



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **77626** (13) **U**
(51) МПК
G01N 33/50 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2012 08373</p> <p>(22) Дата подання заявки: 07.07.2012</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.02.2013</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.02.2013, Бюл.№ 4</p>	<p>(72) Винахідник(и): Пипа Лариса Володимирівна (UA), Мургіна Марина Миколаївна (UA), Гейващук Ярослав Миколайович (UA)</p> <p>(73) Власник(и): ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. М.І. ПИРОГОВА, вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, 21018 (UA)</p>
---	--

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ ГЕНЕРАЛІЗАЦІЇ ІНФЕКЦІЙНОГО ПРОЦЕСУ У ДІТЕЙ

(57) Реферат:

Спосіб прогнозування генералізації інфекційного процесу у дітей включає визначення одноалельного поліморфізму гена ФНО- α в точці 308 (G→A) методом рестриктивного аналізу продуктів ампліфікації у дітей з інфекційними захворюваннями. Виявлення дикого варіанта гена TNF- α (308 G/A) є предиктором розвитку генералізованого інфекційного процесу.

UA 77626 U

Корисна модель належить до медицини, зокрема до педіатрії, дитячої хірургії і може бути використана для прогнозування генералізації інфекційного процесу у дітей.

На сьогоднішній день діагностика генералізованих форм інфекційного процесу проводиться на основі визначення ряду клінічних та лабораторних ознак - температура тіла, частота серцевих скорочень, частота дихання, кількість лейкоцитів в периферичній крові та кількість їх незрілих форм. Додатково для визначення розвитку органної недостатності ряд клінічних та лабораторних показників - рівень артеріального тиску, необхідність іонотропної підтримки, зменшення парціального тиску кисню та збільшення парціального тиску вуглекислого газу в артеріальній крові, необхідність респіраторної підтримки, подовження симптому "білої плями", олігурія, збільшення рівню лактату в сироватці крові, метаболічний ацидоз, зниження кількості тромбоцитів, підвищення рівня креатиніну, білірубину, АЛТ.

Визначальним в прогнозі генералізованої форми інфекції є своєчасне та в повному обсязі розпочате лікування. На сьогодні не визначені предиктори розвитку генералізованої інфекції, оскільки в рівних умовах в одному організмі розвинеться локальний, а в іншому генералізований інфекційний процес.

В основу корисної моделі "Спосіб прогнозування генералізації інфекційного процесу у дітей" поставлено задачу: визначення одноалельного поліморфізму гена, що кодує продукцію фактора некрозу пухлин альфа (ФНО- α) в точці 308, оскільки ФНО- α є пусковим медіатором розвитку синдрому системної запальної відповіді (ССЗВ), а від сили та вираженості останнього і залежить розвиток генералізованої інфекції. Визначення даної мутації дозволить виявити контингент дітей, які схильні до генералізованих інфекцій, і тим самим забезпечити своєчасну та адекватну терапію інфекційних захворювань у них та дозволить покращити наслідки захворювань та зменшити смертність.

Поставлену задачу вирішують шляхом визначення одноалельного поліморфізму гена ФНО- α в точці 308 (G \rightarrow A) методом рестриктивного аналізу продуктів ампліфікації,

Постійно зростаюча захворюваність, висока смертність та великі витрати на лікування септичних станів у дітей робить актуальним пошук предикторів генералізації інфекційного процесу.

Відповідно до сучасних уявлень першим етапом розвитку генералізованої інфекції є розвиток ССЗВ, який являє собою результат каскаду вивільнення прозапальних цитокінів. Одним із перших цитокінів доімунного запалення є ФНО- α , який наряду з інтерлейкінами 1, 8 та 12 активує макрофаги та нейтрофіли та стимулює їх міграцію в вогнище запалення. Кількість продукції ФНО- α у відповідь на інфекцію є генетично детермінованою та залежить від послідовності нуклеотидів в гені, що відповідає за виробіток останнього. Від кількості продукції ФНО- α залежить подальший розвиток та сила ССЗВ, тому мутація в гені ФНО- α є предиктором розвитку генералізованого інфекційного процесу. Дослідження в данному напрямку майже не проводилися.

Найбільше описаний поліморфізм в промоторній ділянці гена ФНП- α в позиції 308. При типовому варіанті алелі в позиції 308 розміщується гуанін (ФНП- α 308 G), в атипovому (дикому) варіанті - аланін (ФНП- α 308 A).

Визначення мутації гена, що кодує ФНО- α , проводиться методом рестриктивного аналізу продуктів ампліфікації (PCR-RFLP). Для цього необхідна геномна ДНК, яку можна виділити із цільної крові або букального епітелію за допомогою набору реактивів.

Для проведення аналізу бралася цільна кров методом сухої краплі на фільтрувальний папір, висушувалася при кімнатній температурі. Визначення поліморфізму -308 G \rightarrow A в гені TNF α проводилося в Лабораторії ДНК-діагностики в Центрі молекулярної генетики при Медико-генетичному науковому центрі Російської академії медичних наук (м. Москва).

ДНК виділялась із плям крові за допомогою набору реактивів D1Atom™ DNA, принцип дії якого оснований на використанні Лізуючого реагенту з гуанідинтіоціанатом, який призначений для лізису клітин, солюбілізації клітинного дебрису, а також для денатурації клітинних нуклеаз. В присутності Лізуючого реагенту ДНК активно сорбується на NucleoS-сорбенті, після чого легко змивається від білків та солей спиртовим розчином сольового буферу. ДНК елюювана з сорбенту "ЕкстраГеном™" або дистильованою водою та може бути використана для ПРЛ.

Визначення поліморфізму включало в себе декілька етапів. Спочатку ділянки промоторних регіонів ампліфікувалися з використанням наступних пар праймерів: S'-AGG-CAA-TAG-GTT-TTG-AGG-GCC-AT-S', 5'-ACA-CTC-CCC-ATC-CTC-CCG-GCT-3', Реакційна суміш загальним об'ємом 23,2 мкл включала 50-200 нг геномної ДНК; 2,5 мкл dNTP; 3,5 мкл ПЦР-буферу; 0,2 мкл Taq полимерази, 1 мкл суміш праймерів та 16 мкл дистильованої води. Проводилося ПРЛ по програмі Precise regulation. Рестрикційний аналіз робили з використанням ферментів Sty 1. Для цього готувалася суміш, що складалася із 12 мкл ампліфікату після проведення ПРЛ, 1,5 мкл

рестрикційного буферу, 0,3 мкл ферменту (Sty 1) та 1,5 мкл дистильованої води, суміш центрифугувалася 2-3 сек. та залишалася на 12 год. В термостаті при температурі 37 °С. Отримані фрагменти аналізувалися в акриламідному гелі (сток-розчин АА/БА 29:1), поділ фрагментів проводився при напруженні поля 16В/см протягом години. Довжина ампліфікованого фрагмента 148 п.н. Оцінка результатів після проведення рестрикції. В випадку алелі G-128+20 п.н., алель А - 148 п.н.

Нами було проаналізовано та проведено генетичне дослідження у 27 хворих, які знаходилися протягом 2010-2011 років на лікуванні в Хмельницькій міській дитячій лікарні та Хмельницькій міській інфекційній лікарні із генералізованими та локалізованими формами інфекції віком від 8 міс. до 17 років. Розподіл по статі був наступний: 17 хлопчиків та 10 дівчаток. Ген ралізована інфекція реєструвалася на основі прийнятих Міжнародної погоджувальної конференції з питань педіатричного сепсису (IPSSC 2005) критеріями педіатричного сепсису. Дітей з локалізованою інфекцією було 15 та з генералізованою 12.

Дикий варіант генотипу ФНП- α (308A\G) у групі дітей із генералізованою інфекцією зустрічався в 30 % випадків, на противагу групі із локалізованою інфекцією в якій генотип ФНП- α (308A\G) був виявлений в 7 % обстежень.

Таким чином, дикий варіант генотипу ФНП- α (308A\G) є предиктором генералізації інфекційного процесу та носіям даного варіанта гена при виникненні інфекційного процесу необхідно відразу призначати антибактеріальну терапію для попередження генералізації. Дітям із диким варіантом генотипу ФНП- α необхідно проведення щеплення проти менінгокової інфекції оскільки дана мутація є фактором ризику для розвитку менінгококцемії.

Приклад: Хворий Ч., 2 роки, історія хвороби № 1391, госпіталізований в Хмельницьку інфекційну лікарню 13.01.2011 року у важкому стані із скаргами батьків на сонливість дитини, лихоманку до 38,5° С, багаторазову блювоту, висипи на шкірі.

Перші симптоми захворювання з'явилися 11.01 коли відзначався під'йом температури до 39° С, став в'ялим, з'явилися висипка геморагічного характеру. 12.01. Батьки дитини звернулись в центральну районну лікарню, де дитина була госпіталізована і у зв'язку із погіршенням стану дитина була переведена в Хмельницьку інфекційну лікарню з діагнозом менінгокова інфекція?.

При об'єктивному обстеженні дитини виявлено: стан дитини важкий, шкірні покриви бліді, на шкірі обличчя, тулубі, кінцівках геморагічний висип зірчастої форми. Обличчя та кисті рук пастозні. Кінцівки холодні, симптом білої плями 5 сек. Пульс - 120 уд. в хв., ЧД - 24 в хв., Т. тіла 38,8 °С. Тони серця ритмічні помірно приглушені. Дихання жорстке, хрипи не вислуховуються. Живіт при пальпації м'який, печінка та селезінка не збільшені, перистальтика ослаблена.

В неврологічному статусі спостерігалось: в свідомості, поза "введеного курка", виражена ригідність потиличних м'язів, позитивні симптоми Керніга і Брудзінського. Зіниці були звужені, фотореакція збережена, сухожилкові та періостальні рефлекси підвищені.

Проведено люмбальну пункцію. Отримано мутну рідину під підвищеним тиском, цитоз - 2990 кл., нейтрофіли - 96 %, лімфоцити - 4 %, білок - 0,49 г/л, цукор - 2,0 ммоль/л, СІ - 123 ммоль/л, реакція Панді 1+.

Клінічний аналіз крові: Нв - 128 г/л, Ер- $3,5 \times 10^{12}$ /л, КП - 1,1, Лейк.- $9,7 \times 10^9$ %, С - 63 %, П - 31 %, М-1 %, Л-5 %, Тр-220 тис., ШОЕ- 59 мм/год.

Клінічний аналіз сечі: питома вага - 1012, с/ж, білок - сліди, цукор 0,8 %, лейк.-2-4 в п/з, ер.-2-5 в п/з, ацетон (+++).

Біохімічний аналіз крові: загальний білок - 74,0 г/л, цукор 4,18 ммоль/л, калій - 2,21 ммоль/л, креатинін - 70 мкмоль/л ммоль/л, сечовина -4,7 ммоль/л; білірубін загальний - 17,8 ммоль/л, непрямий - 17,8 ммоль/л, АсАТ- 22 Од/л, АлАТ-63 Од/л.

Клінічний діагноз: Менінгокова інфекція: менінгококцемія, менінгококовий менінгіт. Ацетонемічний синдром.

Дитині додатково проведено визначення поліморфізму -308 G>A в гені TNF α . Було виявлено генотип 308 (G/A), являє собою генетичний маркер розвитку генералізованої важкої інфекції.

Отже, запропонований метод прогнозування генералізації інфекційного процесу дозволяє виділити дітей групи ризику по розвитку септичних захворювань та своєчасно, в повному обсязі розпочати необхідну терапію в разі початку інфекції в останніх.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб прогнозування генералізації інфекційного процесу у дітей, який полягає в тому, що визначають одноалельний поліморфізм гена ФНО- α в точці 308 (G→A) методом рестриктивного аналізу продуктів ампліфікації у дітей з інфекційними захворюваннями, а виявлення дикого варіанта гена TNF- α (308 G/A) є предиктором розвитку генералізованого інфекційного процесу.

Комп'ютерна верстка І. Мироненко

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