

УКРАЇНА



ПАТЕНТ

НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

№ 96920

**СПОСІБ ТЕСТУВАННЯ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННИХ "ДЕПО"
ГЕЛІКОБАКТЕРНОЇ ІНФЕКЦІЇ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ
ГЕЛІКОБАКТЕРІОЗ ЗА АВРАМЕНКОМ А.О.**

Видано відповідно до Закону України "Про охорону прав на винаходи і корисні моделі".

Зареєстровано в Державному реєстрі патентів України на корисні моделі **25.02.2015.**

Голова Державної служби
інтелектуальної власності України

А.Г. Жарінова





ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **96920** (13) **U**
(51) МПК (2015.01)
A61B 1/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки:	u 2014 09563	(72) Винахідник(и):	Авраменко Анатолій Олександрович (UA)
(22) Дата подання заявки:	01.09.2014	(73) Власник(и):	Авраменко Анатолій Олександрович, вул. Чкалова, 118, кв. 4, м. Миколаїв, 54003 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель:	25.02.2015		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	25.02.2015, Бюл.№ 4		

(54) СПОСІБ ТЕСТУВАННЯ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННИХ "ДЕПО" ГЕЛІКОБАКТЕРНОЇ ІНФЕКЦІЇ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ГЕЛІКОБАКТЕРІОЗ ЗА АВРАМЕНКОМ А.О.

(57) Реферат:

Спосіб тестування внутрішньоклітинних "депо" гелікобактерної інфекції у хворих на хронічний гелікобактеріоз містить проведення подвійного тестування слизової шлунка з однієї зони - уреазного тесту - і мікроскопування забарвлених за Гимзою мазків-відбитків. У хворих, у яких було виявлено неактивні форми НР-інфекції, а також у хворих, у яких не було виявлено внутрішньоклітинних "депо" активних форм НР-інфекції, однак які до обстеження приймали інгібітори протонної помпи і (або) були у стані тривалого психоемоційного стресу (не менш 3-х місяців), у крові визначається рівень натуральних кілерів (СД16+), відсоток і (або) абсолютна кількість яких підвищується при наявності внутрішньоклітинних "депо" НР-інфекції.

UA 96920 U

Корисна модель належить до медицини, а саме до гастроентерології, і може бути використана як спосіб тестування внутрішньоклітинних "депо" гелікобактерної інфекції у хворих на хронічний гелікобактеріоз.

- За останніми даними етіологічним чинником хронічного гастриту типу В є специфічна бактеріальна флора - *Helicobacter pylori* (HP). HP первинно оселяється у антральному відділі шлунка, а потім ретроградно заселяє і тіло шлунка, що призводить до виникнення пангастриту. Цей процес супроводжується падінням рівня кислотності шлункового соку. Велика маса бактерій за рахунок свого продукту життєдіяльності - аміаку - активно нейтралізує соляну кислоту, що призводить до підвищення рН середовища; при зниженні рівня обсіменіння слизової HP-інфекцією рН середовища також знижується. Цей процес розтягнутий у часі, тобто є стадійним. При певних обставинах хронічний гастрит типу В може трансформуватися у виразкову хворобу, незалежно від стадії розвитку хронічного гастриту (окрім стадії, коли настає повна атрофія слизової), а також у рак шлунка (Авраменко А.А., Гоженко А.И., Гойдык В.С. Язвенная болезнь (очерки клинической патофизиологии). - Одесса, 2008 г. - 304 с). HP-інфекція також може потрапляти у парієтальні клітини як природним, так і штучним шляхом, формуючи внутрішньоклітинні "депо" і повністю блокуючи синтез соляної кислоти, що призводить до стійкої гіпохлоргідрії і спочатку негативно впливає на функцію шлунково-кишкового тракту, а потім і інших органів та систем організму (Авраменко А.А., Шухтина И.Н. Частота выявления внутриклеточных депо хеликобактерной инфекции у больных хроническим хеликобактериозом при их плановом тестировании (результаты 529 исследований) // Загальна патологія та патологічна фізіологія. - 2012 р. - Т.7, № 3. - С. 124-127). Крім того, внутрішньоклітинні "депо" HP-інфекції є постійним джерелом нових загострень, тому що життєвий цикл парієтальної клітини триває майже 1 рік ((Авраменко А.А., Гоженко А.И. Хеликобактериоз. - Николаев, 2007 г. - 336 с.). Особливу проблему створюють неактивні форми HP-інфекції, тому що неможливо визначити їх положення відносно парієтальної клітини: позаклітинне чи внутрішньоклітинне. У людини є фактор імунного захисту - натуральні кілери (NK, CD16+), що являють собою лімфоїдні клітини, які здійснюють лізис пухлинних і уражених бактеріями/вірусами клітин (Васильев В.И., Седышев С.Х. и др. Дифференциальная диагностика гранулематоза Вегенера с экстранодальной НК/Т-клеточной лимфомой назального типа // Терапевтический архив. - 2012 г. - № 7. - С. 79-83), однак ще ніхто не використовував показники цього фактора у діагностиці внутрішньоклітинних "депо" HP-інфекції. Враховуючи неможливість тестування внутрішньоклітинних "депо" HP-інфекції такими розповсюдженими методами діагностики HP, як уреазний тест і ІФА (Авраменко А.А., Шухтина И.Н. Достоверность тестов по выявлению хеликобактерной инфекции у больных хроническим хеликобактериозом // Клінічна та експериментальна патологія. - 2012 г. - Т. XI, № 4 (42). - С. 4-7), пошуки нових підходів до діагностики даної патології є важливішою проблемою сучасної медицини.

- Відомий спосіб виявлення внутрішньоклітинних "депо" гелікобактерної інфекції у хворих на хронічний гелікобактеріоз, який базується на виявленні HP-інфекції під час проведення електронної мікроскопії парієтальних клітин слизової шлунка (Авраменко А.А., Гоженко А.И. Хеликобактериоз. - Николаев, 2007 г. - 336 с.).

Відомий спосіб має свої недоліки:
дороге обладнання;
достатньо тривале проведення дослідження;
велика ймовірність помилки.

- Як прототип прийнятий спосіб тестування внутрішньоклітинних "депо" гелікобактерної інфекції у хворих на хронічний гелікобактеріоз, який заснований на порівняльній характеристиці даних, отриманих при проведенні двох методів тестування HP-інфекції - уреазного тесту і мікроскопування забарвлених за Гимзою мазків-відбитків, для проведення яких матеріал слизової береться з однієї зони шлунка (Патент України №17723 "Спосіб діагностики хронічного гастриту типу В, а також виразкової хвороби та раку шлунка, асоційованих з гелікобактерною інфекцією", опубл. в Бюл. №10 16.10.2006 р.). Спосіб потребує біоптати слизової, які легко можна здобути під час проведення езофагогастроуденоскопії з будь-якої ділянки верхнього відділу шлунково-кишкового тракту.

- Недоліками прототипу є:
неможливість визначити початок формування внутрішньоклітинного "депо" активних форм HP-інфекції, коли лише незначна кількість бактерій потрапила у парієтальні клітини;
неможливість визначити місцезнаходження неактивної форми HP-інфекції - позаклітинне чи внутрішньоклітинне.

Задачею способу тестування внутрішньоклітинних "депо" гелікобактерної інфекції у хворих на хронічний гелікобактеріоз є удосконалення проведення діагностики та підвищення достовірності результатів.

Поставлена задача вирішується тим, що після проведення подвійного тестування слизової однієї зони шлунка - уреазного тесту - та мікроскопування забарвлених за Гимзою мазків-відбитків у хворих, у яких було виявлено неактивні форми НР-інфекції, а також у хворих, у яких не було виявлено внутрішньоклітинних "депо" активних форм НР-інфекції, однак які до обстеження приймали інгібітори протонної помпи і (або) були у стані тривалого психоемоційного стресу (не менш 3-х місяців), у крові визначається рівень натуральних кілерів (CD16+), відсоток і (або) абсолютна кількість яких підвищується при наявності внутрішньоклітинних "депо" НР-інфекції.

Спосіб тестування внутрішньоклітинних "депо" гелікобактерної інфекції у хворих на хронічний гелікобактеріоз дозволяє більш точно визначати початок формування внутрішньоклітинних "депо" активної форми НР-інфекції, а також визначити місцезнаходження неактивної форми НР-інфекції - позаклітинне чи внутрішньоклітинне.

Тестування внутрішньоклітинних "депо" гелікобактерної інфекції у хворих на хронічний гелікобактеріоз здійснюється наступним чином. Під час проведення езофагогастродуоденоскопії проводиться забір матеріалу біопсії для проведення гістологічного дослідження слизової та подвійного тестування на НР-інфекцію з 4-ох топографічних зон: із середньої третини антрального відділу (65-70 см від різців) і тіла шлунка (50-55 см від різців) по великій і малій кривині. Біоптат з кожної зони ділиться навпіл, після чого одна частка біоптату використовується для проведення уреазного тесту, друга частка біоптату - для виготовлення і мікроскопування забарвленого за Гимзою мазка-відбитка.

Тест на уреазну активність проводиться за наступною методикою. Розчин для проведення тесту готується щоденно: до 10,0 мл дистильованої води, яка міститься у пробірці для центригування, додається 8-10 частинок індикатору (феноловий червоний) та 0,01 г тетрацикліну гідрохлориду для пригнічення іншої бактеріальної флори, крім НР, після чого розчин ретельно змішується і ставиться у термостат при температурі + 37 °С. Перед проведенням тестування у 5 пробірок для центрифугування вміщують по 15 мг лабораторної сечовини і додають по 0,5 мл базового розчину. У пробірки з готовим розчином додають біоптати слизової з кожної топографічної зони і інкубують у термостаті (температурі + 37 °С) протягом 24 годин. Тест зараховується як позитивний при зміні кольору розчину зі світло-жовтого на світло-малиновий. Відносно часу появи позитивної реакції підраховується концентрація активних форм НР-інфекції на слизовій: від 1 до 10 хвилин - (++++); від 11 до 45 хвилин - (+++); від 46 хвилин до 1 години 30 хвилин - (++) ; від 1 години 31 хвилин до 24 годин - (+); відсутність реакції протягом 24 годин - (-).

Мікроскопування забарвлених мазків-відбитків проводиться за наступною методикою. Приготування мазків-відбитків здійснюється наступним засобом: біоптат слизової розмазується по склу, заздалегідь обробленому 96 % етиловим спиртом, і просушується у термостаті при температурі + 37 °С протягом 1 години. Потім мазок-відбиток забарвлюється водно-спиртовим розчином (1:1) метиленового синього протягом 0,5-1 хвилини, ретельно промивається дистильованою водою і просушується у термостаті протягом 1 години, після чого проводиться мікроскопування мазка-відбитка з використанням імерсійної системи. Підрахунок концентрації як активних, так і коковидних форм НР у полі зору здійснюється за загальноприйнятими критеріями: від 1 до 20 - (+); від 21 до 50 - (++) ; від 51 до 100 - (+++) ; від 101 і більше - (++++).

Обидва тести проводяться паралельно з метою визначення місцезнаходження НР-інфекції - позаклітинно чи внутрішньоклітинно. Коли бактерія знаходиться у клітині, то вона не реагує з реактивом під час проведення уреазного тесту, тому що між бактерією і реактивом знаходиться стінка клітини, що призводить до зміни часу прояви реакції: якщо НР-інфекція повністю знаходиться позаклітинно, то час позитивної реакції уреазного тесту співпадає з дійсною концентрацією НР, що підтверджується мікроскопуванням мазків-відбитків; якщо частково НР знаходиться у клітині, а частково - поза клітиною, то час настання позитивної реакції уреазного тесту не буде збігатися з дійсною концентрацією НР - він буде більшим; у ситуації, коли вся НР-інфекція знаходиться у парієтальних клітинах, уреазний тест через 24 години буде негативний.

Після проведення подвійного тестування у хворих, у яких було виявлено неактивні форми НР-інфекції, а також у хворих, у яких не було виявлено внутрішньоклітинних "депо" активних форм НР-інфекції, однак які до обстеження приймали інгібітори протонної помпи і (або) були у стані тривалого психоемоційного стресу (не менш 3-х місяців), що з'ясовується під час опитування пацієнтів, у крові визначається рівень натуральних кілерів (CD16+), відсоток і (або) абсолютна кількість яких підвищується при наявності внутрішньоклітинних "депо" НР-інфекції.

Приклади конкретного застосування.

Приклад 1

Хворий К., 30 років, хворіє на хронічний гастрит протягом 3-х років з рецидивуючим перебігом, частота загострень - 1 раз на рік (восени). При зверненні скаржився на тупий біль в епігастрії через 0,5-1 годину після прийняття їжі, нудоту, жагу. Після проведення комплексного обстеження 08.11.2012 р., до якого входило тестування на НР-інфекцію уреазним тестом і мікроскопування забарвлених мазків-відбитків, були отримані наступні результати: у хворого було визначено тип гастриту - тип В - при високій концентрації активних форм НР-інфекції на слизовій і антрального відділу, і тіла шлунка - (+ + + +), що було підтверджено обома методами, однак внутрішньоклітинних "депо" гелікобактерної інфекції виявлено не було. Під час опитування хворого було з'ясовано, що пацієнт 4 місяці знаходиться у стані тривалого психоемоційного стресу з приводу смерті матері. Було проведено визначення рівня натуральних кілерів (СД 16+) у крові пацієнта: відсоток цих клітин склав 32 (норма - 12-23), абсолютна кількість - 610 клітин/мкл (норма 70-552), що вказало на початок формування внутрішньоклітинного "депо" НР-інфекції природним шляхом.

Приклад 2

Хворий Г., 47 років, хворіє на ХГ протягом 18-ти років з рецидивуючим перебігом, частота загострень - 2 рази на рік (весною - восени). При зверненні скаржився на тупий біль через 1-1,5 години після їжі, спрагу. Було з'ясовано, що за 1 тиждень до звернення хворий самостійно пройшов курс лікування: 2 тижні пацієнт приймав інгібітор протонної помпи ("Нольпаза"). Полегшення після лікування тривало тільки 3 доби, а потім знов наступило погіршення стану. Після проведення комплексного обстеження 10.06.2013 р., до якого входило тестування на НР-інфекцію уреазним тестом і мікроскопування забарвлених мазків-відбитків, були отримані наступні результати: у хворого було визначено тип гастриту - тип В - при відсутності НР-інфекції у будь-якій формі на слизовій антрального відділу шлунка і при високій концентрації неактивних форм НР-інфекції на слизовій тіла шлунка - (+ + + +) по малій кривині, що було підтверджено обома методами. Було проведено визначення рівня натуральних кілерів (СД 16+) у крові пацієнта: відсоток цих клітин склав 30 (норма - 12-23), абсолютна кількість - 550 клітин/мкл (норма 70-552), що вказало на наявність внутрішньоклітинного "депо" неактивних форм НР-інфекції, що виникло штучним шляхом.

Таким чином, спосіб тестування внутрішньоклітинних "депо" гелікобактерної інфекції у хворих на хронічний гелікобактеріоз дозволяє більш точно визначати початок формування внутрішньоклітинних "депо" активної форми НР-інфекції, а також визначити місцезнаходження неактивної форми НР-інфекції - позаклітинне чи внутрішньоклітинне.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб тестування внутрішньоклітинних "депо" гелікобактерної інфекції у хворих на хронічний гелікобактеріоз, що містить проведення подвійного тестування слизової шлунку з однієї зони - уреазного тесту - і мікроскопування забарвлених за Гимзою мазків-відбитків, який відрізняється тим, що у хворих, у яких було виявлено неактивні форми НР-інфекції, а також у хворих, у яких не було виявлено внутрішньоклітинних "депо" активних форм НР-інфекції, однак які до обстеження приймали інгібітори протонної помпи і (або) були у стані тривалого психоемоційного стресу (не менш 3-х місяців), у крові визначається рівень натуральних кілерів (СД16+), відсоток і (або) абсолютна кількість яких підвищується при наявності внутрішньоклітинних "депо" НР-інфекції.

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601