



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Статус: не действует (последнее изменение статуса: 02.07.2021)
Пошлина: Возможность восстановления: нет.

(21)(22) Заявка: [2012134488/15](#), 10.08.2012(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
10.08.2012

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 10.08.2012

(45) Опубликовано: [20.01.2014](#) Бюл. № 2

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: ЧУРИНА Е.Г. и др. Субпопуляционный состав регуляторных Т-клеток крови у больных туберкулезом легких с множественной лекарственной устойчивостью // Бюллетень сибирской медицины, 2011, №4, с.183-186, [онлайн], [найдено 22.05.2013]. Найдено из Интернета: <URL: <http://www.ssmu.ru/bull/II/04/35.pdf>. RU 2434582 C1, 27.11.2011. RU 2361212 C1,

10.07.2009. ЗЕМЛЯНАЯ Н.А. Клинико-иммунологические особенности туберкулеза легких с множественной лекарственной устойчивостью // Автореферат к.м.н. - Томск, 2007, с.10-20, [онлайн], [найдено 22.05.2013]. Найдено из Интернета: <URL: <http://medlib.tomsk.ru/fulltext/61266.doc>. MOUSAVI T. et al. Study of KIR expression and HLA ligands in CD56+lymphocytes of drug resistant tuberculosis patients // Iran J Allergy Asthma Immunol., 2011, Sep; 10(3): 189-94; doi: 010.03/ijaa.189194, abstract.

Адрес для переписки:

634050, г.Томск, Московский тракт, 2, ГБОУ
ВПО СибГМУ, отдел ИС и В, Н.Г. Зубаревой

(72) Автор(ы):

Чурина Елена Георгиевна (RU),
Уразова Ольга Ивановна (RU),
Новицкий Вячеслав Викторович (RU),
Фокин Василий Александрович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Сибирский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России) (RU)

(54) СПОСОБ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ТУБЕРКУЛЕЗА ЛЕГКИХ С МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины, а именно к фтизиатрии, и может быть использовано для прогнозирования туберкулеза легких с множественной лекарственной устойчивостью у впервые выявленных больных туберкулезом легких (ТБ). Для этого до назначения противотуберкулезной химиотерапии в крови пациента определяют количество $CD45R0^+$ Т-клеток памяти, $CD3^+CD4^+CD25^{hi}$ и $CD4^+CD25^+Foxp3^-$ регуляторных Т-клеток, $CD3^+CD4^+CD25^-$ Т-хелперов. Вычисляют значения линейных классификационных функций по уравнениям: $d_1 = -14,0015 - 0,0626 \times x_1 + 0,5181 \times x_2 + 2,4285 \times x_3 + 0,2255 \times x_4$ и $d_2 = -22,6954 - 0,1710 \times x_1 + 0,6689 \times x_2 + 3,1202 \times x_3 + 0,3229 \times x_4$, где x_1, x_2, x_3, x_4 - количество субпопуляций $CD45R0^+$ Т-клеток памяти, $CD3^+CD4^+CD25^{hi}$ и $CD4^+CD25^+Foxp3^-$ регуляторных Т-клеток, $CD3^+CD4^+CD25^-$ Т-хелперов, соответственно. При $d_1 < d_2$ прогнозируют туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя. Использование данного способа позволяет прогнозировать вариант течения ТБ с вероятностью 83,3% и позволяет применять меры коррекции лечебного воздействия. 5 ил., 2 табл., 2 пр.

Изобретение относится к области медицины, а именно к фтизиатрии и пульмонологии, клинической иммунологии, аллергологии и может быть использовано для прогнозирования туберкулеза легких с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) у впервые выявленных больных туберкулезом легких (ТБ).

В современных условиях туберкулезом легких (ТБ) характеризуется тяжелым

клиническим течением, патоморфозом, выраженной функциональной недостаточностью иммунной системы пациента и высоким процентом летальных исходов [1, 13]. Отличительной чертой сложившейся на сегодняшний день эпидемиологической ситуации по ТБ является формирование штаммов микобактерий, мульти- и широкорезистентных к лекарственным препаратам стандартной ' антимикобактериальной терапии. При этом изменение биологических свойств возбудителя оказывает существенное влияние на процесс бактериовыделения и определяет патоморфоз заболевания. По данным ВОЗ (2010), основанным на информации, поступившей из 114 стран мира, первичная МЛУ микобактерий туберкулеза МБТ составляет около 4% от всех впервые выявленных случаев ТБ, а на территории стран СНГ данный показатель выше в 3-6 раз [10, 12]. Становится очевидным, что МЛУ МБТ у впервые выявленных больных ТБ является глобальной общемировой проблемой. Таким образом, разработка способов и моделей прогноза МЛУ МБТ у впервые выявленных больных ТБ представляется актуальной и своевременной.

Известен способ прогнозирования течения ТБ с МЛУ у впервые выявленных больных, заключающийся в исследовании нейтрофилов периферической крови: у больного производят забор крови, определяют значения спонтанного и стимулированного НСТ-теста и при значении спонтанного НСТ-теста менее или равного 13% и при значении стимулированного НСТ-теста менее или равного 20% прогнозируют положительную рентгенологическую динамику через три месяца противотуберкулезной терапии [7]. Данный способ позволяет осуществлять прогнозирование клинического течения ТБ с уже диагностированной МЛУ возбудителя, но не риск развития МЛУ как таковой.

Известен способ прогнозирования течения ТБ. Сущность способа: у больного определяют индекс возврата лаважной жидкости, определяемый в процентах как соотношение полученной лаважной жидкости к количеству введенной, а также нейтрофильно-макрофагальный коэффициент, определяемый как соотношение относительного числа нейтрофилов к числу альвеолярных макрофагов. При величине индекса возврата лаважной жидкости, составляющей/менее или равной 25%, и повышении нейтрофильно-макрофагального коэффициента более или равного 1,0 прогнозируют прогрессирование туберкулезного процесса. Использование способа позволяет определить тяжесть специфического процесса, дает возможность прогнозировать эффективность лечебных мероприятий и отдельных результатов лечения ТБ [8]. Указанный способ также имеет прогностическое значение, прежде всего в аспекте клинического течения ТБ и обеспечивает проведение своевременной коррекции лечебных мероприятий.

Наиболее близким к предлагаемому является способ прогнозирования развития лекарственно-устойчивого ТБ, заключающийся в следующем. В первые 3-5 дней после поступления больного в стационар в качестве факторов риска при балльной оценке определяют: бактериовыделение, клиническую форму туберкулеза; распространенность туберкулезного процесса в легких; категорию; контакт с больным туберкулезом, злоупотребление алкоголем; социальный статус пациента, пол; возраст; табакокурение; давность флюорографического обследования; тип структуропостроения фракций сыворотки крови, совокупность патологических маркеров некробиоза во фракциях сыворотки крови. Подсчитывает сумму баллов и при сумме баллов 1-7 вероятность развития лекарственно-устойчивого ТБ оценивается как низкая, 8-12 - умеренная, 13-19 - высокая [9]. Недостатками способа являются невысокая точность и информативность, а также возможность не вполне объективной оценки медико-социальных факторов риска, как самим пациентом, так и лечащим врачом.

Таким образом, перед нами стояла принципиально новая техническая задача - создание точного и информативного способа прогнозирования ТБ с МЛУ.

Для решения поставленной задачи в способе прогнозирования множественной лекарственной устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* у больных с впервые выявленным туберкулезом легких, заключающемся в исследовании пациента до начала проведения специфической химиотерапии противотуберкулезными препаратами, определяют содержание в крови $CD45R0^+$ Т-клеток памяти, $CD3^+CD4^+CD25^{hi}$ и $CD4^+CD25^+Foxp3^-$ регуляторных Т-клеток, $CD3^+CD4^+CD25^-$ Т-хелперов и вычисляют значения линейных классификационных функций по уравнениям:

$$d_1 = -14,0015 - 0,0626 \times x_1 + 0,5181 \times x_2 + 2,4285 \times x_3 + 0,2255 \times x_4$$

$$d_2 = -22,6954 - 0,1710 \times x_1 + 0,6689 \times x_2 + 3,1202 \times x_3 + 0,3229 \times x_4,$$

где x_1, x_2, x_3, x_4 - количество субпопуляций $CD45R0^+$ Т-клеток памяти, $CD3^+CD4^+CD25^{hi}$ и $CD4^+CD25^+Foxp3^-$ регуляторных Т-клеток, $CD3^+CD4^+CD25^-$ Т-хелперов, соответственно, и при $d_1 < d_2$ прогнозируют туберкулез, с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя.

Способ осуществляют следующим образом. У больных с впервые выявленным туберкулезом легких до начала проведения специфической химиотерапии противотуберкулезными препаратами определяют факторы риска, такие как бактериовыделение, клиническую форму туберкулеза; распространенность туберкулезного процесса в легких; категорию; наличие контакта с больным туберкулезом, злоупотребление алкоголем; социальный статус пациента, пол; возраст; табакокурение; давность флюорографического обследования; тип структурообразования фракций сыворотки крови, совокупность патологических маркеров некробиоза во фракциях сыворотки крови. Также, проводят иммунологическое исследование крови пациента, для чего производят забор периферической крови из вены, утром, натощак. Материалом исследования служат лимфоциты крови.

Для определения поверхностных молекул CD3, CD4, CD25, CD45R0 и внутриклеточного маркера иммуносупрессорной активности Foxp3 в лимфоцитах периферической крови применяли метод проточной лазерной трехцветной цитометрии с использованием моноклональных антител (МКАТ), меченных флуоресцентными метками. Процедуру окрашивания поверхностных (CD3, CD4, CD25, CD45R0) и внутриклеточного (Foxp3) маркеров проводят согласно протоколам фирмы производителя («Becton Dickinson (BD)», США).

Порядок выполнения исследования:

Определение количества CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ регуляторных Т-клеток в периферической крови

После выделения мононуклеарные лейкоциты дважды отмывают фосфатно-солевым буфером (pH=7,4) и стандартизируют количество клеток в суспензии до 10×10⁶ клеток/мл. Для окрашивания поверхностных маркеров (CD4, CD25) лимфоцитов периферической крови к суспензии мононуклеарных лейкоцитов добавляют по 20 мкл соответствующих специфических МКАТ, меченных флуоресцентными метками: МКАТ к CD4, меченные FITC (кат. №345768), и МКАТ к CD25, меченные PE-Cy5 (кат. №555433) («Becton Dickinson (BD)», США). Пробы инкубируют 20 мин при комнатной температуре, защищая от света. Для окрашивания внутриклеточного маркера Foxp3 проводят процесс пермеабилзации лимфоцитов. Для этого в каждую пробирку поочередно вносят рабочие растворы стандартных буферов: Human Foxp3 Buffer A и Human FoxP3 Buffer C из набора BD Pharmingen Human Foxp3 Buffer Set (кат. №560098). Буферы разводят согласно прилагаемой инструкции. Лейкоциты инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре в темном месте. Затем клетки дважды отмывают 2 мл фосфатно-солевого буфера (pH=7,4). В ресуспендированный осадок вносят антитела к внутриклеточному маркеру Foxp3, меченные PE (кат. №560046), в количестве 20 мкл и инкубируют 30 мин в темноте при комнатной температуре. Затем клетки дважды отмывают 2 мл фосфатно-солевого буфера (pH=7,4), к осадку добавляют 400 мкл фосфатно-солевого буфера, после чего пробы считают готовыми к измерению.

Измерение производят на цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson, США), укомплектованном аргоновым лазером с длиной волны 488 нм и стандартными фильтрами. Анализ полученных данных осуществляют при помощи программного приложения BD CellQuest for Mac OS® X.

Анализ образцов клеточных суспензий проводят по пяти параметрам: прямому светорассеянию (FSC), характеризующему размер клетки, боковому светорассеянию (SSC), характеризующему цитоплазматические, а также мембранные особенности клетки, и трем показателям флуоресценции - зеленому (FITC - 530 нм), оранжевому (PE - 585 нм) и малиновому (Pe-Cy5 - 610 нм), выявляемых на FL1-, FL2- и FL3-каналах (Фиг.1-3).

На Фиг.3 в нижнем правом квадранте находятся клетки, экспрессирующие одновременно антигены CD4, CD25 и не содержащие внутриклеточный маркер Foxp3 (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ регуляторные Т-лимфоциты).

На графике FSC против SSC выделяют гейт 1 - лимфоциты (Фиг.1). Гейт 1 прикладывают к событиям на графике SSC против FL-1 (CD4-FITC), гейтом 2 очерчивают популяцию клеток, экспрессирующих CD4 (Фиг.2). Гейт 2 прикладывают к графику FL-2 (Foxp3-PE) против FL-3 (CD25-PE-Cy5) (Фиг. 3). Результаты выражают в процентах.

Определение количества CD3⁺CD4⁺CD25⁻ Т-хелперов и CD3⁺CD4⁺CD25^{hi} регуляторных Т-клеток в периферической крови

Для определения поверхностных рецепторов CD3, CD4 и CD25 на лимфоцитах периферической крови применяют метод лазерной проточной трехцветной цитометрии с использованием МКАТ, меченных флуоресцентными метками. Процедуру окрашивания маркеров CD3, CD4 и CD25 проводят согласно протоколу фирмы производителя («Becton Dickinson (BD)», США).

После выделения мононуклеарные лейкоциты дважды отмывают фосфатно-солевым буфером (pH=7,4), каждый раз при этом ресуспендируя и центрифугируя в

течение 10 мин при 1500 об/мин. Затем надосадочную жидкость сливают, а оставшийся осадок ресуспендируют в фосфатно-солевом буфере и стандартизируют количество клеток в суспензии до 10×10^6 клеток/мл. Для окрашивания лимфоцитов в цитометрические пробирки вносят по 50 мкл суспензии мононуклеарных лейкоцитов и по 20 мкл конъюгированных МКАТ - CD3 (PerCP-Cy5,5)/CD4 (FITC)/CD25 (PE) («Becton Dickinson (BD)», США, кат. №333170), перемешивают на вортексе и инкубируют в течение 15 мин при комнатной температуре в темноте.

Измерение производят на цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson, США), укомплектованном аргоновым лазером с длиной волны 488 нм и стандартными фильтрами. Анализ полученных данных осуществляют при помощи программного приложения BD CellQuest for Mac OS® X.

Анализ образцов клеточных суспензий проводили по пяти параметрам: прямому светорассеянию (FSC), характеризующему размер клетки, боковому светорассеянию (SSC), характеризующему цитоплазматические, а также мембранные особенности клетки, и трем показателям флуоресценции - зеленому (FITC - 530 нм), оранжевому (PE - 585 нм) и малиновому (PerCP-Cy5,5 - 610 нм), выявляемых на FL1, FL2, FL3-каналах (Фиг.4).

Для анализа строят два промежуточных графика: FSC против SSC, на котором выделяют гейт 1 - лимфоциты. Гейт 1 прикладывают к событиям на втором графике SSC против FL-3 (CD3- PerCP-Cy5,5), гейтом 2 очерчивают популяцию лимфоцитов, экспрессирующих CD3. Затем гейт 2 прикладывают к графику FL-1 (CD4-FITC) против FL-2 (CD25-PE) (Фиг.4).

На Фиг.4 в верхнем правом квадранте находятся лимфоциты, экспрессирующие одновременно CD3-, CD4- и CD25-молекулы. Клетки, находящиеся в этом квадранте и светящиеся по CD25 с интенсивностью более 10^2 , считают субпопуляцией CD3⁺CD4⁺CD25^{hi} (регуляторные Т-клетки с «высокой экспрессией» CD25-молекулы). В правом нижнем квадранте располагают лимфоциты с иммунофенотипом CD3⁺CD4⁺CD25⁻ (Т-хелперы). Результаты выражают в процентах.

Определение количества лимфоцитов крови, экспрессирующих CD45R0

Для определения в периферической крови лимфоцитов, экспрессирующих маркер CD45R0, применяют метод лазерной проточной трехцветной цитометрии с использованием МКАТ к лимфоцитарным рецепторам Anti-CD45R0, меченных PE (кат. №347967) («Becton Dickinson (BD)», США). Процедуру окрашивания лимфоцитов, экспрессирующих CD45R0-молекулу, проводят согласно протоколу фирмы производителя («Becton Dickinson (BD)», США).

Процедуры пробоподготовки, окрашивания и измерения проводят аналогично охарактеризованным выше. Анализ образцов клеточных суспензий проводят по трем параметрам: прямому светорассеянию (FSC), характеризующему размер клетки, боковому светорассеянию (SSC), характеризующему цитоплазматические, а также мембранные особенности клетки, и одному показателю флуоресценции - оранжевому (PE - 585 нм), выявляемому на FL2-канале (Фиг.5). Для анализа строили промежуточный график: FSC против SSC, на котором выделяют гейт 1 - лимфоциты. Гейт 1 прикладывают к событиям на графике SSC против FL-2 (Anti-CD45R0-PE) (Фиг.5). На Фиг.5 в нижнем правом квадранте находятся лимфоциты, экспрессирующие CD45R0-молекулу (Т-клетки памяти). Результаты выражают в процентах.

Прогноз множественной лекарственной устойчивости у больных туберкулезом легких

Для построения модели прогноза множественной лекарственной устойчивости и лекарственной чувствительности у пациентов с ТБ используют дискриминантный анализ [6]. Решающие правила (дискриминантные функции) представляют собой линейные классификационные функции вида

$$d_j(x_1, x_2, \dots, x_n) = b_{0,j} + b_{1,j}x_1 + b_{2,j}x_2 + \dots + b_{n,j}x_n,$$

где d_j - линейная дискриминантная функция для j -й группы пациентов;

$b_{0,j}$ - константа для j -й линейной дискриминантной функции;

$b_{1,j}, b_{2,j}, \dots, b_{n,j}$ - коэффициенты для признаков x_1, x_2, \dots, x_n в j -й линейной дискриминантной функции;

x_1, x_2, \dots, x_n - значения признаков классифицируемого пациента.

Для решения задачи прогноза по измеренным у пациента иммунологическим показателям производят расчет дискриминантных функций, соответствующих верифицированным группам пациентов с лекарственно-чувствительным (ЛЧ) вариантом ТБ и МЛУ ТБ. Пациента относят к той группе, для которой линейная дискриминантная функция принимала максимальное значение.

При проведении расчетов используют пакет прикладных программ Statistica 6.0 [3].

Способ основан на анализе данных клинических исследований. Обучающую выборку составили 12 пациентов с МЛУ ТБ и 18 пациентов с ЛЧ ТБ. У каждого больного первоначально были определены 10 иммунологических показателей,

характеризующих количественный состав иммунокомпетентных клеток крови в целом, а также субпопуляционный состав регуляторных Т-клеток: $CD4^+CD25^+Foxp3^-$, $CD4^+CD25^+Foxp3^+$, $CD4^+CD25^-Foxp3^+$, $CD3^+CD4^+CD25^+$, $CD3^+CD4^+CD25^{hi}$, $CD3^+CD4^+CD25^-$, $\gamma\delta$ Т-лимфоциты, $CD45R0^+$ Т-клетки, общее количество лейкоцитов и относительное количество лимфоцитов. Выбор показателей был обусловлен, прежде всего, тем, что сбалансированность и завершенность этапов иммунного ответа на *M. tuberculosis* определяется преимущественно клетками-эффекторами и регуляторами адаптивного клеточного иммунитета. Кроме того, в последнее время появились новые данные в пользу подавляющего (супрессорного) действия клеток приобретенного иммунитета на врожденный иммунитет [4, 11]. В противоположность ранее сложившимся представлениям были получены факты, свидетельствующие о том, что недостаточное количество Т-лимфоцитов в организме приводит к утрате контроля раннего воспалительного ответа, чрезмерная активация (равно как и подавление) которого приводит к иммунопатологии и способствует прогрессирующему течению инфекционного процесса [11].

Лекарственную чувствительность *M. tuberculosis* к ПТП определяли методом абсолютных концентраций в среде Левенштейна-Йенсена. Клиническую форму ТБ устанавливали на основании данных рентгенологического исследования легких. При этом пациенты объединялись в группы с ЛЧ ТБ и МЛУ ТБ независимо от формы заболевания, поскольку риск развития МЛУ не зависит от клинической формы ТБ [2, 5].

В результате применения процедуры пошагового дискриминантного анализа из 10 исходных показателей были построены правила классификации, включающие 4 наиболее информативных показателя, представленных в табл. 1. Информативными показателями для прогноза МЛУ *M. tuberculosis* оказались количество $CD45R0^+$ Т-клеток памяти, количество регуляторных Т-клеток с иммунофенотипами $CD3^+CD4^+CD25^{hi}$ и $CD4^+CD25^+Foxp3^-$, а также количество $CD3^+CD4^+CD25^-$ Т-хелперов в периферической крови. Их определение позволяет прогнозировать вариант течения ТБ с вероятностью 83,3%. Качество прогноза состояния по построенным решающим правилам представлено в табл.2. Точность предсказания МЛУ ТБ на основе предложенного способа составила 83,3%.

Примеры на осуществление способа

Пример 1.

Больной Б., 37 лет.

Поступил во фтизиатрическое отделение Томской областной клинической туберкулезной больницы 11.04.2011 г. Диагноз: подострый диссеминированный ТБ в фазе инфильтрации и распада, МБТ (+). Диагноз ТБ был установлен на основании анамнеза, клинической картины заболевания, рентгенологического исследования легких, данных микроскопического и бактериологического исследования мокроты.

Данные анамнеза: со слов больного, туберкулезом ранее не болел. Установлен контакт с больными туберкулезом (находился в пенитенциарном учреждении). Больной курит и периодически злоупотребляет алкоголем. Флюорографическое обследование проходил в 2008 г. При поступлении предъявлял жалобы на слабость, утомляемость, потерю веса, повышение температуры тела до 38° - $38,5^{\circ}$ С, кашель с мокротой, одышку.

Объективный статус: состояние пациента средней степени тяжести. Симптомы интоксикации ярко выражены. Аускультативно дыхание везикулярное. Со стороны других органов и систем патологии не выявлено.

Рентгенологическое исследование от 12.04.2011 г.: в проекции верхних долей обеих легких на фоне обогащенного легочного рисунка множественные очаговые малой интенсивности, сливного характера тени, с участками просветления.

В анализе мокроты от 12.04.2011. МБТ обнаружены методом микроскопии и методом посева.

Общий анализ крови от 12.04.2011.: Нв - 114, Эр - 2,18, ЦП 0,8, Le - $12,5 \times 10^9$ /л, Э - 5, П - 16, С - 60, Л - 14, М - 5, СОЭ - 34 мм/ч.

Общий анализ мочи без особенностей.

Биохимический анализ крови: общий белок - 61 г/л, АЛТ - 12, АСТ - 18, тимоловая проба - 4,5, холестерин - 3,0, общий билирубин - 6,8, глюкоза - 6,6 ммоль/л.

Р. Манту - 24 мм (гиперергическая).

Описанные выше методы обследования пациента Б. позволяли косвенно прогнозировать лишь неблагоприятный характер клинического течения диагностированного туберкулеза легких, но не чувствительность/устойчивость возбудителя к основным противотуберкулезным препаратам.

В связи с этим, дополнительно было проведено исследование согласно предлагаемому способу - произведен забор крови для определения иммунологических показателей: $CD45R0^+$ Т-клеток памяти, $CD3^+CD4^+CD25^{hi}$ и $CD4^+CD25^+Foxp3^-$ регуляторных Т-клеток, $CD3^+CD4^+CD25^-$ Т-хелперов. Относительное содержание

CD45R0⁺ Т-клеток памяти составило 2,26%, CD3⁺CD4⁺CD25⁻ Т-хелперов - 37,82%, CD3⁺CD4⁺CD25^{hi} регуляторных Т-клеток - 0,85%, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ регуляторных Т-клеток/активированных Т-хелперов - 8%. Подставив эти значения в их дискриминантные функции, получили:

$$d_1 = -14,0015 - 0,0626 \times 2,26 + 0,5181 \times 37,82 + 2,4285 \times 0,85 + 0,2255 \times 8 = 9,3197$$

$$d_2 = -22,6954 - 0,1710 \times 2,26 + 0,6689 \times 37,82 + 3,1202 \times 0,85 + 0,3229 \times 8 = 7,4513$$

Так как значение первой функции было больше чем второй, то состояние пациента Б. прогнозировали как лекарственно-чувствительный (ЛЧ) ТБ, однако с учетом того, что региональный уровень первичной МЛУ микобактерий в Томской области превышает 5% и составляет 14,5%, а также учитывая анамнестические, клинические и социальные показания больному был назначен стандартный режим химиотерапии 116, включающий в себя ПТП резервного (2-го) ряда. Через 6 недель данными микробиологического исследования (непрямой метод абсолютных концентраций) была определена чувствительность МБТ к ПТП основного (1-го) ряда (изониазиду, рифампицину, этамбутолу и стрептомицину), после чего была проведена коррекция лечебного воздействия и больной был переведен на стандартный режим химиотерапии Па.

Пример 2.

Больная П., 45 лет.

Поступила во фтизиатрическое отделение Томской областной клинической туберкулезной больницы 15.05.2011 г. Диагноз: инфильтративный ТБ S₆ левого легкого в фазе распада и обсеменения, МБТ (+). Диагноз ТБ был установлен на основании анамнеза, клинической картины заболевания, рентгенологического исследования легких, данных микроскопического и бактериологического исследования мокроты.

Данные анамнеза: Туберкулезом ранее не болела. Контакт с больным туберкулезом не установлен. Больная курит, алкоголем не злоупотребляет, проживает в общежитии, профессиональная деятельность связана с частым переохлаждением (работает продавцом на открытом рынке). Флюорографическое обследование проходила в 2010 г. При поступлении предъявляла жалобы на недомогание, слабость, повышение температуры тела до 37,5°-38,0°С.

Объективно: состояние ближе к удовлетворительному. Симптомы интоксикации умеренно выражены.

Рентгенологически от 16.05.2011 г. в S₆ левого легкого малой интенсивности фокус с нечеткими контурами. Связь с корнем. Средостение нормальной конфигурации.

В анализе мокроты от 13.02.08. МБТ обнаружены методом микроскопии и методом посева.

Общий анализ крови от 16.05.2011.: Нв - 108, Эр - 3,5, ЦП 0,9, Le - 10,7×10⁹/л, Э - 4, П - 8, С - 62, Л - 21, М - 4, СОЭ - 22 мм/ч.

Общий анализ мочи без особенностей.

Биохимический анализ крови: общий белок - 72 г/л, АЛТ - 8, АСТ - 11, тимоловая проба - 2,1, холестерин - 5,5, общий билирубин - 13,8, глюкоза - 4,7 ммоль/л.

Р. Манту - 12 мм.

Описанные выше методы обследования пациентки П. позволяли косвенно прогнозировать лишь характер клинического течения диагностированного туберкулеза легких, но не чувствительность/устойчивость возбудителя к основным противотуберкулезным препаратам.

В связи с этим, дополнительно было проведено исследование согласно предлагаемому способу - наряду со стандартными методами лабораторных исследований был произведен забор крови для определения иммунологических показателей CD45R0⁺ Т-клеток памяти, CD3⁺CD4⁺CD25^{hi} и CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ регуляторных Т-клеток, CD3⁺CD4⁺CD25⁻ Т-хелперов. Относительное содержание CD45R0⁺ Т-клеток памяти составило 9,35%, CD3⁺CD4⁺CD25⁻ Т-хелперов - 55,37%, CD3⁺CD4⁺CD25^{hi} регуляторных Т-клеток - 0,34%, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ регуляторных Т-клеток/активированных Т-хелперов - 23%. Подставив эти значения в их дискриминантные функции, получили:

$$d_1 = -14,0015 - 0,0626 \times 9,35 + 0,5181 \times 55,37 + 2,4285 \times 0,34 + 0,2255 \times 23 = 20,1126$$

$$d_2 = -22,6954 - 0,1710 \times 9,35 + 0,6689 \times 55,37 + 3,1202 \times 0,34 + 0,3229 \times 23 = 21,2303$$

Так как значение первой функции было меньше чем второй, то состояние пациентки П. прогнозировали как множественно лекарственно-устойчивый (МЛУ) ТБ и больной был назначен стандартный режим химиотерапии 116, включающий в себя ПТП резервного (2-го) ряда. Через 6 недель данными микробиологического исследования (непрямой метод абсолютных концентраций) была определена множественная устойчивость МБТ к ПТП основного (1-го) ряда (изониазиду, рифампицину, этамбутолу и стрептомицину) и лечение было продолжено согласно стандартному режиму химиотерапии Пб.

Приведенные примеры наглядно иллюстрируют эффективность, информативность

и высокую точность предложенного способа. Принципиальным является и то обстоятельство, что хотя непрямой метод абсолютных концентраций является универсальным в РФ для диагностики МЛУ МБТ, проблема существует и заключается в том, что данные этого метода поступают в клинику спустя 2,5-3 месяца после начала исследования за счет крайне медленного роста МБТ в питательной среде. Таким образом, предлагаемый способ, основанный на оценке количественных показателей иммунного статуса пациента, позволяет прогнозировать МЛУ МБТ у больных ТБ при выявлении заболевания и применять меры коррекции лечебного воздействия.

Приложение

Фиг.1. Гистограмма распределения мононуклеарных лейкоцитов по интенсивности прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния. Оценивается общее содержание лимфоцитов в смешанной суспензии мононуклеарных лейкоцитов.

Фиг.2. Гистограмма распределения CD4⁺-лимфоцитов, меченных FITC, по интенсивности SSC-светорассеяния и флуоресценции по первому каналу FL1.

Фиг.3. Гистограмма распределения регуляторных (Treg - T regulatory) CD25⁺Foxp3⁺ Т-лимфоцитов в популяции CD4-позитивных лимфоцитов крови по интенсивности флуоресценции в FL2-, FL3-каналах (меченных PE и PE-Cy5). Оценивается содержание CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ клеток (правый верхний квадрант), CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ клеток (левый верхний квадрант), CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ клеток (правый нижний квадрант).

Фиг.4. Гистограмма распределения CD4⁺CD25⁺ клеток в популяции CD3-позитивных лимфоцитов в крови по интенсивности флуоресценции в FL1-, FL2-каналах. Оценивается содержание CD3⁺CD4⁺CD25^{hi} клеток (правый верхний квадрант) и CD3⁺CD4⁺CD25⁻ клеток (правый нижний квадрант).

Фиг.5. Гистограмма распределения лимфоцитов, меченных Anti-CD45R0-PE, по интенсивности SSC и флуоресценции по второму каналу FL2. Оценивается содержание лимфоцитов, экспрессирующих CD45R0.

Табл.1. Коэффициенты линейных дискриминантных функций.

Табл.2. Классификационная матрица результатов дискриминантного анализа.

Табл. 1		
Коэффициенты линейных дискриминантных функций (F(4,25)=4,50; p<0,0071)		
Показатели	Коэффициенты b _{ji}	
	d ₁ (группа ЛЧТБ)	d ₂ (группа МЛУ ТБ)
Константа, b _{j,0}	-14,0015	-22,6954
Показатели, x _i		
CD45R0 ⁺ , %	-0,0626	-0,1710
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁻ : Th, %	0,5181	0,6689
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ^{hi} , %	2,4285	3,1202
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁻ , %	0,2255	0,3229

Табл. 2			
Классификационная матрица результатов дискриминантного анализа			
Вариант течения туберкулеза легких	Прогноз варианта течения туберкулеза легких по использованной модели		% правильного прогноза
	ЛЧ ТБ	МЛУ ТБ	
ЛЧ ТБ	15	3	83,3
МЛУ ТБ	2	10	83,3
Всего	17	13	83,3

Источники информации

1. Комиссарова О.Г. Особенности течения процесса и эффективность лечения у больных лекарственно-устойчивым туберкулезом легких при различной интенсивности синдрома системного воспалительного ответа: Дис. ... докт. мед. наук. Москва, 2011. 290 с.

2. Маркелов Ю.М., Нарвская О.В. Циркуляция штаммов возбудителя туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью на территории республики Карелия // Туберкулез и болезни легких. 2010. Т.87, №2. С.54-57.

3. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М.: МедиаСфера, 2002. 312 с.

4. Фрейдлин И.С. Взаимосвязи врожденного и приобретенного иммунитета при инфекциях (ревизия классических догм) // Инфекция и иммунитет. 2011. Т.1, №3. С.199-206.

5. Фтизиатрия: Национальное руководство / под ред. М.И. Перельмана. М.: ГЭОТАР - Медиа, 2007. 512 с.

6. Юнкеров В.И., Григорьев С.Г. Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований. СПб.: ВМедА, 2002. 266 с.

7. Патент RU №2361212 «Способ прогнозирования течения туберкулеза легких с

- множественной лекарственной устойчивостью у впервые выявленных больных», Н.А. Земляная, О.В. Филинюк, А.К. Стрелис, О.И. Уразова, Л.Н. Буйнова, О.В. Воронкова
8. Заявка RU №2006136046/15 «Способ прогнозирования течения туберкулеза легких». Л.В. Бурухина, И.В. Перминова, М.С. Ждакаев, А.А. Шурыгин
9. Патент RU №2434582 «Способ прогнозирования развития лекарственно-устойчивого туберкулеза легких». Е.Н. Стрельцова, Н.А. Степанова, С.А. Голубкина, опубликован 27.11.2011 (прототип).
10. Caminero J.A. Multidrug-resistant tuberculosis: epidemiology, risk factors and case finding // Intern. J. Tuberc. Lung Dis. 2010. V.14, No.4. P.382-390.
11. Do adaptive immune cells suppress or activate innate immunity? / J. Zhao, X. Yang, S. Aux [et al.] // Trends Immunol. 2008. V.30, No.1. P.8-12.
12. Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response // WHO global report, 2010. 71 p.
13. Treatment outcome and mortality among patients with multidrug-resistant tuberculosis in tuberculosis hospitals of the public sector / D.S. Jeon, D.O. Shin, S.K. Park [et al.] // J. Korean Med. Sci. 2011. V.26, No.1. P.33-41.

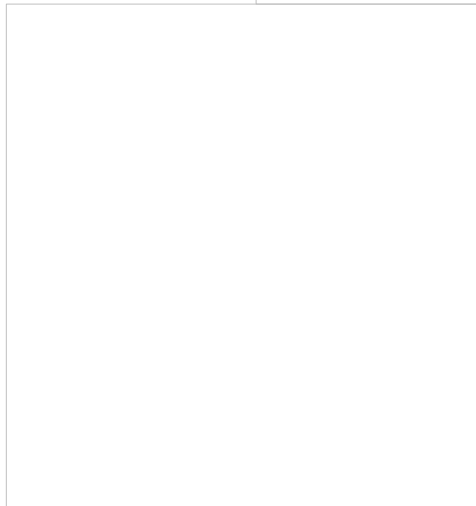
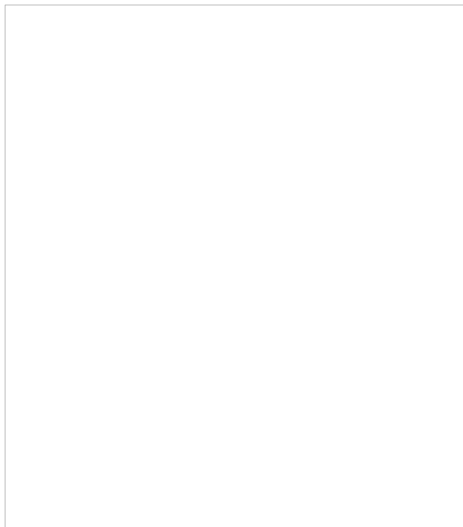
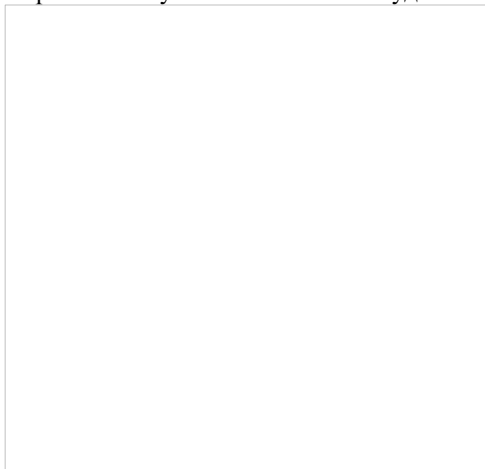
Формула изобретения

Способ прогнозирования множественной лекарственной устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* у больных с впервые выявленным туберкулезом легких, заключающийся в исследовании пациента до начала проведения специфической химиотерапии противотуберкулезными препаратами, отличающийся тем, что определяют содержание в крови $CD45R0^+$ Т-клеток памяти, $CD3^+CD4^+CD25^{hi}$ и $CD4^+CD25^+Foxp3^-$ регуляторных Т-клеток, $CD3^+CD4^+CD25^-$ Т-хелперов вычисляют значения линейных классификационных функций по уравнениям

$$d_1 = -14,0015 - 0,0626 \cdot x_1 + 0,5181 \cdot x_2 + 2,4285 \cdot x_3 + 0,2255 \cdot x_4,$$

$$d_2 = -22,6954 - 0,1710 \cdot x_1 + 0,6689 \cdot x_2 + 3,1202 \cdot x_3 + 0,3229 \cdot x_4,$$

где x_1, x_2, x_3, x_4 - количество субпопуляций $CD45R0^+$ Т-клеток памяти, $CD3^+CD4^+CD25^{hi}$ и $CD4^+CD25^+Foxp3^-$ регуляторных Т-клеток, $CD3^+CD4^+CD25^-$ Т-хелперов, соответственно, и при $d_1 < d_2$ прогнозируют туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя.



Увеличенное изображение (открывается в отдельном окне)



ИЗВЕЩЕНИЯ

ММ4А Досрочное прекращение действия патента из-за неуплаты в установленный срок пошлины за поддержание патента в силе

Дата прекращения действия патента: 11.08.2014

Дата публикации: [20.06.2015](#)