



УКРАЇНА

(19) UA (11) 53424 (13) U
(51) МПК (2009)
A61K 39/04
C12N 1/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ РАННЬОЇ ДІАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЬОЗУ

1

(21) u201002929

(22) 15.03.2010

(24) 11.10.2010

(46) 11.10.2010, Бюл.№ 19, 2010 р.

(72) ЛАПОВЕЦЬ НАТАЛІЯ ЄВГЕНІЇВНА, БІЛОЗІР
ЛІДІЯ ІВАНІВНА, ЛАПОВЕЦЬ ЛЮБОВ ЄВГЕНІВНА,
АКІМОВА ВЕРОНІКА МИКОЛАЇВНА

(73) ЛАПОВЕЦЬ НАТАЛІЯ ЄВГЕНІЇВНА

(57) 1. Спосіб ранньої діагностики туберкульозу із дослідженням імунного статусу організму за допомогою проби Коха, який **відрізняється** тим, що додатково проводять дослідження цитокінового

2

статусу, визначаючи у сироватці крові інтерлейкіни IL-1 β , 6; TNF- α до і через 72 години після проведення проби Коха.

2. Спосіб за п.1, який **відрізняється** тим, що туберкульоз діагностують за зміною рівнів інтерлейкінів у сироватці крові до і після проведення проби Коха, якщо рівень TNF- α збільшується у 2,8 рази і рівень IL-1 β , 6 зменшується у 3 рази через 72 години після позитивної або частково позитивної проби Коха.

Корисна модель належить до медицини, зокрема, до клініко-лабораторної діагностики туберкульозу.

Відомі способи, що дозволяють виявити ранні ознаки захворювання туберкульозом, обумовлені реакцією імунної системи організму. Імунодіагностика дозволяє виявити реакцію організму на мікобактерії туберкульозу (МБТ), оцінити стан імунної системи, особливо наявність її порушень, що знижують стійкість до захворювання. Імунна відповідь на будь-який чужорідний агент залежить від характеру, дози і тривалості його впливу, а також від здатності імунної системи, її імунокомпетентних клітин (ІКК) повноцінно відповідати на антигенний стимул [8, 9]. Імунна відповідь на МБТ істотно відрізняється від імунітету при інших інфекційних захворюваннях. Інфікування МБТ не завжди супроводжується розвитком захворювання, що обумовлено природною стійкістю до них. У відповідь на проникнення МБТ в організм розвиваються і специфічні імунологічні зміни, які визначають набутий протитуберкульозний імунітет. Вони формуються як у результаті вакцинації БЦЖ, так і внаслідок спонтанного інфікування вірулентними МБТ. Механізм протитуберкульозного імунітету визначають три основні чинники: гіперчутливість уповільненого типу або туберкульозна алергія, антитілоутворення і фагоцитоз. Набутий імунітет також не абсолютний, він може бути подоланий масив-

ним впливом МБТ, особливо при різного типу імунодефіцитах [5, 7].

Для діагностики туберкульозу використовують проби Манту та Коха. В останні роки широко використовують підшкірну пробу Коха у поєднанні з різними лабораторними дослідженнями (біохімічними, імунологічними, бактеріологічними). Підшкірна проба Коха є чутливішою, ніж проба Манту. При цьому найчастіше для дорослих застосовують пробу Коха з 20-100 ТО ППД-Л з підшкірним його введенням на спині у проекції лівої лопатки. При активному туберкульозі через 72 год. після підшкірного введення 20-100 ТО ППД-Л виникає загальна, місцева та вогнищева реакція. Ця проба важлива при визначенні прихованої активності специфічного процесу, а також при диференційній діагностиці специфічного і неспецифічного процесу. Поєднання підшкірної проби Коха з іншими методами діагностики дозволяє достовірніше діагностувати туберкульоз. При оцінці підшкірної проби Коха (загальна, вогнищева і місцева реакції на підшкірне введення 20 ТО ППД-Л) враховуються зміни в загальному аналізі крові, в показниках імунної системи та ін.

Туберкульозна інфекція може уражати майже всі тканини і системи органів. Тому дуже важливо діагностувати туберкульоз на ранніх стадіях захворювання, виявити його приховану активність і місце локалізації.

(19) UA (11) 53424 (13) U

Матеріали аутопсій неспеціалізованих стаціонарів вказують, що навіть у країнах з високим рівнем розвитку медицини багато випадків туберкульозу прижиттєве не розпізнаються [1, 2, 7]. Одним із найважчих розділів фтизіатрії є етіологічна діагностика туберкульозу органів черевної порожнини [4].

В умовах клініки внутрішніх хвороб виникають труднощі при діагностиці різноманітних форм абдомінального туберкульозу (АТ). Проблеми діагностики туберкульозу органів черевної порожнини виникають тому, що туберкульоз традиційно асоціюється у лікарів перш за все з ураженням легень і відсутністю специфічних клінічних ознак туберкульозного ураження органів черевної порожнини [3].

Для верифікації (постановки) туберкульозу органів черевної порожнини дослідники [12] пропонують використовувати наступні дослідження:

1) мікробіологічні: калу, асцитичної рідини, біопатів органів черевної порожнини на наявність мікобактерій туберкульозу методами прямої бактеріоскопії і посіву;

2) гістологічні: біопатів органів черевної порожнини, в тому числі мезентеріальних лімфатичних вузлів на наявність специфічних змін. Наявність гіперергічної реакції на пробу Манту, наявність туберкульозу інших органів і зменшення клінічних проявів з боку органів черевної порожнини на фоні пробної протитуберкульозної терапії також можуть бути підтвердженням діагнозу АТ.

Недоліками цих способів діагностики є те, що вони займають багато часу і збільшують терміни стаціонарного обстеження. Ці методи діагностики, за винятком гістологічного, не дають можливості у більшості випадків достовірно діагностувати абдомінальний туберкульоз. Гістологічне дослідження біопатів та іншого біологічного матеріалу дає вичерпну інформацію про специфічність процесу, але таке дослідження можливе тільки при оперативному втручанні.

У останні роки при підозрі на АТ частіше стали застосовувати інвазивно-ендоскопічні методи дослідження, у тому числі діагностичну лапароскопію. Лапароскопія дозволяє отримати матеріал для морфологічного дослідження, виявити супутні туберкульозу захворювання органів черевної порожнини. У ряді випадків діагностична лапароскопія може стати і лікувальною [1, 7]. Недоліком цього способу діагностики є те, що лапароскопія це оперативне втручання, яке не завжди проводиться хворим на абдомінальний туберкульоз, оскільки вогнищева реакція у таких хворих може бути вираженою не яскраво.

Збільшення числа хворих на АТ, труднощі діагностики, необґрунтоване розширення об'єму оперативних втручань (видалення органу) диктують необхідність розробки нового способу ранньої діагностики туберкульозу.

Нами пропонується новий Спосіб ранньої діагностики туберкульозу, із визначенням рівнів інтерлейкінів IL-1 β , 6, TNF- α у крові, до проведення проби Коха і через 72 години після. Підшкірна проба Коха є одним із методів діагностики прихованої активності специфічного процесу, її проводять

також для диференціації специфічного і неспецифічного запального процесу. Визначення рівнів інтерлейкінів IL-1 β , 6, TNF- α до проби Коха і через 72 години після, є більш чутливим способом діагностики і диференційної діагностики туберкульозу. Інтерлейкіни є медіаторами запального процесу, основними регуляторами міжклітинних взаємодій, і зміни рівнів інтерлейкінів у сироватці крові дозволяють діагностувати туберкульоз на ранніх стадіях у тому числі і АТ [6, 10, 13, 14, 15].

В основу корисної моделі покладено завдання розробити новий Спосіб ранньої діагностики туберкульозу, який дозволив би забезпечити ранню достовірну діагностику туберкульозу.

Технічний рівень, який полягає у забезпеченні діагностики туберкульозу на ранніх стадіях, досягають тим, що проводять одночасне дослідження імунного і цитокінового статусу хворих.

Дослідження імунного статусу проводять за допомогою проби Коха, якою визначають реакцію організму на мікобактерії туберкульозу (МБТ). Проба Коха це імунопровокаційний допоміжний метод оцінки загальної реакції організму на підшкірне введення туберкуліну. Ця проба дозволяє оцінити приховану активність специфічного процесу, і диференціювати специфічний і неспецифічний процес.

Дослідження цитокінового статусу проводять за допомогою визначення рівнів інтерлейкінів у крові. Інтерлейкіни - це група низькомолекулярних поліпептидів і глікопротеїдів, які є важливими медіаторами (факторами) при різних фізіологічних і патологічних (запалення) процесах. Продукуються інтерлейкіни лейкоцитами. Визначення рівнів інтерлейкінів широко застосовуються для діагностики багатьох хронічних і гострих патологічних процесів. У хворих на туберкульоз, як і у хворих на інші хронічні запальні процеси рівні інтерлейкінів у крові є достовірно вищими від показників у здорових людей.

Спосіб ранньої діагностики туберкульозу, який заявляється, полягає у тому, що визначають рівні інтерлейкінів у сироватці крові (IL-1 β , 6, TNF- α) до і через 72 години після проведення проби Коха. При наявності туберкульозного процесу, після проведення проби Коха концентрація досліджуваних інтерлейкінів змінюється наступним чином: рівень TNF- α збільшується в 2,8 рази, рівень IL-1 β , 6 зменшується в 3 рази. У хворих, у яких не верифікується туберкульоз, після проведення проби Коха рівень інтерлейкінів не змінюється.

Такі зміни рівнів досліджуваних інтерлейкінів у поєднанні з позитивною, або частково позитивною пробю Коха (коли присутній хоча б один із трьох компонентів проби Коха) є свідченням туберкульозного процесу в організмі.

Визначення рівнів інтерлейкінів (IL-1 β , 6, TNF- α) у сироватці крові до проби Коха і після її проведення, є чутливим лабораторним методом, який дозволить діагностувати туберкульоз на ранніх його стадіях і допоможе правильно трактувати саму пробу Коха.

Застосування нового Способу ранньої діагностики туберкульозу, який включає одночасне дослі-

дження імунного і цитокинового статусу хворих, дозволяє своєчасно діагностувати туберкульоз.

При проведенні патентно-інформаційного пошуку заявником не знайдено технічного рішення ранньої діагностики туберкульозу, яке б мало спільні суттєві ознаки із заявленим рішенням.

Визначення рівнів інтерлейкінів широко застосовують для діагностики багатьох патологічних процесів [3]. Відомий спосіб диференційної діагностики хронічних запальних захворювань кишок за допомогою визначення інтерлейкіну 4 та інтерферону-гама (Харківська медична академія післядипломної освіти, заявник Сергієнко О.І., Бюлетень реєстрації НДР та ДКР, №2, 2005р.). Також відомий спосіб прогнозування рецидивів виразкової хвороби дванадцятипалої кишки, що здійснюється шляхом визначення інтерлейкінів 1р та 4 (Харківська медична академія післядипломної освіти, заявники Ермолаєв Д.М., Звягінцева Т.Д. Бюлетень реєстрації НДР та ДКР, №7, 2003 р.).

Новий спосіб ранньої діагностики туберкульозу, який заявляється, передбачає визначення у крові рівнів інтерлейкінів IL-1 β , 6, TNF- α до проведення проби Коха і через 72 години після. Застосування цього способу дає можливість діагностувати туберкульоз на ранніх стадіях.

Реалізація заявленого технічного рішення здійснюється таким чином.

Кров набираємо венепункцією ліктьової вени у кількості 2 мл до і через 72 години після проведення проби Коха. Проводиться визначення рівнів інтерлейкінів IL-1 β , 6, TNF- α у сировотці крові за допомогою набору реагентів для імуноферментного аналізу фірми "Diacclone", Франція. При прихованій активності туберкульозу після проведення проби Коха концентрація досліджуваних інтерлейкінів змінюється наступним чином: рівень TNF- α збільшується в 2,8 рази, рівень IL-1 β , 6 зменшується в 3 рази. При відсутності туберкульозного процесу після проведення проби Коха рівень інтерлейкінів не змінюється.

Такі зміни рівнів досліджуваних інтерлейкінів є свідченням прихованої активності туберкульозу. У сировотці крові хворих, яким не був верифікований діагноз туберкульоз, рівень інтерлейкінів не змінюється після проби Коха.

Приклад.

Достовірність діагностики туберкульозу Спосібом ранньої діагностики туберкульозу.

Способом ранньої діагностики туберкульозу нами були верифіковані діагнози туберкульозу у наступних хворих.

Хвора Ф., 37 років, підозрюють туберкульоз легень. Проба Манту - папула 5мм. Лабораторно-імунологічним дослідженням встановлено наступне: підвищений рівень лейкоцитів 11,2Г/л, лімфоцитів 3,14Г/л, Т-цитотоксичні лімфоцитів 0,60Г/л, природніх кілерів 0,75 Г/л. Дослідження цитокинового статусу виявило, підвищення рівнів цитокинів:

TNF- α 16,5пг/мл, IL-1 β 82,9пг/мл, IL-6 0,35пг/мл. Отримані лабораторні дані вказують на наявність хронічного запального процесу, невідомої етіології. З метою підтвердження діагнозу була проведена діагностична проба Коха. Через 72год. після проби Коха відмічався субфібрилітет, позитивна

шкірна реакція (папула 10мм), лабораторні дослідження виявили наступні показники: рівень лейкоцитів 9,9 Г/л, лімфоцитів 2,48Г/л, Т-цитотоксичних лімфоцитів 0,59 Г/л, природніх кілерів 0,45Г/л; цитокини: TNF- α - 52,3пг/мл, IL-1 β - 1,95пг/мл, IL-6 - 0,08пг/мл. Таким чином, найбільш оптимальним для диференційної діагностики специфічних і неспецифічних процесів в абдомінальній патології є визначення до і після проби Коха рівнів цитокинів: TNF- α , IL-1 β , IL-6. У результаті проведених досліджень був підтверджений діагноз абдомінальний туберкульоз.

Хворий Г., 50 років, підозрюють наявність абдомінального туберкульозу. Проба Манту - папула 6мм. Лабораторно-імунологічне дослідження: підвищений рівень лейкоцитів (9,2Г/л), лімфоцитів (3,12Г/л), Т-цитотоксичні лімфоцитів (0,76Г/л), природніх кілерів (0,38Г/л). Дослідження цитокинового статусу виявило, підвищення рівнів цитокинів: TNF- α (0,87пг/мл), IL-1 β (41,8пг/мл), IL-6 (5,1пг/мл). Отримані лабораторні дані вказують на наявність хронічного запального процесу, невідомої етіології. З метою підтвердження діагнозу була проведена діагностична проба Коха. Через 72год. після проби Коха відмічались позитивна шкірна реакція (папула 11мм), лабораторні дослідження виявили наступні показники: рівень лейкоцитів 9,6Г/л, лімфоцитів 3,17Г/л, Т-цитотоксичних лімфоцитів 0,77Г/л, природніх кілерів 0,45Г/л;

цитокини: TNF- α - 109,1пг/мл, IL-1 β - 3,76пг/мл, IL-6 - 0,09пг/мл.

Хвора Н., 38 років, з метою встановлення вірного діагнозу проводились наступні обстеження: проба Манту, лабораторно-імунологічні дослідження, встановлення рівнів цитокинів. Проба Манту - папула 6мм. Лабораторно-імунологічне дослідження:

підвищений рівень лейкоцитів (8,6Г/л), лімфоцитів (2,54Г/л), Т-цитотоксичні лімфоцитів (0,43Г/л), природніх кілерів (0,66Г/л). Дослідження цитокинового статусу показало, підвищення рівнів цитокинів: TNF- α (0,91пг/мл), IL-1 β (2,05пг/мл), IL-6 (0,08пг/мл). Отримані дані вказують на наявність хронічного запального процесу, невідомої етіології. З метою встановлення діагнозу була проведена діагностична проба Коха. Через 72год. після проби Коха відмічався субфібрилітет, позитивна шкірна реакція (папула 10мм), лабораторні дослідження виявили наступні показники: рівень лейкоцитів 6,9Г/л, лімфоцитів 3,76Г/л, Т-цитотоксичних лімфоцитів 0,64 Г/л, природніх кілерів 1,05Г/л; цитокини: TNF- α - 65,0пг/мл, IL-1 β - 2,39пг/мл, IL-6 - 0,07пг/мл.

За результатами проведених досліджень у хворих із визначенням рівнів інтерлейкінів IL-1 β , 6, TNF- α до проби Коха і через 72 години після був поставлений діагноз туберкульоз (абдомінальний туберкульоз). Підшкірна проба Коха є одним із методів діагностики прихованої активності специфічного і неспецифічного запального процесу. Визначення рівнів інтерлейкінів IL-1 β , 6, TNF- α до проби Коха і через 72 години після, є більш чутливим способом діагностики і диференційної діагностики туберкульозу.

Література:

1. Баринов В.С. Дифференциальная диагностика абдоминального туберкулеза на основе клинико-лабораторных и лапароскопических данных: Пособие для фтизиатров и хирургов / В.С.Баринов, Н.А.Прохорович . - СПб., 1997. - С.4-6.
2. Бобченко А.П. Частота выявления и клинико-диагностическое значение L-форм возбудителя у больных туберкулезом органов дыхания и внелегочной локализации /А.П.Бобченко, Л.Н.Стеклова, Е.Б.Вишневская // Проблемы туберкулеза. - 2002.- №4. - С.19-21.
3. Жидовинов А.А. Значение лабораторных маркеров эндотоксикоза и цитокинового профиля в диагностике и эффективности лечения осложненных форм острого холецистита / А.А.Жидовинов, В.А.Зурнаджьянц, Г.И.Жидовинов // Цитокины и воспаление. - 2006.-Т.5,№3.-С.27-33.
4. Зинчук А.Н. Случай абдоминального туберкулеза: сложности диагностики / А.Н.Зинчук, В.А.Герасун, Л.Ю.Шевченко // Проблемы туберкулеза. - 2002. - №8. - С.56-57.
5. Игнатьева Г.А. Современные представления об иммунитете (контуры общей теории) / Игнатьева Г.А. // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. - 2003. - №2.- С.2-7.
6. Казмірчук В. Роль цитокінів у виявленні функціональних порушень Імунітету / В.Казмірчук, Д.Мальцев // Ліки України. - 2004. - №2. - С.15-18.
7. Карпов А.В. Сравнительная эффективность раннего выявления туберкулеза иммунологическими методами / Карпов А.В. // Вестник Новгородского государственного университета. - 1998. - №7. - С.33-35.
8. Пунга В.В. Своевременное выявление больных туберкулезом - приоритетное направление в борьбе с этой инфекцией / Пунга В.В // Российские медицинские вести. -1998.-Т.3, №4.-С.14-16.
9. Чернушенко К.Ф. Імуннологічні методи у діагностиці туберкульозу / К.Ф.Чернушенко // Лабораторна діагностика - 2005. - №2 (32). - С.61-66.
10. Чуклин С.Н. Интерлейкины / С.Н.Чуклин, А.А.Переяслов. - Львов: Лига-Пресс, 2005.-481с.
11. Щеголева Л.С. Регрессионный анализ оценки состояния иммунной системы / Л.С.Щеголева, Л.К.Добродеева, Л.В.Поскотинова, Е.М.Дюжикова // Клиническая лабораторная диагностика,-1999.- №3.- С.13-15.
12. Al-Hadeedi S.,Walia H.S., Al-Sayer H.M. Abdominal tuberculosis //Can. J.Surg.-1990.-Vol.33.-P.233-237.
13. Dinarello C.A. Biologic basis for interleukin-1 in disease / C.A. Dinarello // Blood 1996; 6: 2095-2147.
14. Fantuzzi G. Defective inflammatory response and cytokine synthesis in IL-1p deficient mice / G. Fantuzzi, R.Faggioni, M.Sironi//Cytokine 1995; 7: 608-615.
15. Hirano T. Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis/ T. Hirano, T. Matsuda, M.Tumer // Eur J. Immunol 1988; 18: 1797-1801.