



(19) KG (11) 943 (13) C1 (46) 30.04.2007

ГОСУДАРСТВЕННАЯ ПАТЕНТНАЯ СЛУЖБА  
КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ (КЫРГЫЗПАТЕНТ)(51) A61B 10/00 (2006.01)  
G01N 33/53 (2006.01)

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

к патенту Кыргызской Республики под ответственность заявителя (владельца)

(19) KG (11) 943 (13) C1 (46) 30.04.2007

(21) 20040046.1

(22) 04.05.2004

(46) 30.04.2007, Бюл. №4

(76) Тарасенко О.М., Китаев М.И., Алишеров А.Ш., Разорилова С.П. (KG)

(56) Патент KG №562, кл. A61B 10/00; G01N 33/53, 2003

### (54) Способ прогнозирования течения хронического деструктивного туберкулеза в кыргызской популяции

(57) Изобретение относится к медицине, а именно иммуногенетике, и может использоваться для диагностики течения хронического деструктивного туберкулеза в кыргызской популяции. Задачей изобретения является дальнейшее расширение возможностей способа диагностики, а именно достижение возможности прогнозирования генетической детерминированности хронического туберкулеза в кыргызской популяции. Задача решается в способе прогнозирования течения хронического деструктивного туберкулеза легких в кыргызской популяции, заключающемся в выявлении в крови антигенов и осуществлении прогноза, причем выявляют TNF- $\alpha$  C<sub>857</sub>C/T и TNF- $\alpha$  1031T/ -863C - 857C/ - 308G, TNF- $\alpha$  1031T/ -863C - 857C/ - 308A гаплотипов и на основе одиночного нуклеотидного многообразия (Single Nucleotide Polymorphism) и прогнозируют благоприятное течение деструктивных процессов у пациентов при уменьшении частоты всего комплекса антигенов. 3 пр, 2 табл., 2 ил.

Изобретение относится к медицине, а именно иммуногенетике, и может использоваться для диагностики течения хронического деструктивного туберкулеза в кыргызской популяции.

Известен способ диагностики активности туберкулеза органов дыхания по патенту RU №2219547, кл. G01N 33/48, 33/49, 2003, заключающийся в клиническом и лабораторном исследованиях с проведением сонолюминисцентного анализа плазмы крови, по результатам определяют коэффициент свечения плазмы и при значениях выше определенного исключают активность.

Способ достаточно прост, но достоверность диагностики недостаточна.

Известен способ прогнозирования предрасположенности к туберкулезу в кыргызской популяции, включающий выявление антигенов HLA-DR2, DR7, BW62(15), BW53 и по изменению частоты всего комплекса антигенов осуществляют прогноз (патент KG №562, кл. A61B 10/00; G01N 33/53, 2003).

Недостатком способа является недостаточно широкие возможности.

Задачей изобретения является дальнейшее расширение возможностей способа диагностики, а именно достижение возможности прогнозирования генетической детерминированности хронического туберкулеза в кыргызской популяции.

Задача решается в способе прогнозирования течения хронического деструктивного туберкулеза легких в кыргызской популяции, заключающемся в выявлении в крови антигенов и осуществлении прогноза, причем выявляют TNF- $\alpha$ -C<sub>857</sub>C/T и TNF- $\alpha$  1031T/ -863C - 857C/ - 308G, TNF- $\alpha$

<sup>1031</sup>T/ <sup>-863</sup>C / <sup>-857</sup>C / <sup>-308</sup>A гаплотипов на основе одиночного нуклеотидного многообразия (Single Nucleotide Polymorphism) и прогнозируют благоприятное течение деструктивных процессов у пациентов при уменьшении частоты всего комплекса антигенов.

Предложенный способ осуществляется следующим образом.

У пациентов производят забор венозной крови, из лимфоцитов периферической крови выделяют ДНК, используя коммерческий набор QIAamp (Qiagen, Hilden, Germany) согласно инструкции производителя. Типирование TNF- $\alpha$  производят на основе *Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)* технологии. Инструмент оснащен стеклянными капиллярами и флюорофором. Полимерную цепную реакцию "Polymerase Chain Reaction" (PCR) обеспечивают лимитированным временным удлинением, что позволяет осуществлять PCR "real-time" внутри капилляра во время реакции. "Real-Time" основан на генерировании флюoresценции детекции во время PCR. PCR-амплификацию определяют увеличением сигнала флюoresценции во время каждого цикла. Кривые экземпляров сопоставляют с контрольной калибрационной кривой. Для TNF- $\alpha$ -308-генотипирования применяют праймеры

5'-GAGTCTCCGGGTAGAATGA-3', 5'-TCTCGGTTCTTCTCCATCG-3', а для TNF- $\alpha$ -1031/-863/-857:

5'-TGGACTCACCAGGTGAGGCC-3', 5'-TCACTCCCTGGGCCCTCTA-3' и пробы TNF- $\alpha$  - 308G-FITC, TNF- $\alpha$  -308G-LC, TNF- $\alpha$ -863-FITC, TNF- $\alpha$ -863A-LC, TNF- $\alpha$ -863C-LC, TNF- $\alpha$ -1031T-FITC, TNF- $\alpha$ -1031T-LC. Две различные LCRed-пробы используют для определения аллелей, образованных -863 и -857 SNP. TNF- $\alpha$  -863C-LC применяют для CC/CC, CC/CT и CT/CT-генотипирования, и TNF- $\alpha$  -863A-LC применяют для диагностики других комбинаций генотипов. Концентрация праймеров, флюoresцентных проб, LCRed- проб и MgCl<sub>2</sub> растворов была 0.5 $\mu$ l, 0.2 $\mu$ l и 4 $\mu$ l, соответственно. PCR-амплификацию осуществляют путем 50 циклов денатурирования (95 °C для 0 сек), аннелинг при температуре 60°C для TNF- $\alpha$  -308, и 59 °C для TNF- $\alpha$  -1031, -863, -857, соответственно. Уровень температуры перехода был установлен 20°C/ сек. Генотипы определялись на основе "melting-curve"-анализа. Частоту аллелей определяли путем прямого подсчета на основе генотипических данных.

При анализе полученных данных используют генетико-статистические методы обработки материала. Для статистического анализа применяли  $\chi^2$  тест с Yates-коррекцией. Частоту гаплотипов (HF) и параметры неравновесного сцепления (LD) определяли на основе результатов типирования, используя статистическую программу, представленную 11<sup>th</sup> International Histocompatibility. Степень относительного риска (RR- relative risk) или предрасположенность к туберкулезу у носителей соответствующего антигена TNF- $\alpha$  (RR) определяли по формуле:

$$RR = \frac{acd}{cxb},$$

где  $a, b, c, d$  – значение альтернативных признаков в полях четырехпольной таблицы "2 x 2":

	Антиген	
	+	-
больные	$a$	$b$
здоровые	$c$	$d$

$a$  – число больных – носителей антигена;

$b$  – число больных – не несущих антигена;

$c$  – число здоровых людей – носителей антигена;

$d$  – число здоровых людей – не несущих антигена.

RR показывает во сколько раз чаще развивается заболевание у тех, кто имеет соответствующий антиген TNF- $\alpha$  по сравнению с теми, у кого он отсутствует. Величина RR >1 означает, что антиген встречается чаще у больных (положительная ассоциация). Показатели относительного риска считают значимыми в клиническом плане при величине более 2. Величина RR <1 означает, что антиген встречается чаще у здоровых (отрицательная ассоциация) и способствует развитию защиты.

Изучаемая популяция включала пациентов больных хроническим туберкулезом с деструкцией и без, находящихся на лечении в Кыргызском научно-исследовательском институте

туберкулеза. Диагноз был поставлен на основе клинических и лабораторных данных. Данные генотипирования сопоставлялись с контрольной группой туберкулезных больных с деструкцией и здоровыми донорами крови. Здоровые доноры крови подходящие по возрасту и полу изучаемой популяции больных, были отобраны на базе Центральной станции переливания крови. Национальность пациентов и здоровых доноров крови определялась на основе паспортных данных.

В НИИ туберкулеза обратились два больных (пример 1 и 2), а пациент (пример 3) находился на лечении в НИИ туберкулеза с диагнозом хронический деструктивный туберкулез.

**Пример 1.**

В ходе обследования было установлено наличие следующих жалоб: кашель с выделением мокроты с кровью, потливость, температура, похудание, головная боль и боль при дыхании. В ходе микроскопического исследования было обнаружено наличие туберкулезной палочки, на рентгене установлено изменение легочной картины.

В анамнезе отец болел туберкулезом.

Определили TNF- $\alpha$  -857C/C ген и дополнительно к нему TNF- $\alpha$  -1031C/ - 863C/ - 857T/ -308G; TNF- $\alpha$  -1031C/ - 863C/ - 857T/ -308A гаплотип, согласно изобретению.

Заключение: базируясь на основе клинических и лабораторных данных, был поставлен диагноз: прогрессирование заболевания и переход в хроническую деструктивную форму.

**Пример 2.**

В ходе обследования было установлено наличие следующих жалоб: кашель с кровью, потливость, температура, похудание, головная боль и боль при дыхании. В ходе микроскопического исследования было обнаружено наличие туберкулезной палочки, на рентгене установлено изменение легочной картины. В анамнезе брат больного полгода назад заболел туберкулезом. Родители констатируют необходимость проведения анализа, базируясь на основе генетической предрасположенности к легочным заболеваниям.

Обследован TNF- $\alpha$  -857 C/C-ген и дополнительно к нему TNF- $\alpha$  -1031C/ - 863C/ - 857T/ -308G; TNF- $\alpha$  -1031 C/ - 863C/ - 857T/ -308A гаплотип.

Заключение: базируясь на основе клинических и лабораторных данных, согласно изобретению, был поставлен диагноз: прогрессирование заболевания и переход в хроническую деструктивную форму.

**Пример 3.**

У пациента, находящегося на лечении в НИИ туберкулеза, стали постепенно нормализоваться лабораторные показатели крови, мокроты, изменилась легочная картина. Исчезли жалобы, беспокоящие ранее, такие как кашель с выделением кровяной мокроты, потливость, температура, похудание, головная боль и боль при дыхании. Микроскопический анализ подтвердил отсутствие туберкулезной палочки. В ходе иммуногенетического анализа было установлено наличие предрасполагающих генетических факторов.

Исследовали TNF- $\alpha$  -857C/C ген и дополнительно к нему TNF- $\alpha$  -1031C/ - 863C/ - 857T/ -308G; TNF- $\alpha$  -1031 C/ - 863 C/ - 857 T/ -308A гаплотип.

Заключение: базируясь на основе клинических и лабораторных данных, был поставлен диагноз: выздоровление.

### **Формула изобретения**

Способ прогнозирования течения хронического деструктивного туберкулеза легких в кыргызской популяции, заключающийся в том, что в крови выявляют антигены и осуществляют прогноз, отличающийся тем, что выявляют TNF- $\alpha$  C<sub>857</sub>C/T и TNF- $\alpha$  <sub>1031</sub>T/ -863C - 857C/ - 308G, TNF- $\alpha$  <sub>1031</sub>T/ -863C - 857C/ - 308A гаплотипов на основе одиночного нуклеотидного многообразия (Single Nucleotide Polymorphism) и прогнозируют благоприятное течение деструктивных процессов у пациентов при уменьшении частоты всего комплекса антигенов.

Таблица 1

Сравнение частоты аллелей и генотипов TNF- $\alpha$  у пациентов, больных

хроническим туберкулезом легких с деструкцией (+) и без деструкции (-)

TNF- $\alpha$ Transcrip- tional site	Аллель/ генотип	Деструкция (+), %	Де- струкция (-), %	$\chi^2$	RR	95% CI <sup>a</sup>	p <sup>b</sup>
1	2	3	4	5	6	7	8
-1031	Аллель T C	70.0 (63) 30.0 (27)	77.2 (34) 22.7 (10)				
	Генотип T/T T/C C/C	48.8 (22) 42.2 (19) 8.8 (4)	63.6 (14) 27.2 (6) 9.0 (2)				
-863	Аллель C A	81.1 (73) 18.8 (17)	86.3 (38) 13.6 (6)				
	Генотип C/C C/A A/A	68.8 (31) 24.4 (11) 6.6 (3)	77.2 (17) 18.0 (4) 4.5 (1)				

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7	8
-857	Аллель C T	88.8 (80) 11.1 (10)	84.0 (37) 15.9 (7)				
	Генотип C/C C/T T/T	80.0 (36) 17.7 (8) 2.2 (1)	81.8 (18) 4.5 (1) 13.6 (3)	4.18	0.12	0.01-0.01	0.04
	Аллель G A	85.5 (77) 14.4 (13)	90.9 (40) 9.0 (4)				
	Генотип G/G G/A A/A	71.1 (32) 28.8 (13) —	81.8 (18) 18.0 (4) —				
-308	Аллель G A	85.5 (77) 14.4 (13)	90.9 (40) 9.0 (4)				
	Генотип G/G G/A A/A	71.1 (32) 28.8 (13)	81.8 (18) 18.0 (4)				

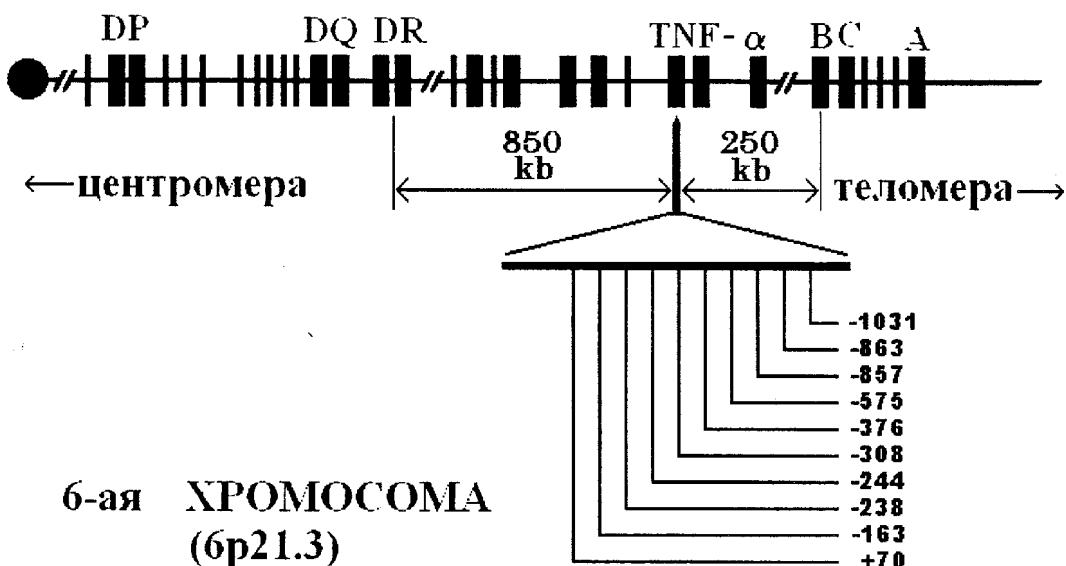
<sup>a</sup>CI = конфиденциальный интервал; <sup>b</sup>p – рассчитывался, используя  $\chi^2$  тест 2x2 (для сравнения аллелей) и 2x3 (для сравнения частоты генотипов).

Таблица 2

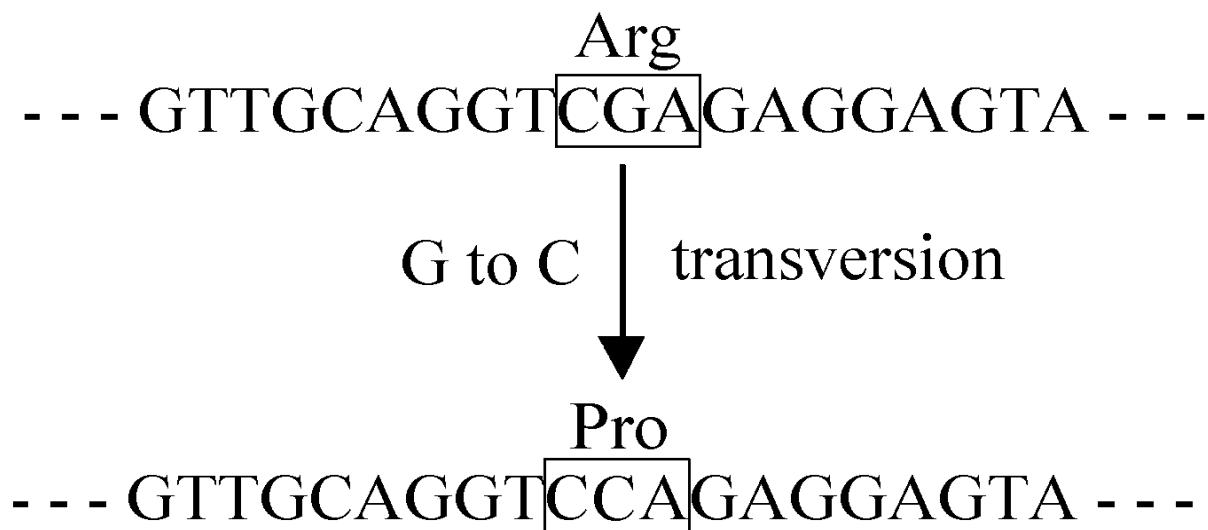
TNF- $\alpha$  неравновесное сцепление у пациентов, больных хроническим туберкулезом легких с деструкцией (+) и без деструкции (-)

Гаплотип	Контроль		Деструкция (+)		Деструкция (-)	
	HF	LD	HF	LD	HF	LD
TNF- $\alpha$ -1031/ -863/ -857/ -308	43.1	-5.2	—	—	42.9	-3.1
T-C-C-G	15.5	6.3	—	—	9.0	3.1

\*Частота гаплотипов более 2% представлена.



Фиг. 1. Локализация и полиморфизм TNF- $\alpha$ -региона



Фиг. 2. Single nucleotide polymorphisms (SNP)

SNP – это одиночная пара нуклеотид в определенном сегменте ДНК. В результате мутации гуанин (G) на цитозин (C) произошло изменение аминокислоты аргинин в пролин.

Составитель описания Усубакунова З.К.

Ответственный за выпуск Арипов С.К.