm^2$ ;

$f_i$  - відносний поправочний коефіцієнт;

$C_{st}$  - концентрація внутрішнього стандарту, %;

R - розведення.

Визначається співвідношення концентрації кожної кислоти крім оцтової, до концентрації оцтової (анаеробний індекс). Величина даного показника дозволяє оцінити стан мікробіоценозу та ступінь анаеробіозу у дітей раннього віку. Про нормальний стан мікробіоценозу кишечника у дітей раннього віку свідчить вміст  $C_2 - 5,88 \pm 1,22$ ;  $C_3 - 1,79 \pm 0,55$ ;  $C_4 - 1,72 \pm 0,55$ ;  $isoC_4 - 0,25 \pm 0,11$ ;  $C_5 - 0,34 \pm 0,12$ ;  $isoC_5 - 0,4 \pm 0,15$ . Оцінка результатів дослідження проводиться у відповідності до норм показників вмісту окремих жирних кислот та анаеробного індексу у зразках фекалій. Підвищення або зниження абсолютного вмісту кислот свідчить про підвищення або зниження чисельності і активності мікроорганізмів кишечника у дітей раннього віку.

Приклад.

Хвора С., 7 місяців, перебуває під спостереженням у міській дитячій поліклініці №2. Скарги: зниження апетиту, метеоризм, кишкові коліки, періодично розріджений стілець, зеленого кольору зі слизом. Дані мікробіологічного дослідження фекалій: патогенні організми - не виділені, загальна кількість кишкової палички -  $10^5$  КУО/г; кишкова паличка зі слабо вираженими ферментними властивостями - 0; лактозонегативні ентеробактерії -  $10^8$  КУО/г; гемолізуюча кишкова паличка - 0; кокові форми в загальній сумі мікроорганізмів -  $10^4$  КУО/г; гемолізуючий та золотистий стафілокок - 0; умовно патогенні мікроорганізми - Proteus mirabilis  $10^3$  КУО/г; біфідобактерії -  $10^8$  КУО/г; лактобацили -  $10^5$  КУО/г. Мікробіологічне заключення: I ступінь мікробіологічних порушень. Дані копрологічного дослідження: консистенція - кашкоподібний, колір - жовто-зелений, нейтральний жир 0-1 в п/з, неперетравлена клітковина 2-3 в п/з, крохмал - 0-1 в п/з, слиз - багато, лейкоцити 7-9 в п/з. Заключення - бродильна диспепсія. Газово-рідинна хроматографія:  $C_2 - 6,43 \pm 1,3$ ;  $C_3 - 3,35 \pm 0,01$ ;  $C_4 - 2,73 \pm 0,01$ ;  $isoC_4 - 0,47 \pm 0,05$ ;  $C_5 - 0,65 \pm 0,01$ ;  $isoC_5 - 0,77 \pm 0,001$ . Анаеробний індекс -  $0,600 \pm 0,012$ . Дослідження продемонструвало у хворой зниження анаеробного

індексу та значне підвищення концентрації масляної, валеріанової та пропіонової кислот, що свідчить про підвищення активності анаеробної флори, що володіє протеолітичною та гемолітичною активністю та появою умовно-патогенної флори, що відповідає II-III ступеню мікробіологічних порушень (по Митрохіну, 1998р.).

Спосіб діагностики дисбіозу кишечника у дітей раннього віку використано у 34 хворих з дисбіотичними порушеннями кишечника та у 28 практично здорових дітей раннього віку, які склали контрольну групу. Встановлено ряд закономірностей зміни пулу летких жирних кислот при зміні етіологічного чинника дисбіотичних порушень.

Таким чином, даний спосіб діагностики дисбіозу кишечника у дітей раннього віку високоінформативний, дає змогу вивчити активність анаеробної мікрофлори без додаткового спеціального обладнання, простий у використанні, не вимагає довготривалого дослідження і може бути використаний для ранньої діагностики дисбіотичних порушень та повторних досліджень в динаміці.

Методика проста, доступна, ефективна, інформативна, не дороговартісна і може знайти широке використання в практичній дитячій гастроентерології та в клініці дитячих інфекційних хвороб.