



УКРАЇНА

(19) UA (11) 53338 (13) A

(51) B 6 A61B10/00, G01N33/53

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

**(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ ПЕРЕБІГУ ТУБЕРКУЛЬОЗУ У ХВОРИХ НА ВПЕРШЕ ДІАГНОСТОВАНИЙ ТУБЕРКУЛЬОЗ ЛЕГЕНЬ**

1

2

(21) 2002043595

(22) 29 04 2002

(24) 15 01 2003

(46) 15 01 2003, Бюл. № 1, 2003 р.

(72) Кадан Людмила Павлівна, Чернушенко Катерина Федорівна, Петренко Віктор Михайлович, Іванкова Олена Вталівна

(73) ІНСТИТУТ ФТІЗИАТРІЇ І ПУЛЬМОНОЛОГІЇ ІМ. Ф. Г. ЯНОВСЬКОГО АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ

(57) Спосіб прогнозування перебігу туберкульозу у хворих на вперше діагностований туберкульоз легень шляхом дослідження периферичної крові хворого, який відрізняється тим, що визначають рівень специфічної сенсibiliзації лімфоїдних

клітин периферичної крові в реакції бласттрансформації лімфоцитів з туберкуліном (РБТЛ з РPD), коефіцієнт стимуляції мікобактеріями туберкульозу продукції супероксидного аніону моноцитами в тесті з нітросинім тетразолієм (КС НСТ) та коефіцієнт стимуляції мікобактеріями туберкульозу активності мієлопероксидази моноцитів (КС МПО) та при показниках РБТЛ з РPD - 4,3 % і вище, КС НСТ-тесту - 1,60 у о і нижче, КС МПО - 0,75 у о і нижче - прогнозують перебіг туберкульозу легень зі швидким темпом інволюції, а при показниках РБТЛ з РPD - 4,2 % і нижче, КС НСТ-тесту - 1,61 у о і вище, КС МПО - 0,76 у о і вище - прогнозують перебіг туберкульозу легень зі звичайним та сповільненим темпами інволюції

Винахід відноситься до галузі медицини, насамперед до фтизіатрії і може бути використаний в клінічній практиці для прогнозування перебігу вперше діагностованого туберкульозу легень на різних стадіях розвитку хвороби

Відомий спосіб прогнозування перебігу туберкульозу легень шляхом визначення в сироватці хворих вмісту протитуберкульозних антитіл та рівню антигенемії (див. Использование иммунохимических исследований для прогноза течения фиброзно-кавернозного туберкулеза и послеоперационных осложнений у больных, получавших химио- и лазеротерапию / Л.В. Сергеева, В.Г. Добкин, А.В. Баенский и др. // Пробл. туберкулеза - 1997 - № 4 - С. 23 - 12.) Показано, що високий рівень антигенемії та продукції антитіл, які реєструються у хворих на початку лікування у подальшому негативно впливає на перебіг туберкульозу та ефективність лікування. Але проведення такого дослідження доступно тільки високоспеціалізованим закладам з розвинутою біотехнологічною базою, тому що потребують виділення з клітинної стінки мікобактерій туберкульозу окремих антигенів з відомою молекулярною масою, а для визначення рівня антигенемії потрібне отримання імунної сироватки проти *M. tuberculosis* та афінне виділення протитуберкульозних антигенів

Найбільш близьким до способу, що пропонується, є спосіб прогнозування перебігу туберкульозного процесу (див. А.С. 1702315 СССР, МКИ-4 G 01 N 33/53 Спосіб прогнозування течення туберкульозного процесу / Г.А. Вахидова, А.Л. Кульберг, Л.М. Бартова (СССР) - № 4453031/14, Заявлено 01.07.88, Опубл. 30.12.91, Бюл. № 48 - С. 182) шляхом проведення реакції аглютинації з визначенням R-білків з анти-R- сироваткою та еритроцитами 0 (I) групи та Rh (+) людини та при титрі R-білків 1 : 12800 прогнозують сприятливий перебіг, а при титрах 1 : 25600 та вище - несприятливий

Однак спосіб є недостатньо точним внаслідок того, що для прогнозування перебігу захворювання використовується лише один показник, який відображає активність запального процесу, але не є специфічним для туберкульозу

Відомо, що показники, які характеризують імунологічну реактивність хворих на туберкульоз, значно відрізняються в залежності від клінічного перебігу захворювання (див. Чернушенко Е.Ф., Когосова Л.С. Иммунология и иммунопатология заболеваний легких - Киев, 1981) Нами пропонується спосіб прогнозу перебігу туберкульозного процесу з використанням трьох специфічних для туберкульозу тестів, що відображають функціона-

(13) A

(11) 53338

(19) UA

льну активність визначальних для туберкульозного процесу клітин імунітету - Т-лімфоцитів та моноцитів-макрофагів

В основу винаходу поставлена задача створення способу прогнозування перебігу туберкульозу у хворих на вперше діагностований туберкульоз легень, в якому шляхом визначення рівню специфічної сенсibilізації лімфоїдних клітин периферичної крові (РБТЛ з РРД), коефіцієнту стимуляції мікобактеріями туберкульозу продукції супероксидного аніону моноцитами в тесті з нітросинім тетразолієм (КС НСТ-тесту) та коефіцієнту стимуляції мікобактеріями туберкульозу активності мієлопероксидази моноцитів (КС МПО) досягається підвищення точності прогнозу характеру перебігу туберкульозу легень за рахунок визначення специфічної реактивності клітин, функціональна активність яких є визначальною для перебігу та наслідків туберкульозного процесу, що дає можливість на ранніх стадіях розвитку хвороби прогнозувати та науково обґрунтувати тривалість інтенсивної фази протитуберкульозної терапії та усього основного курсу лікування хворих

Поставлене завдання вирішується тим, що у способі прогнозування перебігу туберкульозу у хворих на вперше діагностований туберкульоз легень шляхом дослідження периферичної крові хворого, згідно з винаходом, визначають рівень специфічної сенсibilізації лімфоїдних клітин периферичної крові в реакції бласттрансформації лімфоцитів з туберкуліном, коефіцієнт стимуляції мікобактеріями туберкульозу продукції супероксидного аніону моноцитами в тесті з нітросинім тетразолієм та коефіцієнт стимуляції мікобактеріями туберкульозу активності мієлопероксидази моноцитів та при показниках РБТЛ з РРД - 4,3 % і вище, КС НСТ-тесту - 1, 60 у о і нижче, КС МПО - 0,75 у о і нижче - прогнозують перебіг туберкульозу легень зі швидким темпом інволюції, а при показниках РБТЛ з РРД - 4,2% і нижче, КС НСТ-тесту - 1,61 у о і вище, КС МПО - 0,76 у о і вище - прогнозують перебіг туберкульозу легень зі звичайним та сповільненим темпами інволюції

Відомо, що напруженість імунної відповіді на мікобактерії туберкульозу значно відрізняється у хворих з різним клінічним перебігом туберкульозу (див Чернушенко Е Ф, Когосова Л С Иммунология и иммунопатология заболеваний легких - Киев, 1981) Для прогнозу перебігу туберкульозу легень використані три специфічні тести, що відображають функціональну активність визначальних для туберкульозного процесу клітин імунітету - Т-лімфоцитів та моноцитів-макрофагів Дослідним шляхом встановлено, що при перебігу туберкульозу легень зі швидким темпом інволюції визначаються показники РБТЛ з РРД - 4,3 % і вище, КС НСТ-тесту - 1, 60 у о і нижче та КС МПО - 0,75 у о і нижче, а перебіг туберкульозу легень зі звичайним та сповільненим темпами інволюції процесу характеризується показниками РБТЛ з РРД - 4,2 % і нижче, КС НСТ-тесту - 1,61 у о і вище, КС МПО - 0,76 у о і вище, що дозволяє підвищити точність прогнозу і дає можливість науково обґрунтувати тривалість інтенсивної фази терапії та усього основного курсу лікування

Спосіб здійснюють таким чином

У хворого беруть венозну кров в кількості 5мл 1мл крові використовують для постановки реакції бластної трансформації лімфоцитів (РБТЛ) з туберкуліном (PPD) за методом Bach J et al (Bach J, Hirschorn K Lymphocyte interaction A potential histocompatibility test in vitro // Exp Cell Res - 1963 - V 32 - P 592-596) у модифікації Григор'євої (Григор'єва М П, Копелян И И Разработка микрометода куптивирования клеток крови человека // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины - 1972 - Т 74 - № 8 - С 119 - 122) Облік РБТЛ з туберкуліном проводять методом мікроскопії (розраховують відсоток бластних клітин у морфологічному препараті) 2мл використовують для отримання сироватки хворого 32мл крові, що залишилися, стандартним методом за допомогою фікол-верографіну зі щільністю 1,080г/мл отримують мононуклеари, проводять підрахунок кількості клітин в камері Горяєва, доводять концентрацію мононуклеарів до 1млн/мл та містять по 0,2мл суміші клітин на 2 предметних скельця (на кожне з них попередньо наносять парафілм з двома лунками діаметром 1,5см) Протягом 60хв при 37°C у вологій камері відбувається адгезія моноцитів до скла Скельця тричі промивають у забуференому фізіологічному розчині (ЗФР) з рН - 7,2 звільнюючи їх від клітин, що не мають здатності до адгезії Таким чином отримують моношар моноцитів Одночасно готують специфічну тест-систему для стимуляції клітин - опсоновані аутосироваткою хворого мікобактерії туберкульозу (вакцина БЦЖ - о-БЦЖ) Для її отримання проводять інкубацію вакцини (1000мкг в 1мл ЗФР) із аутосироваткою хворого у співвідношенні 1 : 1 протягом 60хв, при 37°C

Для визначення КС НСТ-тесту використовують 1 скельце з моношаром моноцитів В одну лунку додають 0,2мл ЗФР (контрольна проба), в другу - 0,2мл о-БЦЖ (дослідна проба) Проводять інкубацію 30хв у вологій камері в термостаті при 37°C, після чого в обидві лунки вмішують по 50мкл 1% розчину НСТ та проводять інкубацію ще 30хв Після закінчення реакції скельце тричі промивають у ЗФР, підсушують, фарбують 1% водним розчином сафраніну 2 хвилини, підраховують відсоток НСТ-позитивних клітин у контрольному та дослідному зразках та проводять розрахунок КС в умовних одиницях (у о), як показника здатності клітин реагувати зміною функціональної активності на поглинання о-БЦЖ за формулою

КС - дослід контроль,

де дослід - відсоток НСТ-позитивних клітин у дослідному зразку,

контроль - відсоток НСТ-позитивних клітин у контрольному зразку

Для визначення КС МПО використовують друге скельце з моношаром моноцитів До однієї лунки додають 0,2мл ЗФР (контрольна проба), до другої - 0,2мл о-БЦЖ (дослідна проба) Проводять інкубацію 60хв у вологій камері в термостаті при 37°C Після закінчення реакції скельце тричі промивають у ЗФР, підсушують та фарбують за методом J A Metcalf та співавт, 1986 (Laboratory manual of neutrophil function /, JI Gallin, WM Nauseef R K Root // "Raven Press", New York, 1986 - 191 p), підраховують відсоток МПО-позитивних

клтин у контрольному та дослідному зразках та проводять розрахунок КС за формулою, наведеною вище. При показниках РБТЛ з РPD - 4,3% і вище, КС НСТ-тесту - 1,60 у о і нижче, КС МПО - 0,75 у о і нижче - прогнозують перебіг туберкульозу легень зі швидким темпом інволюції, а при показниках РБТЛ з РPD - 4,2% і нижче, КС НСТ-тесту - 1,61 у о і вище, КС МПО - 0,76 у о і вище прогнозують перебіг туберкульозу легень зі звичайним та сповільненим темпами інволюції.

Наводимо конкретні приклади здійснення способу.

**Приклад 1** Хворий К., 27 років, історія хвороби № 2166, госпіталізований у відділення фтизіатрії Інституту фтизіатрії і пульмонології з діагнозом - інфільтративний туберкульоз верхньої долі правої легень у фазі розпаду МБТ(-).

При вступі загальний стан відносно задовільний. Скарги на слабкість, пітливість, сухий кашель. На рентгенограмі органів грудної клітини в верхній долі правої легень в S2 визначається фокус неомогенної інфільтрації з групою невеликих порожнин розпаду. В аналізах харкотиння жодного разу не знайдені МБТ, тому чутливість до основних протитуберкульозних препаратів не визначалась. За клініко-рентгенологічними даними у хворого спостерігався перебіг туберкульозу легень із швидким темпом інволюції. Так, клінічні прояви симптомів інтоксикації зникли через 3 тижні, інфільтрація розсмокталась через 2 місяці. Тривалість інтенсивної фази лікування 4 препаратами склала 2 місяці, строк основного курсу антибактеріальної терапії (АБТ) - 128 діб. За даними рентгенограм - у верхній долі правої легень виразне розсмоктування інфільтрації, в S2 залишилося ущільнення розміром 1,5 x 1,6 см. Хворого виписано в задовільному загальному стані без ускладнень під спостереження диспансеру за місцем проживання. Швидкий темп інволюції туберкульозних змін підтверджували і результати імунологічного обстеження. На початку лікування хворого були отримані такі показники: РБТЛ з РPD - 6,5%, КС НСТ-тесту - 1,53 у о, КС МПО - 0,62 у о.

**Приклад 2** Хворий Ш., 62 роки, історія хвороби № 882, госпіталізований у відділення фтизіатрії Інституту фтизіатрії і пульмонології з діагнозом - інфільтративний туберкульоз верхньої долі правої легень у фазі розпаду, МБТ(+).

При вступі загальний стан середньої важкості. Скарги на сухий кашель, слабкість, пітливість, зниження ваги на 8 - 10 кг за 3 - 4 місяці, фебрильну температуру. На рентгенограмі у верхній долі правої легень S1-2 масивна неомогенна інфільтрація, що поширюється на корінь легень, численні нечітко окреслені невеликі порожнини розпаду. У корені правої легень декілька кальцинатів. У засів харкотиння знайдено МБТ, методом флоатції мікобактерії туберкульозу не визначалися жодного разу. На етапі лікування визначалась чутливість до всіх протитуберкульозних препаратів. За даними клініко-рентгенологічного спостереження у хворого спостерігався швидкий темп інволюції туберкульозних змін у легенях. Так, клінічні прояви інтоксикації зникли через 1 місяць. Бактеріовиділення припинилося через 1 місяць. Тривалість інтенсивної фази лікування 4 препаратами склала

2 місяці, а строк основного курсу антибактеріальної терапії - 136 діб. За даними рентгенологічних досліджень у правій легень спостерігалось виразне розсмоктування інфільтрації протягом 2 місяців та загоєння порожнин розпаду протягом 4 місяців. Хворий був виписаний до праці в задовільному загальному стані без ускладнень.

Про швидкий темп інволюції туберкульозних змін свідчили і результати імунологічного дослідження. На початку лікування хворого були отримані такі показники: РБТЛ з РPD - 4,7%, КС НСТ-тесту - 1,21 у о, КС МПО - 0,70 у о.

**Приклад 3** Хворий С., 40 років, історія хвороби № 2076, госпіталізовано у відділення фтизіатрії Інституту фтизіатрії і пульмонології з діагнозом - інфільтративний туберкульоз верхньої долі правої легень у фазі розпаду, МБТ(+).

При вступі загальний стан відносно задовільний. Скарги на кашель з виділенням слизового харкотиння, слабкість, пітливість, тахікардію, субфебрильну температуру. На рентгенограмі в верхній долі правої легень у S1-S2 визначалась неомогенна інфільтрація, що поширювалась на корінь легень, нечітко окреслені ділянки просвітлення, порожнина деструкції d = 1,5 x 1,5 см. В аналізах харкотиння усіма методами визначались МБТ, які були чутливі до основних протитуберкульозних препаратів. На підставі отриманих клініко-рентгенологічних та лабораторних результатів дослідження у хворого спостерігався звичайний темп інволюції туберкульозних змін у легенях. Так, клінічні прояви інтоксикації зникли через 1,2 місяці, бактеріовиділення припинилося через 3 місяці. Інфільтративні зміни у легенях зникли повністю через 4,5 місяці. Тривалість інтенсивної фази лікування 4 препаратами (одним з яких був мікобутін) склала 3 місяці, а загального курсу АБТ - 165 діб. Хворий виписаний у задовільному загальному стані без ускладнень.

Перебіг туберкульозу легень із звичайним темпом інволюції підтверджували і результати імунологічного дослідження. На початку лікування хворого були отримані такі показники: РБТЛ з РPD - 3,5%, КС НСТ-тесту - 1,95 у о, КС МПО - 0,79 у о.

**Приклад 4** Хворий М., 32 роки, історія хвороби № 560, госпіталізований у відділення фтизіатрії Інституту фтизіатрії і пульмонології з діагнозом - дисемінований туберкульоз у фазі інфільтрації та розпаду, МБТ(+).

При вступі загальний стан середньої важкості. Скарги на кашель з харкотинням, слабкість, пітливість, зниження ваги, фебрильну температуру. На рентгенограмі в обох легенях D < S, більше в верхніх і середніх легеневи́х полях - поліморфна вогнищева дисемінація, фокуси інфільтрації і численні, різного розміру, неправильної форми тонкостінні порожнини розпаду. Корінь легень з елементами фіброзу і інфільтрації. В аналізах харкотиння МБТ визначалися методом флоатції, в засівах - масивний ріст. Клініко-лабораторне обстеження виявило стійкість МБТ до ізоніазиду, рифампіцину, стрептоміцину, етіонаміду. На підставі отриманих клініко-рентгенологічних та лабораторних даних у хворого спостерігався сповільнений темп інволюції туберкульозних змін у легенях. Так, клінічні симптоми інтоксикації зникли

через 2 місяці, бактеріовиділення припинилося через 3,5 місяці, інфільтрація розсмокталася протягом 6 місяців. Тривалість інтенсивної фази лікування 6 препаратами склапа 4 місяці, а загальний курс АБТ - 266 днів. Виписаний у задовільному загальному стані без ускладнень.

Про сповільнений темп інволюції туберкульозних змін у легенях свідчили і результати імунологічних досліджень. На початку лікування хворого були отримані такі показники: РБТЛ з РРД - 2,5%, КС НСТ-тесту - 1,80 у о, КС МПО - 0,85 у о.

Ретроспективний аналіз показників РБТЛ з РРД, КС НСТ-тесту та КС МПО, отриманих при імунологічному обстеженні на початку протитуберкульозної терапії хворих проводили після отри-

мання клініко-рентгенологічних та лабораторних даних про характер перебігу туберкульозу легень у цих осіб. Це дозволило виділити дві групи хворих за особливостями перебігу хвороби. Всього обстежено 34 пацієнта, які були розподілені на 2 групи.

Першу групу склали 12 хворих, у яких, за даними клініко-рентгенологічного спостереження та лабораторних досліджень, діагностовано перебіг туберкульозу легень зі швидким темпом інволюції, другу - 22 пацієнта зі звичайним та сповільненим темпами інволюції туберкульозу легень. Характеристика груп наведена у таблиці 1. Також для отримання контрольних імунологічних показників було обстежено 12 здорових донорів крові.

Таблиця 1

Характер перебігу туберкульозу легень у хворих I та II груп

Показники	I група	II група
Строк зникнення клінічних симптомів інтоксикації (міс)	0,87 ± 0,04	1,91 ± 0,14*
З наявністю бактеріовиділення		
абс	7	20
%	58,3	86,9
Без бактеріовиділення		
абс	5	2
%	41,7	16,7
Строк припинення бактеріовиділення (міс)	1,36 ± 0,13	2,58 ± 0,16*
Строк розсмоктування інфільтрації (міс)	2,84 ± 0,29	4,27 ± 0,25*
Тривалість інтенсивної фази АБТ (міс)	1,96 ± 0,09	3,20 ± 0,19*
Тривалість основного курсу АБТ (міс)	138,0 ± 7,9	173,7 ± 7,2*

Примітка: \* - різниця з показниками I групи вірогідна ( $p < 0,05$ )

Результати імунологічного дослідження показали, що рівень специфічної реактивності клітин лімфоїдної та моноцитарно-макрофагальної ланки імунітету є важливими чинниками, що впливають

на характер перебігу туберкульозного процесу і показники РБТЛ з РРД, КС НСТ-тесту та КС МПО вірогідно відрізняються у хворих двох груп (табл 2).

Таблиця 2

Порівняльна характеристика рівня специфічної сенсibiлізації лімфоцитів та активності кисеньозалежного метаболізму моноцитів у хворих на вперше діагностований туберкульоз легень ( $M \pm m$ )

Показники	Здорові особи	I група	II група
РБТЛ з РРД%	2,4 ± 0,5	7,9 ± 1,5 <sup>0</sup>	2,98 ± 0,52*
КС НСТ-тесту у о	1,36 ± 0,15	1,21 ± 0,10	2,01 ± 0,20 <sup>0</sup> *
КС МПО у о	0,69 ± 0,05	0,71 ± 0,03	1,00 ± 0,10 <sup>0</sup> *

Примітки

1<sup>0</sup> - різниця показників у порівнянні із групою здорових осіб вірогідна ( $p < 0,05$ ),

2\* - різниця між показниками I та II груп вірогідна ( $p < 0,05$ )

Як свідчать дані, наведені в таблиці, у пацієнтів I групи спостерігається позитивна реакція клітин на туберкулін, тоді як у хворих II групи вона негативна чи слабо позитивна. У хворих з швидким темпом інволюції туберкульозного процесу мікобактерії туберкульозу *in vitro* не викликають надмірної активації продукції супероксидного аніону та МПО, тоді як при звичайних та сповільнених темпах інволюції туберкульозу реєструється надмірна активація кисеньозалежного метаболізму моноцитів периферичної крові.

Таким чином, у зрівнянні із прототипом способів, що пропонується, є більш точним за рахунок того, що для прогнозування характеру перебігу запального процесу у хворих на вперше діагностований туберкульоз легень використовують три показники, що відображають специфічну реактивність клітин, функціональна активність яких є визначальною для перебігу та наслідків туберкульозного процесу.

Підвищення точності прогнозу перебігу туберкульозу легень дозволяє на ранніх стадіях хвороби

визначити темп його інволюції та з самого початку терапії хворого призначити найбільш ефективну індивідуальну хіміотерапію, а саме, визначити тривалість інтенсивної фази терапії та усього основного курсу лікування

Імунологічні тести, які використовуються у даному способі не є складними у використанні, не потребують великих затрат робочого часу та реактивів і можуть бути впроваджені в роботу протитуберкульозних закладів