

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **035930**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2020.09.02**

**(21)** Номер заявки  
**201900217**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2019.03.11**

**(51)** Int. Cl. **G01N 33/68** (2006.01)  
**C12Q 1/04** (2006.01)  
**C12R 1/72** (2006.01)

---

**(54) СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ ИНВАЗИВНЫХ ГРИБКОВЫХ ИНФЕКЦИЙ У ПАЦИЕНТА С ОПУХОЛЕВЫМ ЗАБОЛЕВАНИЕМ КРОВЕТВОРНОЙ ТКАНИ**

---

**(43)** **2020.09.01**

**(96)** **2019/EA/0023 (BY) 2019.03.11**

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ГОСУДАРСТВЕННОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ "МИНСКИЙ  
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ  
ЦЕНТР ХИРУРГИИ,  
ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И  
ГЕМАТОЛОГИИ" (BY)**

**(56)** BAMBА Yuuki et al. Increased presepsin levels are associated with the severity of fungal bloodstream infections. PLOS ONE, 2018, V. 13, pp. 1-10, с 5, табл. 2, с. 6, фиг. 1

БЕЛЬКОВ В.В. Пресепсин - эффективный биологический маркер для диагностики сепсиса и мониторинга системных инфекций. Здоровье, Медицинская экология, наука, 2016, 1(64), сс. 4-21, с. 6, кол. 2, с. 7, табл. 2

WO-A1-2018114044  
WO-A1-2014178383

**(72)** Изобретатель:  
**Стома Игорь Олегович, Искров  
Игорь Александрович, Усс Анатолий  
Леонидович, Карпов Игорь  
Александрович, Лендина Ирина  
Юрьевна (BY)**

---

**(57)** Изобретение относится к медицине, а именно к гематологии, и может быть использовано для диагностики грибковых инфекционных осложнений у пациентов гематологического профиля. Задача, на решение которой направлено заявляемое изобретение, заключается в повышении эффективности ранней диагностики инвазивных грибковых инфекций у пациентов гематологического профиля за счёт анализа комбинаций биомаркеров и клинических факторов риска. Сущность изобретения заключается в следующем: При развитии у пациента лихорадки на фоне химиотерапии гематологического заболевания в течение ближайших 72 ч определяют в крови С-реактивный белок, прокальцитонин и пресепсин. При значении прокальцитонина менее 1,25 нг/мл и С-реактивного белка более 120 мг/л или при значении пресепсина менее 170 пг/мл и С-реактивного белка более 120 мг/л диагностируют инвазивную грибковую инфекцию, после чего определяют клинические факторы риска дрожжевой или плесневой грибковой инфекции и при наличии у пациента пневмонии или изменений на компьютерной томограмме или рентгенограмме органов грудной клетки, или признаках острого синусита или абсцессах, или локальном некрозе кожи, или при наличии нескольких факторов риска одновременно диагностируют грибковую инфекцию, вызванную плесневыми грибами, а при наличии у пациента колонизации слизистых оболочек представителями рода *Candida spp.*, или орофарингеальном кандидозе, или инфекции кровотока, рефрактерной к системной антибактериальной терапии широкого спектра в течение 72 ч и более, или при наличии нескольких факторов риска одновременно диагностируют грибковую инфекцию, вызванную дрожжевыми грибами.

---

**B1**

**035930**

**035930**

**B1**

Изобретение относится к медицине, а именно к гематологии, и может быть использовано для диагностики грибковых инфекционных осложнений у пациентов гематологического профиля.

Инвазивные грибковые инфекции являются актуальной угрозой для значительной популяции иммунокомпрометированных пациентов, в том числе пациентов с химиотерапевтически-индуцированной нейтропенией в гематологии [1-3]. Ранний диагноз, а также дифференциальная диагностика с бактериальными инфекциями весьма затруднена, что часто приводит к задержке назначения эмпирической противогрибковой терапии и повышает риск фатального исхода. На сегодняшний день плесневые грибы (род *Aspergillus* spp.) и дрожжевые грибы (род *Candida* spp.) являются двумя наиболее важными группами инфекционных возбудителей, составляющими около 95% всех случаев инвазивных грибковых инфекций, при этом дифференциальная диагностика между ними затруднена [4].

Первый из известных предложенных способов диагностики инвазивных грибковых инфекций основан на определении антигена галактоманнана и маннанового антигена в крови [5]. В данном способе не проводится исследование биологических маркеров (С-реактивного белка, прокальцитонина, пресепсина) и не учитывается уровень (1,3)- $\beta$ -D-глюкана в крови [6]. Другим недостатком данного способа является то, что концентрация определяемых антигенов в крови напрямую связана с инвазивностью инфекционных агентов [7-9], что приводит к частым ложноотрицательным результатам диагностики. Третьим недостатком способа является необходимость получения бронхо-альвеолярного лаважа для адекватной диагностической чувствительности метода, т.е. выполнение процедуры бронхоскопии, связанной с высоким риском осложнений у пациентов гематологического профиля [10].

Второй предложенный ранее способ диагностики основан на методе полимеразной цепной реакции, однако и он имеет ряд недостатков: отсутствие коммерчески доступных анализов, невозможность выполнения дифференциальной диагностики между инфекцией и колонизацией грибковым патогеном, длительный период ожидания получения результатов исследования [11].

Известен способ диагностики на основе результатов микробиологического исследования, однако он имеет принципиальные недостатки: среднее время получения результатов исследования составляет 5 суток, не имеется возможности диагностики грибковой инфекции, вызванной некультивируемым или трудно культивируемым патогеном, не разделяется состояние инфекции и колонизации, что является неприемлемым для современной диагностики инфекций в гематологии [12].

В современных условиях адекватная диагностика наличия грибковой инфекции и уточнение её типа (дрожжевая или плесневая) необходимы в течение 72 ч от начала эпизода лихорадки у пациента гематологического профиля, что и послужило причиной разработки заявляемого способа диагностики.

В то время как уровни СРБ (С-реактивный белок) повышаются на фоне целого ряда неинфекционных заболеваний и используются для мониторинга воспаления во многих областях медицины, увеличение уровня ПКТ (прокальцитонин) непосредственно связано с инфекциями бактериальной этиологии [13-16]. Пресепсин (sCD14) - новый биологический маркер, внедренный в клиническую практику в 2004 году, является рецептором комплексов липополисахарид-липополисахарид-связывающий белок (LPS-LBP) и продуцируется как реакция организма на бактериальную инфекцию, при этом важную роль играет именно процесс антибактериального фагоцитоза, а не только воспалительный ответ [17-19].

Во всех из ранее предложенных способов диагностики инвазивных грибковых инфекций имелись существенные недостатки: невозможность дифференциальной диагностики между колонизацией и инфекцией патогенными грибами, невысокая скорость проведения диагностики, сложность в дифференциальной диагностике между бактериальной и грибковой инфекцией на фоне химиотерапии гематологического заболевания, отсутствие метода диагностики отдельно дрожжевых или плесневых грибов.

Наиболее близким к заявляемому является способ диагностики, предложенный Hammarström и соавт., на основе определения в крови (1-3)- $\beta$ -D-глюкана, галактоманнана в сочетании с графическим анализом динамики показателей [20].

Недостатками известного способа являются:

а) низкая эффективность способа в первые 72 ч от начала эпизода инфекционного осложнения, а именно низкая диагностическая чувствительность определения галактоманнана (33%) и (1-3)- $\beta$ -D-глюкана (69%), что является клинически неприемлемым;

б) способ не позволяет достоверно отличить инвазивные грибковые инфекции от бактериальных инфекций;

в) в способе не представлен механизм разделения инвазивной грибковой инфекции от колонизации слизистых оболочек грибковыми микроорганизмами;

г) в рамках данного способа не производится направленная диагностика грибковых инфекций, вызванных плесневыми или дрожжевыми грибами.

Задача, на решение которой направлено заявляемое изобретение, заключается в повышении эффективности ранней диагностики инвазивных грибковых инфекций у пациентов гематологического профиля за счёт анализа комбинаций биомаркеров и клинических факторов риска.

Применение заявляемого способа приводит к возможности ранней диагностики плесневых и дрожжевых грибковых инфекций и назначению адекватной противогрибковой терапии, что позволяет улуч-

шить бессобытийную выживаемость пациентов с гематологическими заболеваниями.

Поставленная задача решается за счет того, что при развитии у пациента лихорадки на фоне химиотерапии гематологического заболевания в течение ближайших 72 ч определяют в крови С-реактивный белок, прокальцитонин и пресепсин, после чего при значении прокальцитонина менее 1,25 нг/мл и С-реактивного белка более 120 мг/л или при значении пресепсина менее 170 пг/мл и С-реактивного белка более 120 мг/л диагностируют инвазивную грибковую инфекцию, после этого определяют клинические факторы риска дрожжевой или плесневой грибковой инфекции и при наличии у пациента пневмонии или изменений на компьютерной томограмме или рентгенограмме органов грудной клетки, или признаках острого синусита или абсцессах, или локальных некрозах кожи, или при наличии нескольких факторов риска одновременно диагностируют грибковую инфекцию, вызванную плесневыми грибами, а при наличии у пациента колонизации слизистых оболочек представителями рода *Candida spp.*, или орофарингеальном кандидозе, или инфекции кровотока, рефрактерной к системной антибактериальной терапии широкого спектра в течение 72 ч и более, или при наличии нескольких факторов риска одновременно диагностируют грибковую инфекцию, вызванную дрожжевыми грибами.

Новизна в сравнении с прототипом заключается в том, что в процессе диагностики совместно оцениваются лабораторные показатели (биомаркеры) и клинические факторы риска, что позволяет как диагностировать инвазивную грибковую инфекцию, отличить её от бактериальной инфекции, так и уточнить тип возбудителя (дрожжевые или плесневые грибы), что, в свою очередь, позволит назначить более эффективное лечение. В прототипе описан балльный расчёт шкалы клинических факторов риска, на основе которой назначается схема противогрибковой терапии без учёта лабораторных данных и без способа дифференциальной диагностики плесневой и дрожжевой грибковой инфекции.

Сущность изобретения заключается в следующем.

При развитии у пациента с опухолевым заболеванием кроветворной ткани на фоне химиотерапии синдрома лихорадки показано:

а) забор образцов венозной крови из периферического доступа до начала эмпирической антимикробной терапии;

б) измерение биомаркеров (СРБ и ПКТ или пресепсин) в свежей плазме в первые 72 часа от начала фебрильного эпизода;

в) С-реактивный белок (СРБ) измеряется в крови автоматическим биохимическим анализатором Architect с8000 (Abbott Laboratories, Abbott Park, Иллинойс, США) с реагентами Dialab (Вена, Австрия);

г) прокальцитонин (ПКТ) в крови измеряется автоматическим анализатором miniVIDAS/Blue с реагентами VIDAS BRAHMS PCT от BioMerieux (Marcy l'Etoile, Франция);

д) определение в крови пресепсина с помощью автоматического анализатора PATHFAST компании Mitsubishi Chemical Medience Corporation (Токио, Япония);

е) при определении в крови уровня ПКТ < 1,25 нг/мл в сочетании с уровнем СРБ > 120 мг/л или уровнем пресепсина < 170 пг/мл в сочетании с уровнем СРБ > 120 мг/л у пациента диагностируется инвазивная грибковая инфекция;

ж) при наличии у пациента одного или нескольких из следующих клинических факторов (пневмония; изменения на компьютерной томограмме или рентгенограмме органов грудной клетки; признаки острого синусита; абсцессы, локальный некроз кожи) диагностируется грибковая инфекция, вызванная плесневыми грибами.

з) при наличии у пациента одного или нескольких из следующих клинических факторов (колонизация слизистых оболочек представителями рода *Candida spp.*; орофарингеальный кандидоз; инфекция кровотока, рефрактерная к системной антибактериальной терапии широкого спектра в течение 72 ч и более) диагностируется грибковая инфекция, вызванная дрожжевыми грибами.

Суть изобретения состоит в ранней диагностике инвазивных грибковых инфекций с уточнением типа возбудителя (дрожжевые или плесневые грибы) на основе анализа комбинации уровней биологических маркеров и клинических факторов риска у пациентов гематологического профиля в первые 72 часа от начала инфекционного осложнения.

Изобретение поясняется следующими клиническими примерами.

Пример 1. Пациентка Н., 62 года. Основной диагноз: острый бифенотипический лейкоз (Т-лимфо/миело), атака 1, высокий исходный риск. Состояние глубокой медикаментозной иммуносупрессии.

В течение первых 48 ч от момента поступления для проведения курса химиотерапии у пациентки развилась клиника тяжёлой пневмонии, дыхательной недостаточности, выраженный интоксикационный синдром, лихорадка, абсцессы голени и бедра со скудным отделяемым. Эмпирическая антибактериальная терапия широкого спектра действия не привела к улучшению состояния пациентки. Результаты исследования биомаркеров в первые 72 ч от появления симптомов инфекционного заболевания: прокальцитонин - 0,3 нг/мл (отриц.); С-реактивный белок - 242 мг/л (резко повышен; норма 0-5 мг/л). Общий анализ крови: лейкоциты -  $2,32 \times 10^9$ /л, гемоглобин - 74 г/л, эритроциты -  $2,24 \times 10^{12}$ /л, лимфоциты - 26,5%, моноциты - 8%, нейтрофилы - 64%, базофилы - 1%, эозинофилы - 0,5%.

На основании комбинации биологических маркеров (ПКТ < 1,25 нг/мл в комбинации с СРБ > 120

мг/л) диагностирована инвазивная грибковая инфекция. Далее, с учётом наличия двух из указанных факторов риска - пневмонии и абсцессов, была незамедлительно назначена противогрибковая терапия с выраженной противоплесневой активностью. Было выполнено вскрытие и дренирование абсцессов. В рамках дополнительных диагностических мероприятий выполнены компьютерная томография органов грудной клетки, а также посев крови и мокроты на стерильность, микроскопия мокроты и отделяемого из абсцесса.

В динамике прокальцитонин сохранял отрицательные значения ( $<0,5$  нг/мл) при неоднократном исследовании, при этом С-реактивный белок сохранялся на высоком уровне (249 мг/л - через 72 ч; 207 мг/л - через 96 ч; 173 мг/л - через 120 ч). Снижение уровня С-реактивного белка коррелировало с клиническим ответом на назначенную противогрибковую терапию и к 8-му дню терапии составило 22 мг/л. Клиническое улучшение пациентки на фоне назначенной противогрибковой терапии было отмечено на 4-е сутки лечения, с последующей положительной клинико-лабораторной динамикой в отношении инфекционного процесса.

Таким образом, в данном клиническом случае на основании выраженного повышения уровня СРБ (более 120 мг/л) в комбинации с низким уровнем ПКТ ( $<1,25$  нг/мл) и наличия двух факторов риска была своевременно диагностирована инвазивная грибковая инфекция, вызванная плесневым грибом, что привело к контролю инфекционного процесса и благоприятному исходу для пациентки.

Пример 2. Пациент М., 46 лет. Основной диагноз: острый миелоидный лейкоз, рецидив 1. Миелотоксический агранулоцитоз.

На 6-е сутки от начала курса химиотерапии развились следующие клинические проявления: лихорадка до 38,6 по Цельсию, одышка, резкая слабость, эпизоды гипотензии в сочетании с тахикардией. В течение первых 48 ч выполнен забор крови для определения биомаркеров, а также для исследования крови на стерильность стандартными микробиологическими методами. Результаты исследования комбинации биомаркеров: прокальцитонин - 0,1 нг/мл (отриц.); С-реактивный белок - 205 мг/л (резко повышен; норма 0-5 мг/л). В общем анализе крови - глубокая нейтропения с абсолютным числом нейтрофилов менее 100 в микролитре. В течение первого часа от начала эпизода лихорадки назначена эмпирическая антибактериальная терапия цефепимом и амикацином. При выполнении рентгенограммы и аускультации пневмония исключена. При оценке факторов риска дрожжевой или плесневой инфекции было установлено, что при поступлении у пациента отмечалась колонизация слизистой оболочки полости рта *Candida spp.*, что вместе с результатами определения комбинации биомаркеров послужило диагностическим основанием для установления диагноза: инвазивная грибковая инфекция, вызванная дрожжевым грибом. Была назначена терапия с противодрожжевой активностью. Через 5 суток после забора крови на стерильность, на фоне выраженного улучшения состояния пациента, были получены результаты посева крови на стерильность, которые ещё раз подтвердили правильность ранней диагностики в связи с высевом из крови дрожжевого гриба *Candida albicans*. Завершение курса лечения описанной инвазивной грибковой инфекции происходило без особенностей. В данном клиническом случае на основании выраженного повышения уровня СРБ (более 120 мг/л) в комбинации с низким уровнем ПКТ ( $<1,25$  нг/мл) и наличия одного фактора риска была своевременно диагностирована инвазивная грибковая инфекция, вызванная дрожжевым грибом, что привело к контролю инфекционного процесса и благоприятному исходу для пациента.

Применение заявляемого способа объективизирует показания к своевременному началу противогрибковой терапии, что позволяет улучшить результаты лечения и повысить его эффективность, а также повысить бессобытийную выживаемость у пациентов гематологического профиля.

Источники информации:

1. Алейникова, О.В. Грибковые инфекции у иммунокомпрометированных пациентов / О.В. Алейникова // Мед. новости. – 2001. – № 4. – P. 19–24.
2. Кондаурова, С.Л., Панасюк, Ю.В. и Алейникова, О.В. Эпидемиология возбудителей грибковых инфекций у онкогематологических пациентов Центра детской онкологии, гематологии и иммунологии / С.Л. Кондаурова, Ю.В. Панасюк, О.В. Алейникова // Клиническая Инфектология и Паразитология. – 2018. – № 1. – P. 39–53.
3. Ruhnke, M., Schwartz, S. Recent developments in the management of invasive fungal infections in patients with oncohematological diseases / M. Ruhnke, S. Schwartz // Therapeutic Advances in Hematology. – 2016. № 7 (6). - P. 345-359.
4. Tacke, D. et al. Primary prophylaxis of invasive fungal infections in patients with haematologic malignancies. 2014 update of the recommendations of the Infectious Diseases Working Party of the German Society for Haematology and Oncology / D. Tacke et al. // Annals of Hematology. – 2014. – Vol. 93, № 9. – P. 1449–1456.
5. Ullmann, A.J. Diagnosis and management of Aspergillus diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline / A.J. Ullmann et al. // Clinical Microbiology and Infection. – 2018. – e1-e38.

6. Clancy, C.J., Nguyena, M.H. Diagnosing Invasive Candidiasis / C.J. Clancy, M.H. Nguyena // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2018. – Vol. 56. – P. e1909-1917.
7. Hope, W.W. et al. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* and the kinetics of galactomannan in an in vitro model of early invasive pulmonary aspergillosis: implications for antifungal therapy / W.W. Hope et al. // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2007. – Vol. 195, № 3. – P. 455–466.
8. Marr, K.A. et al. Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis: variables that affect performance / K.A. Marr et al. // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2004. – Vol. 190, № 3. – P. 641–649.
9. Maertens, J. et al. Galactomannan serves as a surrogate endpoint for outcome of pulmonary invasive aspergillosis in neutropenic hematology patients / J. Maertens et al. // *Cancer*. – 2009. – Vol. 115, № 2. – P. 355–362.
10. Katsumata, Y. et al. An Analysis of the Clinical Benefit of 37 Bronchoalveolar Lavage Procedures in Patients with Hematologic Disease and Pulmonary Complications / Y. Katsumata et al. // *Internal Medicine*. – 2019. – Vol. 10. – P. 1606-1618.
11. Patterson, T.F. et al. Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America / T.F. Patterson et al. // *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*. – 2016. – Vol. 63, № 4. – P. E1–e60.
12. Paiva, J.A. et al. Drivers and Impact of Antifungal Therapy in Critically Ill Patients with *Aspergillus*-Positive Respiratory Tract Cultures / J.A. Paiva et al. // *International Journal of Antimicrobial Agents*. – 2017. – Vol. 50 (4). – P. 529-535.

13. Reinhart, K. & Meisner, M. Biomarkers in the critically ill patient: procalcitonin / K. Reinhart, M. Meisner // *Critical Care Clinics*. – 2011. – Vol. 27, № 2. – P. 253–263.
14. Kim, D.Y. et al. The usefulness of procalcitonin and C-reactive protein as early diagnostic markers of bacteremia in cancer patients with febrile neutropenia / D.Y. Kim et al. // *Cancer Research and Treatment: Official Journal of Korean Cancer Association*. – 2011. – Vol. 43, № 3. – P. 176–180.
15. Aimoto, M. et al. Diagnostic performance of serum high-sensitivity procalcitonin and serum C-reactive protein tests for detecting bacterial infection in febrile neutropenia / M. Aimoto et al. // *Infection*. – 2014. – Vol. 42, № 6. – P. 971–979.
16. Fleischhack, G. et al. Procalcitonin-a sensitive inflammation marker of febrile episodes in neutropenic children with cancer / G. Fleischhack et al. // *Intensive Care Medicine*. – 2000. – Vol. 26 Suppl 2, – P. S202-211.
17. Shozushima, T. et al. Usefulness of presepsin (sCD14-ST) measurements as a marker for the diagnosis and severity of sepsis that satisfied diagnostic criteria of systemic inflammatory response syndrome / T. Shozushima et al. // *Journal of Infection and Chemotherapy: Official Journal of the Japan Society of Chemotherapy*. – 2011. – Vol. 17, № 6. – P. 764–769.
18. Zou, Q. Wen, W. & Zhang, X. Presepsin as a novel sepsis biomarker / Q. Zou, W. Wen, X. Zhang // *World Journal of Emergency Medicine*. – 2014. – Vol. 5, № 1. – P. 16–19.
19. Shirakawa, K. et al. Presepsin (sCD14-ST): development and evaluation of one-step ELISA with a new standard that is similar to the form of presepsin in septic patients / K. Shirakawa et al. // *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. – 2011. – Vol. 49, № 5. – P. 937–939.
20. Hammarström, H et al. Prospective evaluation of a combination of fungal biomarkers for the diagnosis of invasive fungal disease in high-risk haematology patients / H. Hammarström et al. // *Mycoses*. – 2018. – Vol. 61, № 9. – P. 623–632.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ диагностики инвазивных грибковых инфекций у пациента с опухолевым заболеванием кровеносной ткани, заключающийся в том, что при развитии у пациента лихорадки на фоне химиотерапии гематологического заболевания в течение ближайших 72 ч определяют в крови С-реактивный белок, прокальцитонин и пресеписин, после чего при значении прокальцитонина менее 1,25 нг/мл и С-реактивного белка более 120 мг/л или при значении пресеписина менее 170 пг/мл и С-реактивного белка более 120 мг/л диагностируют инвазивную грибковую инфекцию, после этого определяют клинические факторы риска дрожжевой или плесневой грибковой инфекции и при наличии у пациента пневмонии или изменений на компьютерной томограмме или рентгенограмме органов грудной клетки, или признаках острого синусита или абсцессах, или локальных некрозах кожи, или при наличии нескольких факторов риска одновременно диагностируют грибковую инфекцию, вызванную плесневыми грибами, а при наличии у пациента колонизации слизистых оболочек представителями рода *Candida spp.*, или орофаринге-

альном кандидозе, или инфекции кровотока, рефрактерной к системной антибактериальной терапии широкого спектра в течение 72 ч и более, или при наличии нескольких факторов риска одновременно диагностируют грибковую инфекцию, вызванную дрожжевыми грибами.

