



УКРАЇНА

(19) UA (11) 42286 (13) U
(51) МПК (2009)
G01N 33/48
G01N 33/53

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ДИФЕРЕНЦІАЛЬНОЇ ДІАГНОСТИКИ ЦИСТИТУ ТА ПІЄЛОНЕФРИТУ У ХВОРИХ З ІНФЕКЦІЄЮ СЕЧОВОЇ СИСТЕМИ

1

(21) u200901368

(22) 18.02.2009

(24) 25.06.2009

(46) 25.06.2009, Бюл.№ 12, 2009 р.

(72) ДРАННІК ГЕОРГІЙ МИКОЛАЙОВИЧ, КОЛЕСНИК МИКОЛА ОЛЕКСІЙОВИЧ, ДРАННІК ГАННА ГЕОРГІЇВНА, СИДОРЕНКО ЄВГЕНІЯ ВАЛЕНТИНІВНА, ДРІЯНСЬКА ВІКТОРІЯ ЄВГЕНІВНА, СТЕПАНОВА НАТАЛІЯ МИХАЙЛІВНА, КАЛІНІНА НАТАЛІЯ АЛЬБЕРТІВНА, ГАЙСЕНЮК ФЕДІР ЗІНОВІЙОВИЧ

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ НЕФРОЛОГІЇ АМН УКРАЇНИ", ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ УРОЛОГІЇ АМН УКРАЇНИ"

2

(57) Спосіб диференціальної діагностики циститу та пієлонефриту у хворих з інфекцією сечової системи, який включає визначення рівня секреторного лейкоцитарного інгібітору протеїназ (SLPI) крові, який **відрізняється** тим, що визначають рівні секреторного лейкоцитарного інгібітору протеїназ (SLPI) у хворих з інфекцією сечової системи і в сечі та, у разі хронічної інфекції при його значенні в сечі більше 3200пг/мл, діагностують наявність циститу, а збільшені показники SLPI не тільки в сечі, а й у сироватці крові вище 4000пг/мл вказують на гострий чи загострення хронічного пієлонефриту.

Спосіб відноситься до медицини, а саме до нефрології та клінічної імунології і може буде використаний для диференціальної діагностики хронічного циститу та гострого і хронічного пієлонефриту у хворих з інфекцією сечової системи.

Інфекції сечової системи належать до найпоширеніших захворювань людини як в амбулаторній, так і в госпітальній практиці. Під цим терміном мають на увазі наявність клінічних проявів запалення сечової системи, внаслідок бактеріальної колонізації, без визначення топіки ураження.

Гострий неускладнений цистит представляє серйозну клінічну та соціальну проблему, при якій після досягнення ремісії у 25-50% хворих спостерігають його рецидиви, а при тривалих епізодах циститу підвищується ризик інфікованості нирок, тобто розвиток пієлонефриту.

Пієлонефрит - неспецифічне інфекційно-запальне захворювання нирок, при якому в патологічний процес включені ниркова лоханка, чашечки та паренхіма нирки, в першу чергу інтерстицій та каналцевого апарат, а також клубочки та ниркові судини.

Останнім часом збільшилась у 2,5 рази кількість латентного перебігу хвороби та стало надзвичайно складно як виявити хронічну інфекцію, так і діагностувати. При наявності великої кількості

сучасних антибактеріальних препаратів, лікування хворих на хронічний цистит та хронічний пієлонефрит залишається дуже складним, і від правильного топічного діагнозу залежать особливості лікувальної тактики і, відповідно, ефективність терапії.

Відомо, що на інвазію мікроорганізмів організм реагує запальною реакцією, важливою частиною якої є поліморфноядерні гранулоцити, що продукують протеїнази, які знищують патогени. У відповідь на ці ензими виробляються антипротеази, які захищають від небажаного впливу тканини хазяїна і є системними або сигнальними. Системні продукуються гепатоцитами та попадають в інтерстицій шляхом дифузії з циркуляції, включають α_1 -PI (α_1 -інгібітор протеаз) та α_1 -антихімотрипсин. Сигнальні включають секреторні інгібітори лейкоцитарних протеїназ - secretory leucocyte protease inhibitor (SLPI) і елафін, що секретують клітини у вогнищі запалення у відповідь на прозапальні цитокіни (1).

Відомо також, що секреторні інгібітори лейкоцитарних протеїназ (SLPI) є ендогенними антимікробними пептидами, важливими складовими захисної системи, які викликають лізис мікроорганізмів і ефективні проти широкого спектру бактерій, грибів і вірусів. Вони експресуються на слизових різноманітними епітеліальними клітинами, включаючи респіраторні, кишкові, амніотичні, та продукуються,

(19) UA (11) 42286 (13) U

головним чином, нейтрофілами, макрофагами, кератиноцитами (2).

Відома також робота по визначенню секреторних інгібіторів лейкоцитарних протеїназ у пацієнтів, госпіталізованих з інфекцією як дихальної, так і сечової системи (3), що взята за прототип, в якій визначений рівень SLPI крові залежно від наявності бактеріємії, а також порівняльний аналіз його концентрації у хворих з запальними процесами дихальної та сечової системи, показано також, що хворі на інфекцію легень та бронхів з бактеріємією мали значно вищу концентрацію SLPI в порівнянні з пацієнтами без бактеріємії.

Недоліком цих досліджень є те, що вони проведени з метою визначити, чи можуть SLPI грати роль органоспецифічних прозапальних маркерів (легені-нирки), а також маркерами бактеріємії при дослідженні периферичної крові.

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалити спосіб диференціальної діагностики циститу та пієлонефриту у хворих з інфекцією сечової системи шляхом визначення в сироватці крові та сечі рівнів секреторних лейкоцитарних інгібіторів протеїназ (SLPI), що дозволить швидко отримати попередній результат про місцевий імунітет, виявити ураження сечовивідних шляхів або нирок, тобто провести диференціальну діагностику циститу та пієлонефриту, а також виявити загострення пієлонефриту у хворих з інфекцією сечової системи.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб диференціальної діагностики циститу та пієлонефриту у хворих з інфекцією сечової системи, який полягає у визначенні рівня секреторного лейкоцитарного інгібітору протеїназ (SLPI) крові, згідно з корисною моделлю, визначають рівні секреторного лейкоцитарного інгібітору протеїназ (SLPI) у хворих з інфекцією сечової системи і в сечі та у разі хронічної інфекції при його значенні в сечі більше 3200пг/мл діагностують наявність циститу, а збільшені показники SLPI не тільки в сечі, а й у сироватці крові вище 4000пг/мл вказують на гострий чи загострення хронічного пієлонефриту.

Спосіб диференціальної діагностики хворих на інфекції сечової системи виконують таким чином: для виконання аналізу методом імуноферментного аналізу до 96-лункових планшет додають по 100мкл стандартів в відповідні лунки для побудови калібровочної кривої. В інші лунки вносять по 100мкл сироватки крові (розведення 1:10) або сечі, що досліджуються. В усі лунки додають по 50мкл відповідних анти-SLPI антитіл. Планшети інкубують при кімнатній температурі протягом 2 годин, потім лунки 5 разів ретельно промивають буфером і видалюють залишки рідини. Далі в кожен лунку вносять по 100мкл кон'югату (стрептовідіпероксидазу), включаючи "нульову" пробу. Після цього проби інкубують при кімнатній температурі протягом 30 хвилин. Повторюють промивку планшету 5 разів та вносять до всіх лунок по 100мкл ТМВ-субстрату (хромогену) агента, що утворює кольори. Після інкубації протягом 12-15 хвилин зупиняють ферментативно-субстратну реакцію, додаючи в кожен лунку по 100мкл H₂SO₄. Далі проводять визначення оптичної щільності стандар-

тів та зразків крові та сечі при довжині хвилі 450 нанометрів.

Для вірогідної оцінки результатів, калібрована стандартна крива при побудові повинна бути лінійною і вказувати на прямо пропорційний характер між рівнем SLPI та оптичною щільністю, дані аналізу проб щодо рівня показників визначають шляхом їх інтерполяції з отриманою кривою.

На підставі показників оптичної щільності стандартів з відомими концентраціями речовини автоматично проводився перерахунок показників у одиниці концентрації. Результати виражають в одиницях маси (пг) на одиницю об'єму (мл).

Апробацію запропонованого способу проведено у відділенні нефрології та діалізу і лабораторії імунології ДУ "Інститут нефрології АМН України" та імунології ДУ "Інститут урології АМН України" при дослідженні матеріалу у 40 хворих з інфекцією сечової системи. Контрольну групу складають 10 здорових донорів. Постановку діагнозу здійснюють на підставі оцінки скарг, даних анамнезу, клініко-лабораторного та інструментального досліджень нирок. Окрім того, визначають рівень добової протеїнурії, лейкоцитурію та бактеріурію. Критеріями включення до дослідження були наявність бактеріурії більш 10⁵ КУО/мл та часте рецидивування (більше 3 разів на рік).

Усім хворим проводять загальноклінічне (розпитування, фізичне обстеження), клінічне лабораторне (аналізи крові, сечі, проба за Нечипоренком), біохімічне (рівні загального білка і його фракцій, креатиніну, сечовини, неорганічних електролітів, білірубину, АлаТ, АсаТ у крові) та ультразвукове дослідження органів черевної порожнини. Верифікацію діагнозу здійснюють на підставі оцінки скарг пацієнтів, даних анамнезу, клініко-лабораторного та інструментального досліджень нирок. Функціональний стан нирок вивчають за рівнем креатинінемії та сечовини сироватки крові. Критерієм виключення пацієнток із дослідження було наявність ознак обструкції сечових шляхів та порушення функції нирок.

Хворих на інфекції сечової системи поділено на 3 групи: 1 група - 20 хворих з діагнозом хронічний пієлонефрит, 2 - 10 хворих з діагнозом хронічний цистит, 3 - 10 пацієнтів з клініко-лабораторними ознаками гострого пієлонефриту (або загострення хронічного пієлонефриту). Середній вік хворих становив 32,3±4,3 років. Тривалість захворювання коливалась від 2 до 10 років і в середньому складала 6,5±1,5 роки. Дослідження проводять у хворих до призначення антибактеріальної терапії.

Отримані дані демонструють достовірне підвищення рівня SLPI в групі хворих на запальні захворювання сечової системи в порівнянні з нормою - 2463±152 та 1181±76пг/мл в сироватці і 3535±183 та 269±18пг/мл - в сечі (P<0,001). Індивідуальний аналіз даних показав, що рівень SLPI в сироватці був у межах від 1360 до 6185пг/мл, в сечі від 1522 до 5265пг/мл.

Аналіз стану SLPI в крові та сечі у хворих з інфекціями сечової системи в залежності від клінічного діагнозу, дані наведені в таблиці, показав, що в сироватці у хворих 1 групи з хронічним пієлоне-

фритом рівень SLPI складає 2240 ± 178 та був вірогідно вище за норму ($P < 0,05$); у хворих 2 групи з хронічним циститом він складає 2052 ± 316 пг/мл і також був підвищений в порівнянні з нормою, але не було достовірної різниці в порівнянні з попере-

дньою групою 1 ($P > 0,05$). Найбільш високий рівень SLPI в сироватці був відмічений у хворих 3 групи при гострому (або загостренні хронічного) пієлонефриті, який складав 3223 ± 410 пг/мл, що вірогідно відрізнялось від хворих 1 та 2 груп ($P < 0,05$).

Таблиця

Рівень лейкоцитарного інгібітору протейназ (SLPI) в крові та сечі у хворих з інфекціями сечової системи

№№ груп	Хворі з інфекціями сечової системи	Рівень SLPI	
		в крові (пг/мл)	в сечі (пг/мл)
1	Хронічний пієлонефрит	2240 ± 178	1857 ± 203
2	Хронічний цистит	2052 ± 316	4171 ± 225
3	Гострий пієлонефрит	3223 ± 410	4370 ± 300
К	Норма	1181 ± 76	269 ± 18
Статистичний показник P		1,2,3/К < 0,05 4-2,3 < 0,05	1,2,3/К < 0,05 3,4-2 < 0,05

Дослідження сечі демонструють те, що показники SLPI в 2 і 3 групі були вищими, ніж в 1 групі, а між собою не відрізнялись - відповідно, 4171 ± 225 та 4370 ± 300 ($P > 0,05$) в порівнянні з 1857 ± 203 пг/мл ($P < 0,05$), тобто у хворих на хронічний цистит (або при гострому процесі) рівень показника в сечі вище, ніж при хронічному пієлонефриті. Індивідуальний аналіз показав, що у 80% хворих на хронічний цистит показник SLPI перевищував 3500 пг/мл, а у 100% - перевищував рівень 3000 пг/мл, тоді як при хронічному пієлонефриті лише у 10% хворих він перевищував 3000 пг/мл (3185 і 3160 пг/мл) ($P < 0,05$).

Наводимо приклади застосування запропонованого способу.

Приклад 1

Хвора М-ца, 46 років, і.х. №155, тематична карта №75. Звернулася зі скаргами на тривалу субфебрильну температуру тіла, відчуття болю, печії та дискомфорту під час сечовипускання, слабкість та часте рецидивування перелічених симптомів. Діагноз: хронічний неускладнений пієлонефрит. Хворіє впродовж 3 років з рецидивуванням 2-3 рази на рік, проходила курси антибактеріального лікування, після яких ознаки захворювання зникали. Визначений рівень SLPI в сироватці крові за запропонованим способом, який становив 1625 , а в сечі - 3185 пг/мл, тобто в сечі в 2 рази вище, ніж в крові, що вказує на запальний процес в сечовому міхурі, тому що, за попередніми даними, рівень SLPI в сечі більше 3200 пг/мл може свідчити про наявність хронічного циститу. Додаткове обстеження показало, що у хворі немає ураження нирок і дозволило відкинути діагноз "пієлонефрит" і поставити діагноз "хронічний цистит". Після відповідного лікування продемонстрований клінічний ефект: достовірне зниження лейкоцитів периферичної крові, нормалізація аналізу сечі, зниження спонтанної продукції трансформуючого фактору росту- β , γ -інтерферону та прозапальних цитокінів ІЛ-8, -10.

Приклад 2

Хвора Кр-ка О.О. 26 років, і.х. №7171, тем. карта хворої №51. Поступила в клініку 1.11.2004 року зі скаргами на відчуття болю, печії та дискомфорту під час сечовипускання, ніктурію, слабкість. Хворіє впродовж 7 років з частим рецидивуванням (більш

3 раз на рік). Неодноразово проходила курси антибактеріального лікування, які не приносили бажаного ефекту. При клініко-лабораторному обстеженні в сечі хворої була визначена E.coli, в зішкрябах з уретри та цервікального каналу діагностована U.urealyticum. Визначений рівень SLPI в сироватці крові за запропонованим способом, який становив 3107 , а в сечі - 1809 пг/мл, тобто в сироватці крові в 1,7 рази вище, ніж в сечі, на відміну від першого приклада у хворі на цистит, коли рівень в крові був в 2 рази нижчий, ніж в сечі. Додаткове обстеження підтвердило ураження нирок запальним процесом, що дозволило поставити діагноз "хронічний пієлонефрит, сечостатевий уреоплазмоз". Хворій було призначено антибактеріальне лікування з врахуванням чутливості виявлених збудників та додатково, з метою імунотерапії, хвора отримувала препарат Галавіт - в/м 2мл через добу №10. Через тиждень лікування скарг на дизурію, ніктурію та часте сечовипускання хвора не відмічала. Під час контрольного обстеження після закінчення лікування та через рік після лікування (при плановому обстеженні) встановлено повну ерадикацію збудників. Впродовж року рецидивів пієлонефриту або реінфекції у хворі не констатовано.

Приклад 3

Хвора Р-ко О.Т., 26 років, тем. карта №43, амб. карта №16 Поступила в клініку 18.10.05. Скарги на підвищення температури тіла до $37,8$, дизурію, слабкість, болі в попереку. При обстеженні виявлено E.coli 10^3 у сечі та U.urealyticum у сечі, зішкрябах з уретри та цервікального каналу. Хворіє з 15-річного віку, коли вперше був встановлений діагноз гострий цистит. У подальшому рецидиви захворювання спостерігалися 1-2 рази на рік. Визначений рівень SLPI в сироватці крові за запропонованим способом, який становив 6252 пг/мл, що перевищувало рівні у вищенаведених прикладах в 2 та більше разів, а в сечі - вище норми майже в 8 разів (2019 пг/мл), що перевищувало показники при хронічному пієлонефриті і наводило на думку про гострий пієлонефрит. Додаткове обстеження дозволило поставити діагноз "гострий пієлонефрит". Проведено лікування за схемами

терапії гострого процесу дозволило добитися успішної ліквідації запалення.

Наведені приклади свідчать про те, що при хронічних інфекціях сечового міхура, коли відсутні клінічні ознаки активного запального процесу, рівень SLPI в сечі більше 3200пг/мл може свідчити про наявність хронічного циститу. Діагностична значимість підтверджена у 100% хворих з циститом, тоді як у разі хронічного пієлонефриту без циститу рівень показника в сечі близький до цієї цифри був у 10%, у інших 90% - не перевищував 2000пг/мл. Жодний пацієнт з відсутністю гострого або загострення процесу не мав рівня SLPI в крові, який перевищує 4000пг/мл, тоді як 60% хворих характеризувалися такими високими показниками у разі його наявності ($p < 0,05$). Тому якщо у хворого з високим показником SLPI в сечі рівні в крові становлять більше 4000пг/мл - це можна вважати ознаками гострого чи загострення хронічного пієлонефриту.

Таким чином, рівень секреторного лейкоцитарного інгібітору протеїназ (SLPI), збільшений при

інфекціях сечової системи, можна вважати маркером запалення при дослідженнях сироватки і сечі. Топічну діагностику при хронічних інфекціях сечової системи підтверджує рівень SLPI в сечі вище 3200пг/мл при циститах, а на гострий чи загострення хронічного запального процесу додатково вказують збільшені показники не тільки в сечі, а й у сироватці крові вище 4000пг/мл.

Джерела інформації:

1. Mihaila A. and Tremblay G.M. Human alveolar macrophages express elafin and secretory leukocyte protease inhibitor // *Z. Naturforsch.* - 2005. - 56. - P.291-297.

2. Levy O. Antimicrobial proteins and peptides: anti-infective molecules of mammalian leukocytes // *J. Leukocyte Biol.* - 2004. - 76. - P.909-925.

3. Duits L.A., Tjabringa G.S., Aarts N.J., van Woult W., Hiemstra P.S., Nibbering P.H. and van Dissel J.T. Plasma secretory leukocyte protease inhibitor in febrile patients // *Clin Microbiol. Infect.* - 2003. - 9. P.605-613 (прототип).