



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2010126238/15, 25.06.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
25.06.2010

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 25.06.2010

(45) Опубликовано: 20.01.2012 Бюл. № 2

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU 2982980 C1, 27.06.1997. SU 1046649 A,
07.10.1983. RU 2290075 C1, 27.12.2006. RU
2294133 C1, 27.02.2007. RU 2169923 C1,
27.06.2001. RU 2408015 C1, 27.12.2010. RU
2177154C1, 20.12.2001.

Адрес для переписки:

672090, г.Чита, ул. Горького, 39а, ГОУ ВПО
Читинская государственная медицинская
академия, патентный отдел

(72) Автор(ы):

Горбунов Владимир Владимирович (RU),
Говорин Анатолий Васильевич (RU),
Лукьянов Сергей Анатольевич (RU),
Романова Елена Николаевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Государственное образовательное
учреждение высшего профессионального
образования Читинская государственная
медицинская академия Росздрава (RU)**(54) СПОСОБ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНОЙ ПНЕВМОНИИ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к пульмонологии, и может быть использовано для ранней диагностики и прогнозирования течения вирусной пневмонии при гриппе. Способ ранней диагностики вирусной пневмонии заключается в подсчете количества десквамированных эндотелиальных клеток крови (ДЭК) и лейкоцитов крови (Лей.) с последующим расчетом интегрального

коэффициента по формуле: $K = \text{ДЭК} / (\ln \text{Лей.})$. При значении коэффициента $>4,0$ диагностируют вирусную пневмонию. Способ позволяет повысить точность диагностики ранней вирусной пневмонии. Способ высокоинформативен, так как не занимает много времени и может быть использован без больших затрат в обследовании большого количества пациентов. 5 табл.

RU 2 440 577 C1

RU 2 440 577 C1

Изобретение относится к медицине, а именно к пульмонологии, и может быть использовано для ранней диагностики и прогнозирования течения вирусной пневмонии при гриппе.

5 Грипп - это острая антропозная вирусная инфекция дыхательных путей, возникающая во всех регионах планеты. Проявляется в виде сезонных эпидемических вспышек и эпидемий. Несколько раз в столетие возникают пандемии, поражающие десятки миллионов человек. Основным осложнением гриппа является вирусная пневмония (ВП), развитие которой обуславливает тяжесть состояния пациентов и в некоторых случаях смертельный исход. В США средние показатели летальности в период сезонных подъемов гриппа в 1990-99 гг. составляли более 3000 случаев в год

10 [1]. В 2009-2010 годах во время пандемии гриппа А (H1N1) отмечалось большое количество осложненных форм инфекции, проявлявшихся развитием ВП, было зафиксировано более чем 18 000 летальных исходов только при лабораторно подтвержденных случаях высокопатогенного гриппа [2]. Согласно современным клиническим протоколам лечения ВП противовирусные препараты должны быть назначены в течение 48 часов с момента начала заболевания, однако лабораторное подтверждение возбудителя может длиться до 5-7 суток и более.

20 Поэтому ранняя диагностика вирусной пневмонии исключительно важна для своевременного назначения этиотропной (противовирусной) терапии, что в большей степени обеспечивает выздоровление [3].

Известен способ определения тяжести течения внебольничной пневмонии - патент №2302637 RU G01N 33/68. Сущность изобретения заключается в определении 25 показателей реактивной способности иммунокомпетентных клеток с определением системного уровня цитокинов (IL-2, IL-8, TNF- α). Тяжелая пневмония диагностируется при уровне - IL-2 от 15,78 до 17,98 пг/мл, IL-8 от 146,4 до 170,2 пг/мл, TNF от 11,73 до 12,73 пг/мл. Данный метод диагностики внебольничной пневмонии и определения 30 тяжести течения заболевания является актуальным, достоверным, информативным диагностическим методом. Однако данный способ недостаточно точен, т.к. не учитывает всех механизмов развития вирусной пневмонии. Кроме того, определение уровня цитокинов является длительным и трудоемким процессом (выполняется методом иммуноферментного анализа - ИФА).

35 Известен способ определения тяжести и прогноза развития осложнений пневмонии - патент №2290075 RU A61B 10/00. Осуществляют опрос пациента, оценивают 5 параметров анамнеза по 5-балльной шкале с последующим расчетом прогностической вероятности развития осложнений внебольничной пневмонии. Данная методика 40 недостаточно информативна, т.к. не учитывает всех факторов риска тяжелой ВП: избыточная масса тела и ожирение, сахарный диабет 2 типа и беременность (особенно III триместр), в большинстве случаев тяжелая ВП развивалась у молодых людей, ранее абсолютно здоровых [4].

45 В качестве прототипа взят способ диагностики острой пневмонии №2082980 RU G01N 33/53, заключающийся в подсчете гранулоцитов и лимфоцитов методом фазово-контрастной микроскопии в камере Горяева. Данные показатели крови оценивают по цитолойкограмме и при выявлении четырех связанных гранулоцитов и при 50 уменьшении двойных розеток в 1,3-1,8 раза относительно нормы диагностируют острую пневмонию. Разработанный способ диагностики позволяет получить достоверные данные в течение 4-х часов, не требует особой стерильности, дефицитных реакторов, дорогостоящих приборов и прост в использовании. Однако способ недостаточно точен, т.к. не учитывает всех механизмов развития вирусной пневмонии,

а также не позволяет прогнозировать тяжелое течение заболевания.

Для повышения точности способа ранней диагностики вирусной пневмонии производят подсчет количества десквамированных эндотелиальных клеток в крови - (ДЭК) и лейкоцитов, вычисляют логарифмированный показатель количества лейкоцитов в крови - (\ln Лей.), и рассчитывают интегральный коэффициент: $K = \text{ДЭК} / (\ln \text{ Лей.})$. При значении этого коэффициента $>4,0$, наличии клинических симптомов гриппа и физикально и/или рентгенологически подтвержденной инфильтрации легочной ткани диагностируют вирусную пневмонию.

Способ осуществляется следующим образом: у пациента с симптомами гриппа и физикально и/или рентгенологически подтвержденной инфильтрацией легочной ткани берут венозную кровь в пробирку с цитратом. Количество десквамированных эндотелиоцитов подсчитывается по классической методике Hladovec (1978). Метод основан на изоляции клеток вместе с тромбоцитами с последующим осаждением тромбоцитов при помощи аденозин-дифосфата (АДФ). По данным автора методики в норме количество ДЭК не превышает 2-4 в 1 микролитре. Подсчитывают общее количество лейкоцитов периферической крови методом световой микроскопии при помощи окраски метиленовой синью. Лейкопения $<4,0 \times 10^9$ является достаточно специфичным признаком ВП [5].

Количество лейкоцитов подвергают логарифмической трансформации, а затем рассчитывают коэффициент по формуле: $K = \text{ДЭК} / (\ln \text{ Лей.})$.

Данный коэффициент является комплексным и позволяет, с одной стороны, оценить степень эндотелиальной дисфункции, а с другой, степень иммуносупрессии у больных ВП. Этот коэффициент отражает различные механизмы вирусной инфекции и обладает наибольшей предсказующей ценностью, чем показатели количества ДЭК и лейкоцитов периферической крови в отдельности.

Характерными особенностями вирусной пневмонии при гриппе в отличие от банальной внебольничной пневмонии являются эндотелиоз (повреждение клеток эндотелия сосудов с их десквамацией) и лейкопения вследствие иммуносупрессии. Эндотелий - внутренняя выстилка сосудов - состоит приблизительно из $1-6 \times 10^{13}$ клеток. Эндотелий интимы сосудов выполняет барьерную, секреторную, гемостатическую, вазотоническую функции, играет важную роль в процессах воспаления и ремоделирования сосудистой стенки. Эндотелий представляет собой функциональный барьер между сосудистой стенкой и циркулирующей кровью, состоящий из одного слоя клеток. Он продуцирует ряд факторов, регулирующих тонус сосудов, адгезию клеток, тромборезистентность, пролиферацию гладкомышечных клеток, воспаление стенки сосуда. Таким образом, эндотелий имеет большое значение в поддержании гомеостаза [6]. Под воздействием различных факторов, в том числе и вирусных агентов, происходит активация эндотелия с выделением биологически активных веществ, запускающих воспалительные процессы, затем набухание и слущивание эндотелия.

По данным недавних морфологических исследований вирус гриппа оказывает цитотоксическое действие на эпителий трахеи, бронхов, альвеол, а также эндотелий сосудов большого и малого кругов кровообращения. Об этом свидетельствует повышенная проницаемость эндотелиальных и эпителиальных клеток, регулирующих водно-электролитный обмен дистального отдела дыхательных путей, что сопровождается пропотеванием плазмы и форменных элементов крови через стенку капилляров межальвеолярных перегородок. Клиническим проявлением этих нарушений является развитие некардиогенного отека легких - респираторного

дистресс-синдрома взрослых (РДСВ) [7]. Дисфункция эндотелия, вызванная инвазией вируса гриппа, является ключевым звеном патогенеза ВП. Одним из признаков, объективно отражающих степень эндотелиальной дисфункции, является количество десквамированных эндотелиоцитов в крови.

Полученные параметры трактуют следующим образом:

А) при значении коэффициента ДЭК/(ln Лей.) $>4,0$; наличии симптомов гриппа и физикально и/или рентгенологически подтвержденной инфильтрации легочной ткани диагностируют вирусную (вирусно-бактериальную) пневмонию;

Б) при нарастании показателя ДЭК/(ln Лей.) в динамике, значениях его $>10,0$ диагностируют тяжелые формы ВП.

Показатель	Больные с различными этиологическими факторами развития пневмонии			
	ВП легкой и средней степени тяжести (n=76)	Тяжелая ВП (n=45)	Внебольничная пневмония легкой и средней степени тяжести (n=15)	Тяжелая внебольничная пневмония (n=15)
Уровень ДЭК крови	8,33±2,25*	17,2±5,66*#	3,2±0,6	5,1±1,4
Уровень лейкоцитов крови	6,2±2,8	4,2±2,4*#	9,6±4,2	14,7±5,5
К=ДЭК/(ln Лей.)	4,65±1,34*	11,09±6,08*#	1,45±0,62	2,01±0,75

* - достоверное отличие от внебольничной пневмонии (p<0,05)
- достоверное отличие от легкой и среднетяжелой ВП (p<0,05)

Данный способ диагностики и оценки тяжести ВП разработан на основании исследования, проведенного у 121 пациента с установленным диагнозом вирусной пневмонии на базе 1-й Городской клинической больницы г. Читы, Дорожной клинической больницы ст. Чита-II и Краевой клинической больницы №1 г. Читы.

У всех больных имелись симптомы гриппа, а также физикально и/или рентгенологически подтвержденная инфильтрация легочной ткани. Во всех случаях методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) была выявлена РНК вируса гриппа А(Н1N1), что подтверждало диагноз ВП. Всем больным помимо общеклинического обследования был проведен подсчет количества ДЭК крови и лейкоцитов.

Замечено, что при увеличении К нарастала тяжесть состояния больных; среди больных, имевших коэффициент $K > 10,0$ при поступлении в стационар, в 95,6% случаев диагностирована тяжелая вирусная пневмония.

Группу контроля составили 30 пациентов с внебольничными пневмониями, госпитализированные после окончания эпидемии (январь-февраль 2010 года). Выраженного эндотелиоза или лейкопении в контрольной группе не наблюдалось, значение коэффициента $K = \text{ДЭК} / (\ln \text{Лей.})$ составило $1,45 \pm 0,62$ среди пневмоний легкой и средней степени тяжести, $2,01 \pm 0,75$ среди тяжелых внебольничных пневмоний.

Для оценки прогностических возможностей всех статистически значимых изучаемых параметров рассчитывался тест по предсказующей ценности положительного результата (ПЦПР) и предсказующей ценности отрицательного результата (ПЦОР).

ПЦПР - доля больных с вирусной пневмонией среди имеющих коэффициент ДЭК/(ln Лей.) $>4,0$.

ПЦОР - доля больных банальной внебольничной пневмонией среди имеющих коэффициент ДЭК/(ln Лей.) $<4,0$.

У пациентов с различными типами пневмоний предсказующая ценность

положительного результата составила 96,7%, а предсказующая ценность отрицательного результата - 87,5% (таблица 2).

Кроме того, вычислялись следующие показатели (таблица 3):

- Чувствительность - доля больных, имеющих коэффициент ДЭК/ (ln Лей.) >4,0 среди тех, у кого выявлена ВП=93,3%.

- Специфичность - доля больных, имеющих коэффициент ДЭК/ (ln Лей.) <4,0 среди тех, у кого нет ВП=86,6%.

Прогностические возможности уровня ДЭК и лейкоцитов крови при различных типах пневмоний			
	ДЭК > 4,0 × 10 ⁴ /л	Лей. < 4,0 × 10 ⁹ /л	ДЭК/ (ln Лей.)
ПЦПР (%)	86,9	65,5	96,7
ПЦОР (%)	76,4	44	87,5

Сравнительные характеристики уровня ДЭК и лейкоцитов крови при различных типах пневмоний			
	ДЭК > 4,0 × 10 ⁴ /л	Лей. < 4,0 × 10 ⁹ /л	ДЭК/ (ln Лей.)
Чувствительность (%)	92,5	24,7	93,3
Специфичность (%)	87	83,3	86,6

Дополнительно с целью оценки тяжести ВП также рассчитывались вышеописанные параметры: ПЦПР и ПЦОР.

ПЦПР - доля больных с тяжелой вирусной пневмонией среди имеющих коэффициент ДЭК/ (ln Лей.) >10,0.

ПЦОР - доля больных с вирусной пневмонией легкой и средней тяжести среди имеющих коэффициент ДЭК/ (ln Лей.) <10,0.

У больных ВП при гриппе А(Н1N1) предсказующая ценность положительного результата составила 95,6%, а предсказующая ценность отрицательного результата - 78,5% (табл.4).

Кроме того, вычислялись следующие показатели (таблица 5):

- Чувствительность - доля больных, имеющих коэффициент ДЭК/ (ln Лей.) >10,0 среди тех, у кого тяжелая ВП=53,3%.

- Специфичность - доля больных, имеющих коэффициент ДЭК/ (ln Лей.) <10,0 среди тех, у кого легкая и средней тяжести ВП=98,6%.

Прогностические возможности уровня ДЭК и лейкоцитов крови у больных ВП при гриппе А(Н1N1).			
	ДЭК > 10,0 × 10 ⁴ /л	Лей. < 10,0 × 10 ⁹ /л	ДЭК/ (ln Лей.)
ПЦПР (%)	81,8	52	95,6
ПЦОР (%)	66,3	72,5	78,5

Сравнительные характеристики уровня ДЭК и лейкоцитов крови у больных ВП при гриппе А(Н1N1)			
	ДЭК > 10,0 × 10 ⁴ /л	Лей. < 10,0 × 10 ⁹ /л	ДЭК/ (ln Лей.)
Чувствительность (%)	46,7	33,3	53,3
Специфичность (%)	87	64	98,6

Клинический пример №1: Больной Г. (39 лет) поступил в стационар в период эпидемии гриппа в порядке экстренной помощи. Жалобы были связаны с одышкой в

покое, малопродуктивным кашлем, высокой лихорадкой, насморком, болью в мышцах, общей слабостью. Из анамнеза выяснено, что около 5 суток у пациента была клиника ОРВИ, лечился симптоматически. Объективно: состояние тяжелое, кожные покровы серые, температура тела - 39°, частота дыхательных движений (ЧДД)=34-36 в минуту, SpO₂=80-82%, частота сердечных сокращений (ЧСС)=110 в минуту, артериальное давление (АД)=110 и 70 мм рт.ст. Аускультативно: бронхиальное дыхание, крепитация ниже угла лопаток с обеих сторон, диффузные жужжащие хрипы. В общем анализе крови выявлена лейкопения - $3,3 \times 10^9$ /л, количество ДЭК составило $22,0 \times 10^4$ /л, коэффициент ДЭК/(In Лей.)=18,48 (заподозрена тяжелая вирусная пневмония). По данным рентгенографии органов грудной клетки выявлены признаки двусторонней пневмонии, респираторного дистресс-синдрома взрослых (РДСВ). Пациент был помещен в реанимационное отделение, начата интенсивная терапия. В первые сутки был взят мазок на ПЦР к гриппу А(Н1N1), на следующий день получен отрицательный результат. Невзирая на этот результат, пациенту проводилась двухкомпонентная противовирусная терапия, трехкомпонентная антибактериальная, симптоматическая, дезинтоксикационная терапия; в дальнейшем в связи с прогрессированием дыхательной недостаточности была инициирована ИВЛ с высокими цифрами ПДКВ (положительное давление в конце выдоха). Однако, несмотря на интенсивные методы респираторной поддержки и медикаментозной терапии, на 4-е сутки госпитализации наступила смерть пациента вследствие тяжелой полиорганной недостаточности. По результатам патологоанатомического исследования была морфологически подтверждена вирусная пневмония, в секционном материале методом ПЦР обнаружена РНК вируса гриппа А/Н1-Swine, что подтверждает диагноз гриппа А/Н1N1.

Клинический пример №2: Больной Л. (29 лет) поступил в стационар в порядке экстренной помощи в период снижения заболеваемости гриппом. Предъявлял жалобы на одышку в покое, кашель со слизистой мокротой, выраженную общую слабость, потливость, головокружение. В течение 3 суток у пациента была клиника ОРВИ, за медицинской помощью не обращался, противовирусные препараты не принимал. При поступлении: состояние тяжелое, кожные покровы бледные, температура тела - 38,8°, ЧДД=32-34 в минуту, SpO₂=87-88%, ЧСС=112 в минуту, АД=90 и 60 мм рт.ст. Аускультативно определялось ослабление дыхания в нижних отделах с обеих сторон, крепитация над всеми легочными полями. В общем анализе крови выявлена лейкопения до $3,6 \times 10^9$ /л, количество ДЭК составило $16,5 \times 10^4$ /л, коэффициент ДЭК/(In Лей.)=12,89 (тяжелая вирусная пневмония). По рентгенограмме органов грудной клетки - двусторонняя субтотальная пневмония, признаки РДСВ. Пациент был госпитализирован в реанимационное отделение. При поступлении была назначена противовирусная терапия и антибактериальная терапия, проводилась неинвазивная вентиляция легких; взят мазок на ПЦР к РНК гриппа А(Н1N1), спустя трие суток получен положительный результат. На тот момент состояние больного улучшилось, уменьшены проявления дыхательной недостаточности (ЧДД=25 в мин, SpO₂=93%), стабилизирована гемодинамика, увеличилось количество лейкоцитов до $5,5 \times 10^9$ /л, уменьшилось количество ДЭК до $12,0 \times 10^4$ /л, по рентгенограмме - положительная динамика. Спустя 20 суток с момента госпитализации пациент был выписан на амбулаторное долечивание.

Клинический пример №3: Больная Н. (25 лет) поступила в стационар в период эпидемии гриппа. При поступлении предъявляла жалобы на одышку при обычной

нагрузке, малопродуктивный кашель, насморк, общую слабость, потливость. Заболела около 2-х дней назад, противовирусные препараты не принимала. При поступлении: состояние средней степени тяжести, кожные покровы бледные, температура тела - 38,3°, ЧДД=20 в минуту, SpO₂=94%, ЧСС 96 в минуту, АД=110 и 70 мм рт.ст. Аускультативно определялось ослабление дыхания справа ниже угла лопатки, там же мелкопузырчатые хрипы. В общем анализе крови количество лейкоцитов составило 3,9×10⁹/л, количество ДЭК - 8,0×10⁴/л, коэффициент ДЭК/(ln Лей.)=5,88 (ВП средней степени тяжести). По рентгенограмме органов грудной клетки - интерстициальная нижнедолевая пневмония справа. Пациентка была госпитализирована в отделение пульмонологии. Сразу при поступлении была назначена противовирусная, антибактериальная и симптоматическая терапия; взят мазок на РНК гриппа А(Н1N1). К моменту получения положительного результата ПЦР (спустя 5 суток) состояние больной было удовлетворительным. Отмечалась нормализация всех физикальных и лабораторных показателей, на контрольной рентгенограмме инфильтрации не определялось. Пациентка была выписана на 8-е сутки госпитализации с выздоровлением.

Клинический пример №4: Больная X. (23 года) поступила в стационар в период эпидемии гриппа. При поступлении предъявляла жалобы на одышку при обычной нагрузке, сухой кашель, общую слабость, потливость. Заболела остро, после переохлаждения, около 2-х дней назад. При поступлении: состояние средней степени тяжести, кожные покровы бледные, температура тела - 38,6°, ЧДД=20-22 в минуту, SpO₂=93-95%, ЧСС=100 в минуту, АД=105 и 70 мм рт.ст. Аускультативно определялось ослабление дыхания справа ниже угла лопатки, звучная крепитация. В общем анализе крови количество лейкоцитов составило 12,2×10⁹/л, количество ДЭК - 3,0×10⁴/л, коэффициент ДЭК/(ln Лей.)=1,2 (пневмония, преимущественно бактериальной этиологии). По рентгенограмме органов грудной клетки - правосторонняя нижнедолевая пневмония. Пациентка была госпитализирована в отделение пульмонологии. При поступлении была назначена противовирусная, антибактериальная и симптоматическая терапия; взят мазок на РНК гриппа А(Н1N1). Спустя трое суток получен отрицательный результат, больной был выставлен диагноз внебольничной пневмонии, противовирусные препараты отменены. На фоне лечения отмечалось улучшение самочувствия, рентгенологически - разрешение пневмонии. Пациентка была выписана на 14-е сутки с выздоровлением.

Таким образом, для диагностики и оценки степени тяжести вирусной пневмонии проводят подсчет количества десквамированных эндотелиальных клеток, количества лейкоцитов и рассчитывают интегральный коэффициент: $K = \text{ДЭК} / (\ln \text{Лей.})$ При значении этого коэффициента >4,0 диагностируют вирусную пневмонию, при значении >10,0 - тяжелое течение вирусной пневмонии, что позволяет своевременно оценить состояние пациента и назначить противовирусную терапию.

Литература

1. Семенов Б.Ф. Концепция отложенной смерти при гриппе и тактика вакцинопрофилактики инфарктов, инсультов и летальных исходов при этой инфекции. // Русский Медицинский Журнал, т.11, №23, 2003 г., 1266-1268 с.
2. Официальный сайт Всемирной Организации Здравоохранения. // http://www.who.int/csr/don/2010_05_21/en/index.html
3. Информационное письмо №24-0/10/1-5039 от 25 августа 2009 г. (в редакции от 03 ноября 2009 г.) - «Временные методические рекомендации МЗ РФ «Схемы лечения и профилактики гриппа, вызванного вирусом типа А/Н1N1».

4. Dominguez-Cherit G., Lapinsky S., Macias A.E. et all. Critically Ill patients with 2009 influenza A(H1N1) in Mexico. // JAMA 2009; Nov 4; 302: 1880-1887.

5 5. Белокриницкая Т.Е и др. Интенсивная терапия тяжелых осложненных форм гриппа А(Н1N1) и сезонного гриппа у беременных. // Здоровоохранение. - 2010. - №1. - С.39-47.

6. Грипп А/Н1N1 как типичная эмерджентная инфекция: Пособие для врачей под ред. Киселева О.И. // С.Пб., 2009 г., 44 стр.

10 7. Зарубаев В.В. Морфологические особенности инфекционного процесса в легких при гриппе А(Н1N1). // Материалы конгресса «Человек и лекарство» 12-16.04.2010, г.Москва.

Формула изобретения

15 Способ ранней диагностики вирусной пневмонии, включающий подсчет количества лейкоцитов крови, отличающийся тем, что дополнительно определяют уровень десквамированных эндотелиальных клеток крови, вычисляют логарифмированный показатель количества лейкоцитов крови и рассчитывают комплексный коэффициент по формуле:

20 $K = \text{ДЭК} / (\ln \text{Лей.})$, где (ДЭК) - количество десквамированных эндотелиальных клеток, $\ln(\text{Лей.})$ - логарифмированный показатель количества лейкоцитов крови, при значении коэффициента $>4,0$ диагностируют вирусную пневмонию.

25

30

35

40

45

50