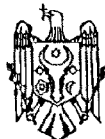




MD 1014 Z 2016.10.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **1014** (13) **Z**
(51) Int.Cl: *A61B 10/00* (2006.01)
G01N 33/48 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ**

(21) Nr. depozit: s 2015 0071 (22) Data depozit: 2015.05.28	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2016.03.31, BOPI nr. 3/2016
(71) Solicitant: IMSP INSTITUTUL DE FTIZIOPNEUMOLOGIE "CHIRIL DRAGANIUC", MD (72) Inventatori: GHINDA Serghei, MD; ABABII Ion, MD; DANILOV Lucian, MD; CULICIȚCHII Stela, MD; LESNIC Evelina, MD; GUILA Angela, MD (73) Titular: IMSP INSTITUTUL DE FTIZIOPNEUMOLOGIE "CHIRIL DRAGANIUC", MD	

(54) **Metodă de diagnostic diferențiat al intoxicației endogene, cauzată de streptococul β -hemolitic sau de micobacteria tuberculozei la diferite grupuri de vârstă**

(57) Rezumat:

1

Invenția se referă la medicină, în special la imunologie și poate fi utilizată pentru diagnosticul diferențiat al intoxicației endogene, cauzată de streptococul β -hemolitic sau de micobacteria tuberculozei la diferite grupuri de vârstă.

Conform invenției, metoda constă în aceea că se prepară o suspensie de leucocite prelevate de la pacient, se determină cantitatea finală a biomarkerului TNF- α conform formulei revendicate și în cazul în care la copii de până la 18 ani pentru TNF- α final se determină valori cuprinse în intervalul 2,0...2,07 se diagnostichează o intoxicație

2

endogenă cauzată de streptococul β -hemolitic, iar în cazul în care valorile sunt mai mari de 2,08 se diagnostichează o intoxicație endogenă cauzată de micobacteria tuberculozei, în cazul când la maturi de peste 18 ani pentru TNF- α final se determină valori cuprinse în intervalul 6,55...6,87 se diagnostichează o intoxicație endogenă cauzată de streptococul β -hemolitic, iar când se obțin valori mai mari de 6,88 se diagnostichează o intoxicație endogenă cauzată de micobacteria tuberculozei.

Revendicări: 1

MD 1014 Z 2016.10.31

(54) Method for differential diagnosis of endogenous intoxication caused by β -hemolytic streptococcus or tuberculosis mycobacterium in different age groups

(57) Abstract:

1

The invention relates to medicine, in particular to immunology, and can be used for differential diagnosis of endogenous intoxication caused by β -hemolytic streptococcus or tuberculosis mycobacterium in different age groups.

According to the invention, the method consists in that is prepared a suspension from leukocytes taken from the patient, is determined the final content of TNF- α biomarker according to the claimed formula and in the case when in children under 18 years for the final TNF- α are determined values in the range 2.0...2.07 is diagnosed the

2

endogenous intoxication caused by β -hemolytic streptococcus, and in the case when the values are greater than 2.08 is diagnosed the endogenous intoxication caused by tuberculosis mycobacterium, in the case when in adults over 18 years for the final TNF- α are determined values in the range 6.55...6.87 is diagnosed the endogenous intoxication caused by β -hemolytic streptococcus, and when are determined values greater than 6.88 is diagnosed the endogenous intoxication caused by tuberculosis mycobacterium.

Claims: 1

(54) Метод дифференциальной диагностики эндогенной интоксикации вызванной β -гемолитическим стрептококком или микобактерией туберкулёза в разных возрастных группах

(57) Реферат:

1

Изобретение относится к медицине, в частности к иммунологии и может быть использовано для дифференциальной диагностики эндогенной интоксикации вызванной β -гемолитическим стрептококком или микобактерией туберкулёза в разных возрастных группах.

Согласно изобретению, метод состоит в том что готовят суспензию из лейкоцитов взятых от пациента, определяют финальное содержание биомаркёра TNF- α согласно заявленной формуле и в случае когда у детей до 18 лет для финального TNF- α определяют значения в интервале 2,0...2,07 диагностируют эндогенную интоксикацию

2

вызванную β -гемолитическим стрептококком, а в случае когда значения выше 2,08 диагностируют эндогенную интоксикацию вызванную микобактерией туберкулёза, в случае когда у взрослых старше 18 лет для финального TNF- α определяют значения в интервале 6,55...6,87 диагностируют эндогенную интоксикацию вызванную β -гемолитическим стрептококком, а когда определяют значения выше 6,88 диагностируют эндогенную интоксикацию вызванную микобактерией туберкулёза.

П. формулы: 1

Descriere:

Invenția se referă la medicină, în special la imunologie și poate fi utilizată pentru diagnosticul diferențiat al intoxicației endogene cauzate de streptococul β-hemolitic sau de micobacteria tuberculozei la diferite grupuri de vârstă.

În calitate de cea mai apropiată soluție este cunoscută metoda de determinare a intoxicației endogene, care constă în determinarea indicelui leucocitar al intoxicației (ILI), propusă de [Kalf-Khalif, 1941]. Metoda este bazată pe cuantificarea diferitor grupări celulare din șirul leucocitar sangvin, iar ILI se determină în baza relației:

$$ILI = \frac{(4MIE + 3T + 2N + 1S) \cdot (CP + 1)}{(M + L) \cdot (E + 1)},$$

unde: MIE – mielocite, T – tinere, N – neutrofile nesegmentate, S – neutrofile segmentate, CP – celule plasmatiche, M – monocite, L – limfocite, E – eozinofile.

În normă acest indice constituie 0,3...1,5 unități.

În procesele inflamatorii, indicele leucocitar al intoxicației este crescut. Creșterea nivelului ILI până la 4...9 indică asupra componentei bacteriene ponderabile a intoxicației endogene. Creșterea ILI este determinată de dispariția eozinofilelor, mărirea conținutului de componente leucocitare segmentate, celule plasmatiche și micșorarea numărului de limfocite. Indicele leucocitar al intoxicației Kalf-Khalif ia în calcul un șir de caracteristici bazate pe apartenența funcțională a diferitor grupuri celulare incluse în formula leucocitară. ILI este un indice simplu, accesibil și destul de informativ cu privire la gravitatea intoxicației endogene, utilizat în practica clinică [1].

Dezavantajul metodei descrise constă în aceea că exactitatea ei scade semnificativ odată cu progresarea intoxicației endogene care este însoțită de suprimarea mecanismelor de protecție imună și formarea semnelor de insuficiență organică. De asemenea, drept neajuns al metodei poate fi considerat și faptul că odată cu apariția la bolnavi a semnelor de alergizare (conținut înalt de eozinofile), formula de calcul al ILI nu funcționează, deci nu poate fi aplicată, totodată nu se determină specificul intoxicației endogene și nu poate fi făcut un diagnostic diferențiat.

Problema pe care o rezolvă invenția propusă constă în elaborarea unei metode de determinare a specificității intoxicației endogene care ar fi eficientă la pacienții cu niveluri înalte ale eozinofilelor la diferite grupuri de vârstă și ar putea fi utilizată pe larg în practica de laborator.

Metoda, conform invenției, înlătură dezavantajele menționate mai sus prin aceea că se prepară o suspensie de leucocite prelevate de la pacient, se determină cantitatea finală a biomarkerului TNF-α conform formulei:

$$TNF-\alpha \text{ final} = \frac{TNF-\alpha \text{ în eprubetă, pg/ml}}{\text{Cantitatea totală a celulelor, unități}} \times 10000,$$

în cazul în care la copii de până la 18 ani pentru TNF-α final se determină valori cuprinse în intervalul 2,0...2,07 se diagnostichează o intoxicație endogenă cauzată de streptococul β-hemolitic, iar în cazul în care valorile sunt mai mari de 2,08 se diagnostichează o intoxicație endogenă cauzată de micobacteria tuberculozei, în cazul când la maturi de peste 18 ani pentru TNF-α final se determină valori cuprinse în intervalul 6,55...6,87 se diagnostichează o intoxicație endogenă cauzată de streptococul β-hemolitic, iar când se obțin valori mai mari de 6,88 se diagnostichează o intoxicație endogenă cauzată de micobacteria tuberculozei.

Rezultatul invenției constă în crearea unei metode de determinare a specificității intoxicației endogene eficiente la pacienții cu niveluri înalte ale eozinofilelor la diferite grupuri de vârstă care ar putea fi utilizată pe larg în practica de laborator.

Intoxicația endogenă este un sindrom polietologic și polipatogen caracterizat prin acumularea în țesuturi și lichidele biologice a substanțelor endogene toxice.

Printre sursele de endotoxine pot fi nominalizate:

- produsele dezintegrării celulare, improprii sistemului imunitar, antigenii și complexe agresoare imune;

- toxinele microbiene (exo- și endotoxinele) și alți factori ai patogenității microorganismelor (patogene, condiționat patogene, nepatogene);

5 - mediatorii inflamației, citokinele, prostaglandinele, leucotrienele, proteinele fazei acute ș.a. compuși biologic activi.

Unul dintre mediatorii endogeni de bază ai inflamației și posibil unul dintre agenții universali implicați în realizarea sindromului intoxicației endogene este factorul de necroză tumorală, exprimat prin cele două forme ale sale - TNF- α și
10 TNF- β . Este capabil să inducă *in vivo* necroza hemoragică a unor celule tumorale, fără a afecta celulele normale. Pe lângă aceasta, induce șocul dacă elaborarea lui este condiționată de endotoxinele bacteriene.

În condiții normale factorul de necroză tumorală este elaborat de către multe tipuri de celule (fagocitele mononucleare, limfocitele B, limfocitele T, celulele NK
15 (natural killer), leucocitele polimorfonucleare, mastocite și bazofile, celulele endoteliului vaselor).

Titurile sale cresc la infectare, când în organism pătrund endotoxinele bacteriene. Concentrațiile înalte, determinate în caz de sepsis gram-negativ, reprezintă cauza principală a instalării șocului septic.

20 Din aceste considerente, TNF- α a fost selectat în calitate de marker biologic al intoxicației endogene.

Avantajele metodei revendicate constau în:

- determinarea specificității intoxicației endogene, care este imposibilă în cazul aplicării celei mai apropiate metode;

25 - aplicarea metodei revendicate permite a efectua analiza diferențiată între etiologia streptococică și cea tuberculoasă a intoxicației endogene;

- metoda propusă a identificat intoxicația endogenă specifică de 22 ori mai frecvent la copiii cu tuberculoză și de 2 ori mai frecvent la maturii cu tuberculoză la antigenii micobacteriei tuberculoase, comparativ cu aplicarea indicelui
30 leucocitar al intoxicației Kalf-Khalif;

- exprimarea producției induse de TNF- α în pg/ml/10000 celule permite obținerea unor rezultate precise indiferent de cantitatea de celule izolate la un bolnav sau altul, sau de pierderile de celule la procedura de spălare.

Exemplu concret de realizare a invenției

35 Metoda revendicată constă din următoarele etape: izolarea celulelor, cultivarea și determinarea cantității biomarkerului TNF- α .

Etapa 1. Într-o eprubetă sterilă se prelevă sânge din vena cubitală în volum de 3,0 ml. În prealabil, în eprubetă se toarnă soluție de heparină pe mediul 199, reieșind din calculul 25 UN la 1,0 ml sânge. Se prepară amestecul pentru
40 sedimentarea sângelui (3 părți mediu 199 și 1 parte gelatină 10%) în volum de 3,0 ml. Sângele și amestecul pentru sedimentare se amestecă și se plasează într-un termostat pentru 30 min la 37°C în poziție verticală pentru sedimentarea eritrocitelor. După care, supernatantul ce conține suspensia celulară leucocitară se colectează într-o eprubetă curată și se centrifughează timp de 10 min la o forță
45 relativă de centrifugare (RCF) de 175 RCF. După aceasta supernatantul se aruncă, iar celulele rămase se resuspendă în 3,0 ml mediu 199. Într-o eprubetă curată se toarnă câte 1,0 ml suspensie celulară și se adaugă câte 2,0 ml mediu 199. În eprubetă se numără celulele după metoda standard utilizând camera Goreaev. În acest timp are loc o producere spontană de TNF- α .

50 Etapa 2. Cultura obținută în etapa 1 se plasează în termostat la o temperatură de 35°...37°C și se incubează timp de 48 ore.

Etapa 3. Cultura de celule se resuspendă în mediul pentru creștere și se centrifughează timp de 10 min la 175 RCF. După care, se prelevă supernatantul și prin metoda de analiză imunoenzimatică standard se determină titrul TNF- α .
55 Pentru determinarea TNF- α în metoda propusă s-a utilizat kit-ul de reactivi ai firmei "Бектрон-БЕКТ" (Federația Rusă).

Dat fiind că la fiecare dintre bolnavi se izolează o cantitate diferită de celule producătoare de TNF- α , pentru alinierea datelor obținute rezultatul final al producției de TNF- α final se calculează în baza formulei:

$$\text{TNF-}\alpha \text{ final} = \frac{\text{TNF-}\alpha \text{ în eprubetă, pg/ml}}{\text{Cantitatea totală a celulelor, unități}} \times 10000,$$

5 și se exprimă în pg/ml/10000 celule.

Exemplul 1

Bolnavul A., 4 ani, diagnosticul – tonsilită cronică decompensată.

10 În eprubeta după incubare s-a determinat cantitatea TNF- α care a constituit 9,9 pg/ml, iar cantitatea totală a celulelor în eprubetă a constituit 48231 unități, respectiv rezultatul final al producției de TNF- α calculat este:

$$\text{TNF} - \alpha \text{ final} = \frac{9,9}{48231} \times 10000 = 2,05 \text{ pg/ml.}$$

În cazul dat se diagnostichează o intoxicație endogenă cauzată de streptococul β -hemolitic.

Exemplul 2

15 Bolnavul B., 7 ani, diagnosticul – tonsilită cronică compensată.

În eprubeta după incubare s-a determinat cantitatea TNF- α care a constituit 15,6 pg/ml, iar cantitatea totală a celulelor în eprubetă a constituit 56486 unități, respectiv rezultatul final al producției de TNF- α calculat este:

$$\text{TNF} - \alpha \text{ final} = \frac{15,6}{56486} \times 10000 = 2,76 \text{ pg/ml.}$$

20 În cazul dat se diagnostichează o intoxicație endogenă cauzată de micobacteria tuberculozei.

Exemplul 3

Bolnavul B., 19 ani, diagnosticul – tonsilită cronică compensată.

25 În eprubeta după incubare s-a determinat cantitatea TNF- α care a constituit 39,2 pg/ml, iar cantitatea totală a celulelor în eprubetă a constituit 54682 unități, respectiv rezultatul final al producției de TNF- α calculat este:

$$\text{TNF} - \alpha \text{ final} = \frac{39,2}{54682} \times 10000 = 7,16 \text{ pg/ml.}$$

În cazul dat se diagnostichează o intoxicație endogenă cauzată de micobacteria tuberculozei.

30

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Кальф-Калиф Я.Я. О лейкоцитарном индексе интоксикации и его практическом значении. Врачебное дело, 1941, N. 1, с. 31-35

(57) Revendicări:

Metodă de diagnostic diferențiat al intoxicației endogene, cauzată de streptococul β -hemolitic sau de micobacteria tuberculozei la diferite grupuri de vârstă care constă în aceea că se prepară o suspensie de leucocite prelevate de la pacient, se determină cantitatea finală a biomarkerului TNF- α conform formulei:

$$\text{TNF-}\alpha \text{ final} = \frac{\text{TNF-}\alpha \text{ în eprubetă, pg/ml}}{\text{Cantitatea totală a celulelor, unități}} \times 10000, \quad \text{în}$$

cazul în care la copii de până la 18 ani pentru TNF- α final se determină valori cuprinse în intervalul 2,0...2,07 se diagnostichează o intoxicație endogenă cauzată de streptococul β -hemolitic, iar în cazul în care valorile sunt mai mari de 2,08 se diagnostichează o intoxicație endogenă cauzată de micobacteria tuberculozei, în cazul când la maturi de peste 18 ani pentru TNF- α final se determină valori cuprinse în intervalul 6,55...6,87 se diagnostichează o intoxicație endogenă cauzată de streptococul β -hemolitic, iar când se obțin valori mai mari de 6,88 se diagnostichează o intoxicație endogenă cauzată de micobacteria tuberculozei.

Șef adjunct Direcție Brevete:

IUSTIN Viorel

Șef Secție Examinare:

LEVIȚCHI Svetlana

Examinator:

GHÎȚU Irina

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii

(21) Nr. depozit: s 2015 0071

(22) Data depozit: 2015.05.28

(71) Solicitant: **IMSP INSTITUTUL DE FTIZIOPNEUMOLOGIE "CHIRIL DRAGANIUC", MD**

(54) **Titlul: Metodă de diagnostic diferențiat al intoxicației endogene provocată de streptococul beta-hemolitic sau de micobacteria tuberculozei la diferite grupuri de vârstă**

II. Clasificarea obiectului invenției:

(51) **Int.Cl: A61B 10/00 (2006.01)**

III. Colecții și Baze de date de brevete cercetate (denumirea, termeni caracteristici, ecuații de căutare reprezentative)

MD - Intern « Documentare Invenții » (inclusiv cereri nepublicate; trunchiere automată stanga/dreapta): “indice leucocitar”, “intoxicație endogenă+streptococ”, “intoxicație endogenă+micobacterii”, ”G01N 33/48”

Int.Cl: A61B 10/00 (2006.01), G01N 33/48 (2006.01)

EA, CIS (Eapatis): ”лейкоцитарный индекс”, ”эндогенная интоксикация+стрептококк”, ”эндогенная интоксикация+микобактерии”, ”G01N 33/48”

Int.Cl: A61B 10/00 (2006.01), G01N 33/48 (2006.01)

SU (nonpublic): ”лейкоцитарный индекс”, ”эндогенная интоксикация+стрептококк”, ”эндогенная интоксикация+микобактерии”, ”G01N 33/48”

Int.Cl: A61B 10/00 (2006.01), G01N 33/48 (2006.01)

IV. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate

<http://cyberleninka.ru/article/n/leykotsitarnyy-indeks-intoksikatsii-lii-kak-pokazatel-intensivnosti-infektsionnogo-protssessa-u-beremennyh>

<http://urgent.com.ua/ru-issue-article-293>

<http://dspace.nbuv.gov.ua/bitstream/handle/123456789/30561/13-Oleynik.pdf?sequence=1>

<http://www.medlinks.ru/article.php?sid=22330>

<http://usmf.md/premii-pentru-usmf-nicolae-testemitanu-la-salonul-international-inventica-2014/>

http://www.serm.md/congres2014/Arta_Medica_Congres_SERM.pdf

Островский, В.К. Лейкоцитарный индекс интоксикации при острых гнойных и воспалительных заболеваниях легких / В.К.Островский, Ю.М.Свитич, В.Р.Вебер // Вестн. хирургии. – 1983. - № 131. – С. 21 – 24.

Писарев, В.Ю. Лейкоцитарный индекс интоксикации при различных видах тонзиллярной патологии / В.Ю. Писарев // Вестн. оториноларингологии. – 2000. – № 1. – С. 32–33.

А.Р.Сакович, А.Б. Перминов. Гематологические лейкоцитарные индексы при лор-патологии. УО «Белорусский государственный медицинский университет», УЗ «9 городская поликлиника», г. Минска, 2014, р. 29-30.

Васильев, В.С. Критерии оценки тяжести болезни и выздоровления при скарлатине / В.С. Васильев, В.И. Комар // Здоровоохранение Беларуси. – 1983. – № 2. – С. 38–40.

Сакович, А.Р. Гематологические лейкоцитарные индексы при остром гнойном синусите / А.Р.Сакович //Мед. журнал. – 2012. -№4. – С. 88 – 91.

Сакович, А.Р. Типы реакции адаптации у пациентов с острым гнойным синуситом / А.Р.Сакович // Оториноларинго- логия Восточная Европа. – 2013. -№1. – С. 47 – 52.

V. Documente considerate a fi relevante

Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	MD 805 Y 2014.08.31	1
A	MD 963 Y 2015.03.19	1
A	MD a 2001 0417 A2 2003.09.30	1
A	MD 667 Y 2013.08.31	1
A	MD 3770 F1 2008.12.31	1
A	UA 61220 U 2011.07.11	1
A	UA 53882 U 2010.10.25	1
A	UA 46403 U 2009.12.25	1
A	UA 52475 A 2002.12.15	1
A	RU 2193780 A 2002.11.27	1
A	RU 2395087 C1 2010.07.20	1
A	RU 2122739 C1 1998.11.27	1
A, D, C	Кальф-Калиф Я.Я. О лейкоцитарном индексе интоксикации и его практическом значении. Врачебное дело, 1941, N. 1, с. 31-35	1

* categoriile speciale ale documentelor citate:

A – document care definește stadiul anterior general	T – document publicat după data depozitului sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidență principiul sau teoria pe care se bazează invenția
X – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă când documentul este luat în considerație de unul singur	E – document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta dată
Y – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe documente de aceeași categorie	D – document menționat în descrierea cererii de brevet
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expoziție sau la orice alte mijloace de divulgare	C – document considerat ca cea mai apropiată soluție
	& – document, care face parte din aceeași familie de brevete

P - document publicat înainte de data de depozit, dar după data priorității invocate	L – document citat cu alte scopuri
Data finalizării documentării	21.01.2016
Examinator	LUPAȘCU Lucian