

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040519**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.06.15

(21) Номер заявки
201900123

(22) Дата подачи заявки
2019.03.12

(51) Int. Cl. **G01N 33/53** (2006.01)
G01N 33/49 (2006.01)
C12R 1/72 (2006.01)

(54) СПОСОБ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ УРОВНЯ ИММУНОСУПРЕССИИ ПРИ ГНОЙНО-СЕПТИЧЕСКОМ ПРОЦЕССЕ CANDIDA-ПСЕВДОМОНАДНОЙ ЭТИОЛОГИИ

(43) **2020.09.30**

(96) **2019000013 (RU) 2019.03.12**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ "КУРСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ"
МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (RU)**

(74) Представитель:
Куприянова З.Н. (RU)

(56) RU-C2-2304969
Левых Т.С. "Иммунокоррекция при экспериментальной кандидозно-бактериальной инфекции в условиях иммуносупрессии, вызванной ожоговой травмой". Москва, 2006. <https://www.dissercat.com/content/immimokorreksiya-pri-eksperimentalnoi-kandida-bakterialnoi-infektsii-v-usloviyakh-immunosup>
Шаталова Е.В. и др. "Экспериментальное обоснование влияния иммунотерапии на механизм формирования госпитальных штаммов-возбудителей гнойно-воспалительных процессов смешанной candida-бактериальной природы". Проблемы медицинской микологии, 2016, т. 18, № 3. <https://cvberleninka.ru/article/n/eksperimentalnoe-obosnovanie-vliyaniya-immunoterapii-na-mehanizm-formirovaniya-gospitalnyh-shtammov-vozbuditeley-gnoyno>

(72) Изобретатель:
**Шаталова Елена Васильевна,
Парахина Ольга Владимировна (RU)**

(57) Предлагаемый способ относится к медицине, а именно к инфекционной иммунологии, микробиологии и эпидемиологии, и может быть использован в диагностике с целью предупреждения возникновения госпитальных инфекций смешанной Кандида-бактериальной природы и повышения антиинфекционной резистентности организма у иммунокомпрометированных больных. Технический результат - разработать способ, позволяющий дифференцировать уровень иммуносупрессии при гнойно-воспалительных процессах Кандида-бактериальной этиологии, что является основой и доминирующим фактором, тяжесть которого зависит от принадлежности к роду и виду бактерий-ассоциантов при таких инфекциях. Технический результат достигается тем, что в лейкоцитах периферической крови определяют интегральную цитохимическую активность, для чего рассчитывают содержание катионных белков, а в сыворотке крови - интегральный показатель эффекта подавляющего действия на образование антител естественного ингибирующего фактора с последующим определением диагностического коэффициента по формуле

$$ДК = \frac{ИИ\ РИА}{СГК\ КБ}$$

выраженный в условных единицах, где ДК - диагностический коэффициент; ИИ РИА - индекс ингибирования в реакции ингибирования агглютинации; СГК КБ - средний гистохимический показатель катионных белков, и при ДК=4,0-5,0 на 3 сутки исследования прогнозируют благоприятный тип течения иммуносупрессии; при ДК от 5,0-9,0 - развитие гнойно-воспалительного процесса смешанной этиологии средней тяжести, вызванного грибами рода Кандида+кишечная палочка и Кандида+стафилакокк соответственно, и при ДК от 29,0 и выше

040519 B1

040519 B1

прогнозируют затяжной и тяжелый процесс иммуносупрессии на фоне развития осложнений Кандида-псевдомонадной этиологии.

040519 B1

040519 B1

Предлагаемый способ относится к медицине, а именно к инфекционной иммунологии, микробиологии и эпидемиологии, и может быть использован в диагностике с целью предупреждения возникновения госпитальных инфекций (ГИ) смешанной Кандида-бактериальной природы и повышения антиинфекционной резистентности организма у иммунокомпрометированных больных.

ГИ продолжают сохранять актуальность для здравоохранения всего мира в силу широкого распространения, большого социально-экономического и медицинского ущерба и отсутствия систематизированных данных.

Особое положение среди ГИ занимают смешанные (микст, полимикробные) гнойно-воспалительные процессы, причиной возникновения которых являются условно-патогенные микроорганизмы (УПМ). Известно, что УМП отличаются по своим свойствам от облигатно-патогенных микроорганизмов и чаще всего бывают причиной возникновения гнойно-воспалительных процессов у иммунокомпрометированных больных. Организм таких больных является хорошим биотопом для активизации, причём одномоментной, своего относительно невысокого патогенного потенциала различных УПМ. Чаще всего такие процессы, что достаточно изучено в этиологическом плане, вызывают штаммы стафилококков, псевдомонад, энтеробактерий и др. в виде монокультур или ассоциации, состоящие из различных видов последних.

Однако на сегодняшний день особое беспокойство у врачей разных специальностей вызывают смешанные инфекции, возбудителями которых являются различные виды грибов рода Кандида и бактерий. С учётом того, что грибы и бактерии, как известно, являются представителями разных доменов (домен "Eukaria", царство Fungi и домен "Bacteria"-прокариоты соответственно), гнойно-воспалительные процессы микобактериальной природы обуславливают трудности в диагностике и профилактике последних и являются серьёзной проблемой для здравоохранения всего мира.

Проблема Кандида-бактериальных инфекций практически не изучена ни с одной из позиций, характеризующих ГИ: ни с микробиологической, ни с иммунологической, ни с эпидемиологической позиций. В связи с этим проблема Кандида-бактериальных микст-инфекций требует комплексного исследования и, в первую очередь, решения проблемы диагностики таких инфекций для выявления особенностей течения, профилактики, правильного лечения иммунокомпрометированных больных и, соответственно, для разработки параметров контроля и эпиднадзора последних.

В условиях Кандида-бактериальной инфекции возникает парадоксальная для иммунной системы ситуация, которая требует одновременного включения двух оппозитных форм иммунного ответа: антибактериального и противогрибкового. Следовательно, торможение обеих форм иммунного ответа при Кандида-бактериальной инфекции приводит к угнетению всей системы иммунитета, что приводит в конечном итоге к летальному исходу.

В то же время, несмотря на особое беспокойство врачей разных специальностей, высокую актуальность и социальную значимость данной проблемы, авторы данной заявки в доступной литературе не обнаружили каких-либо способов диагностики, профилактики или оценки уровня иммунной системы именно при Кандида-бактериальной инфекции, поэтому прототипы предлагаемого изобретения выбрать не представляется возможным.

В связи с этим, техническим результатом является разработать способ, позволяющий дифференцировать уровень иммуносупрессии при гнойно-воспалительных процессах Кандида-бактериальной этиологии, что является основой и доминирующим фактором в течении и исходе таких инфекций.

Технический результат достигается тем, что впервые авторами предложено определять диагностический коэффициент исходя из полученных показателей крови по цитохимической активности и эффекту естественного ингибирующего фактора сыворотки крови по формуле

$$ДК = \frac{ИИ\ РИА}{СГК\ КБ}$$

где ДК - диагностический коэффициент, выраженный в условных единицах;

ИИ РИА - индекс ингибирования в реакции ингибирования агглютинации;

СГК КБ - средний гистохимический показатель катионных белков.

Одновременное определение СГК КБ и ИИ РИА в сыворотке крови с последующим определением соотношения между ними позволяет значительно повысить эффективность способа определения степени иммуносупрессии при гнойно-септическом процессе Кандида-псевдомонадной этиологии.

Полученные нами данные позволяют констатировать факт, что предложенный нами показатель ДК имеет большее диагностическое и более точное значение, чем каждый из этих показателей в отдельности. Кроме того, ДК позволяет легко и быстро определить степень иммуносупрессии при данной патологии.

Способ осуществляется следующим образом.

Цитохимическую активность определяют по содержанию катионных белков в мазках крови по методике М.Г. Шубич, 1974 г. Высушенные свежеприготовленные мазки фиксируют 60 с 5%-ным раствором сульфосалициловой кислоты, промывают дистиллированной водой, высушивают, окрашивают 2 мин 0,1%-ным раствором бромфенолового синего в 0,05М боратном буфере (рН 8,2), промывают в трех сменах этого же буфера по 2 мин в каждой смене. Мазки тщательно промывают водой, высушивают, произ-

вводят докраску ядер 1% р-ром сафранина 60 с и микроскопируют под иммерсией. Активность катионных белков выражают в условных единицах (у.е.) на основании вычисления среднего гистохимического коэффициента (СГК) по формуле Астальди Верга

$$\text{СГК} = \frac{3\text{А} + 2\text{Б} + 1\text{В} + 0\text{Г}}{100}$$

где цифры 3, 2, 1, 0 - степень интенсивности окраски (А - гранулы занимают всю цитоплазму клетки, Б - гранулы занимают 3/4 части цитоплазмы, В - единичные гранулы в цитоплазме, 0 - отсутствие гранул). ЕИФ активности иммуноглобулинов (Ig) определяли с помощью реакции ингибирования агглютинации (РИА) с вычислением индекса ингибирования (ИИ). РИА считали положительной, если ИИ был равен 1,2 и более (Н.В. Журавлёва, 1985 г.).

С целью повышения эффективности технического результата мы предлагаем одновременное определение СГК КБ и ЕИФ по ИИ РИА в сыворотке крови с последующим определением соотношения между ними. Это позволит значительно повысить эффективность способа определения степени иммуносупрессии при гнойно-септическом процессе Кандида-бактериальной этиологии.

С целью повышения эффективности предлагаемого способа, упрощения и повышения точности диагностики степени иммуносупрессии Кандида-бактериальной этиологии мы предлагаем определять диагностический коэффициент по формуле

$$\text{ДК} = \frac{\text{ИИ РИА}}{\text{СГК КБ}}$$

где ДК - диагностический коэффициент, выраженный в условных единицах (у.е.); ИИ РИА - индекс ингибирования в реакции ингибирования агглютинации; СГК КБ - средний гистохимический показатель катионных белков.

Иммуносупрессию организма создавали путём выбора модели ожоговой травмы, так как известно, что в патогенезе обширных термических повреждений большую роль играют механизмы дестабилизации иммунного статуса с развитием иммунодефицита, влекущего за собой возникновение комплекса патологических изменений практически во всех внутренних органах.

Ожог III-В степени площадью около 30% поверхности тела животного получали под лёгким эфирным наркозом на депилированном участке кожи спины животного с помощью устройства, поддерживающего температуру обжигающей поверхности на уровне 100°C при экспозиции 8 с (В.В. Минухин, 1985 г.).

Эксперименты выполнены на крысах Вистар. Требования Международного комитета, изложенные в Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных целей (г. Страсбург, Франция, 1986) в работе полностью соблюдены.

Для создания модели микст-инфекции ожоговую поверхность орошали смесью живых 2 млрд культур 1:1 через сутки после воспроизведения ожога. В работе использовались штаммы микроорганизмов, выделенные от больных.

Наблюдения за животными проводили в течение 28 суток, ежедневно учитывая количество павших животных. Кровь для исследования брали на 3, 7, 14 сутки с момента инфицирования ожоговой травмы.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета прикладных программ "Microsoft Office XP" с применением критерия Стьюдента.

Пример конкретного выполнения.

Экспериментальные животные были разделены на группы (по 25 животных в каждой):

- 1) интактные (контрольная группа);
- 2) животные с "чистым" ожогом;
- 3) животные с ожоговой травмой, инфицированные *Candida albicans*+*Escherichia coli*;
- 4) животные с ожоговой травмой, инфицированные *Candida albicans*+*Staphylococcus aureus*.
- 5) животные с ожоговой травмой, инфицированные *C. albicans*+*Pseudomonas aeruginosa*.

Полученные нами данные согласуются с данными литературы о развитии иммунодефицита при ожоговой травме (табл. 1). Активность кислороднезависимых бактерицидных систем нейтрофилов периферической крови таких животных (КБ-тест) была достоверно снижена уже на 3 сутки исследования с выраженной активностью ЕИФ ($P < 0,05$) относительно интактных животных.

Однако самые низкие значения перечисленных показателей наблюдались у животных с гнойно-воспалительным процессом Кандида-бактериальной этиологии на фоне ожоговой травмы (табл. 2). На присоединившуюся Кандида-бактериальную инфекцию организм обожженных животных по-разному реагировал относительно формирования иммуносупрессии.

Нами впервые установлено, что уровень иммуносупрессии организма таких животных и их выживаемость при Кандида-бактериальной инфекции в условиях иммуносупрессии находятся в прямой зависимости от принадлежности бактерий-ассоциантов к роду и виду.

Таблица 1

Изучаемые показатели	Г р у п п ы ж и в о т н ы х					
	Интактные			Ожоговая травма		
	Показатели в разные сроки исследования (сутки) М ± m (n=25)					
	3	7	14	3	7	14
КБ – тест, средний гистохимический показатель (СГК)	1,0 ± 0,2			0,3 ± 0,01	0,4* ± 0,02	0,8 ± 0,03
ИИ РИА (естественный ингибирующий фактор – ЕИФ)	1,0 ± 0,0			1,4 ± 0,1	1,5* ± 0,4	1,3 ± 0,2
Выживаемость, %	100,0					85,0
ДК (диагностический коэффициент)	1,0			4,6*	3,7	1,6

Примечание: достоверность различий с данными контрольной группы: интактные - P<0,05.

Полученные нами результаты исследований достоверно показывают, что по возрастанию степени тяжести вызываемой иммуносупрессии у животных в условиях вторичного иммунодефицита и смешанной инфекции Кандида-бактериальной этиологии изучаемые ассоциации возбудителей располагаются в следующей последовательности: грибы+кишечные палочки→грибы+стафилококки→грибы+псевдомонады (табл. 2).

Таблица 2

Показатели КБ-теста и ИИ РИА у животных с Кандида-бактериальной инфекцией на фоне ожоговой травмы

Изучаемые показатели	Г р у п п ы ж и в о т н ы х								
	C. albicans+ E.coli			C. albicans + S.aureus			C. albicans + P.aeruginosa		
	Показатели в разные сроки исследования (сутки) М±m (n=25)								
	3	7	14	3	7	14	3	7	14
КБ-тест, средний гистохимический показатель (СГК)	0,3 ± 0,03	0,3* ± 0,02	0,6 ± 0,01	0,2 ± 0,02	0,2* ± 0,03	0,4 ± 0,01	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,02	0,1* ± 0,06
ИИ РИА (естественный ингибирующий фактор — ЕИФ)	1,7 ± 0,3	1,6* ± 0,6	1,4 ± 0,5	1,8 ± 0,5	1,9* ± 0,6	1,6 ± 0,5	2,9 ± 0,6	3,9 ± 1,2	3,7* ± 1,1
Выживаемость, %			70,0			60,0			35,0
ДК – диагностический коэффициент	5,7*	5,3	2,3	9,0*	9,5	4,0	29,0*	39,0	37,0

Примечание: достоверность различий с данными контрольной группы: интактные - P<0,01.

Изучение бактерицидной активности фагоцитов по уровню КБ и ЕИФ сыворотки крови у животных показало, что активность ЕИФ в организме больных животных находится в обратной зависимости относительно активности КБ. Выраженная активность ЕИФ в сыворотке крови животных с Кандида-бактериальной инфекцией на фоне ожоговой травмы (от 1,7 до 1,9) сопровождалась достоверным (P<0,01) снижением уровня КБ в лизосомах фагоцитов (от 0,6 до 0,4) с увеличением ДК уже на 3 сутки исследования от 5,7 до 9,0 у.е. при C.albicans+E.coli и C.albicans+S.aureus соответственно (табл. 2). Однако стойкая иммуносупрессия организма развивалась в группе животных с Кандида-псевдомонадной инфекцией на фоне ожоговой травмы. Выраженная активность ЕИФ сыворотки крови (2,9-3,9 на 3 и 7 сутки исследования) сопровождалась почти полным отсутствием КБ нейтрофилов периферической крови таких животных на всех сроках исследования с увеличением уже на 3 сутки ДК от 29,0 у.е. и выше (табл. 2).

Корреляционный анализ выявленной нами статистически достоверной сильной прямой связи между степенью тяжести гнойно-воспалительного процесса Кандида-бактериальной этиологии и выживаемостью животных ($r = 0,891 \pm 0,092$ при P<0,01), позволяет отнести ЕИФ и КБ-тест к маркерам дифференциальной диагностики степени иммуносупрессии в условиях Кандида-псевдомонадной инфекции, а их со-

отношение, т.е. ДК, позволяет значительно повысить эффективность предлагаемого способа.

Таким образом, нами установлено, что система "Степень иммуносупрессии макроорганизма - принадлежность бактерий к роду и виду в ассоциации с грибами рода Кандида" по изучаемым показателям имеет диагностическое значение и их ДК может быть использован для прогнозирования возникновения госпитальных инфекций, позволит вовремя проводить адекватные профилактические и лечебные мероприятия и осуществлять анализ эпидемиологической обстановки, что, в целом, сократит сроки пребывания больных в стационаре.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ дифференциальной диагностики уровня иммуносупрессии при гнойно-септическом процессе Кандида-псевдомонадной этиологии, включающий определение в лейкоцитах периферической крови интегральной цитохимической активности с вычислением среднего гистохимического коэффициента по содержанию катионных белков, а в сыворотке крови - интегральный показатель эффекта подавляющего действия на образование антител естественного ингибирующего фактора в реакции агглютинации с вычислением индекса ингибирования с последующим определением диагностического коэффициента по формуле

$$ДК = \frac{ИИ\ РИА}{СГК\ КБ}$$

где ДК - диагностический коэффициент, выраженный в условных единицах;

ИИ РИА - индекс ингибирования в реакции ингибирования агглютинации;

СГК КБ - средний гистохимический показатель катионных белков,

и при ДК=4,0-5,0 на 3 сутки исследования определяют благоприятный тип течения иммуносупрессии; при ДК от 5,0-9,0 - развитие гнойно-воспалительного процесса смешанной этиологии средней тяжести, вызванного грибами рода Кандида+кишечная палочка и грибами рода Кандида+стафилококк соответственно; и при ДК от 29,0 и выше прогнозируют затяжной и тяжелый процесс иммуносупрессии на фоне развития осложнений Кандида-псевдомонадной этиологии.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2
