



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2009124934/15, 29.06.2009

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
29.06.2009

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 29.06.2009

(43) Дата публикации заявки: 10.01.2011 Бюл. № 1

(45) Опубликовано: 20.10.2011 Бюл. № 29

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU 2068997 C1, 10.11.1996.

Л.В.Богданович и др. Анализ изменения
состояния неспецифического иммунитета у
детей при помощи базовой статистики.

Поступила 22.12.2008, найдено из Интернет
<URL: <http://izn.com.ua/publikacii/07101445.pdf>>. SU

1239549 A1, 23.06.86.

Адрес для переписки:

660022, г.Красноярск, ул. Партизана
Железняка, 3Г, НИИ медицинских проблем
Севера, патентоведу

(72) Автор(ы):

Коленчукова Оксана Александровна (RU),
Савченко Андрей Анатольевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Учреждение Российской академии
медицинских наук Научно-
исследовательский институт медицинских
проблем Севера Сибирского отделения
РАМН (РФ) (RU)

(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, в частности к иммунологии, и описывает способ определения антибактериальной резистентности организма человека при заболеваниях, вызванных стафилококковой инфекцией, основанный на исследовании нейтрофилов крови, при этом функциональную активность нейтрофильных гранулоцитов периферической крови пациента исследуют с помощью хемилюминесцентного анализа, определяют индекс бактериальной активации нейтрофилов (ИБА-индекс), представляющий собой отношение площади под кривой индуцированной бактериями Staphylococcus

epidermidis хемилюминесценции

нейтрофильных гранулоцитов к площади под кривой спонтанной хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов, и при величине этого индекса ниже 1,47 определяют высокий уровень антибактериальной резистентности, а при величине, равной 1,47 и выше, - низкий уровень антибактериальной резистентности организма. Способ информативен, точен, отвечает современным требованиям к методам лабораторной диагностики и позволяет прогнозировать характер, сроки течения заболевания и осложнений бактериальной этиологии у больных разных категорий. 2 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2009124934/15, 29.06.2009**

(24) Effective date for property rights:
29.06.2009

Priority:

(22) Date of filing: **29.06.2009**

(43) Application published: **10.01.2011 Bull. 1**

(45) Date of publication: **20.10.2011 Bull. 29**

Mail address:

**660022, g.Krasnojarsk, ul. Partizana Zheleznjaka,
3G, NII meditsinskikh problem Severa,
patentovedu**

(72) Inventor(s):

**Kolenchukova Oksana Aleksandrovna (RU),
Savchenko Andrej Anatol'evich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Uchrezhdenie Rossijskoj akademii meditsinskikh
nauk Nauchno-issledovatel'skij institut
meditsinskikh problem Severa Sibirskogo
otdelenija RAMN (RF) (RU)**

(54) METHOD FOR DETERMINING ANTIBACTERIAL RESISTANCE OF HUMAN BODY

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention describes a method for determining antibacterial resistance of a human body in diseases caused by a staphylococcus infection, based on blood neutrophil analysis; functional activity of neutrophilic granulocytes of patient's peripheral blood is determined by chemoluminescence with calculating a bacterial activation index (the BAI-index) of neutrophils representing the relation of an area under a curve of neutrophilic granulocyte chemoluminescence induced by Staphylococcus epidermidis bacteria to an area

under a curve of spontaneous neutrophilic granulocyte chemoluminescence, and if the derived value is less than 1.47, a high level of antibacterial resistance is stated, while the derived values 1.47 and more shows a low level of antibacterial body resistance.

EFFECT: method is informative, precise, complies with the modern requirements for laboratory diagnostic techniques and allows predicting a nature, a clinical course period and bacterial complications in the patients of various groups.

1 ex, 2 tbl

RU 2 431 837 C2

RU 2 431 837 C2

Изобретение относится медицине, в частности к иммунологии, и может быть использовано для оценки неспецифической антибактериальной резистентности организма человека.

5 Известен метод определения неспецифической антибактериальной резистентности организма [RU 2068997 C1, опубл. 10.11.1996]. Сущность изобретения состоит в том, что перед подготовкой мазков готовят культуру бактерий *Serratia marcescens* для
10 использования ее в качестве объекта фагоцитоза, опсонизируют бактериальную взвесь сывороткой здоровых лиц, инкубируют опсонизированную и неопсонизированную культуру бактерий с лейкоконцентратом больных, исследуют суммарную цитохимическую активность миелопероксидазы и катионных белков до и после
15 инкубации, после чего рассчитывают индекс стимуляции нейтрофилов. При величине индекса 0,5 и ниже определяют снижение антибактериальной резистентности организма. Недостатком метода является длительность его выполнения и
20 необходимость микроскопической оценки активности ферментов, что снижает точность и объективность способа.

Задачей изобретения является создание нового информативного способа определения антибактериальной резистентности организма человека.

20 Задача достигается тем, что с помощью хемилюминесцентного анализа исследуют функциональную активность нейтрофильных гранулоцитов периферической крови пациента, определяют индекс бактериальной активации нейтрофильных
25 гранулоцитов (ИБА-индекс), представляющий собой отношение площади под кривой хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов, индуцированной бактериальной суспензией *Staphylococcus epidermidis*, к площади под кривой спонтанной
30 хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов. При величине этого индекса ниже 1,47 определяют высокий уровень антибактериальной резистентности, а при величине, равной 1,47 и выше, - низкий уровень антибактериальной резистентности
35 организма человека.

Низкая антибактериальная резистентность характеризуется увеличением восприимчивости организма к бактериальным инфекциям; увеличением длительности
40 заболевания и присоединением сопутствующих бактериальных инфекций, а также утяжелением острого периода и быстрым переходом заболевания в хроническую форму. Цифра 1,47 получена опытным путем на основании сопоставления данных
45 проведенного хемилюминесцентного анализа, результатов медицинского обследования и данных о последующих обострениях хронической бактериальной инфекции.

40 Активированные нейтрофильные гранулоциты являются мощными эффекторами и запускают механизмы каскадных реакций, обеспечивающих развитие воспаления. Противоинфекционное действие нейтрофильных гранулоцитов связано, главным
образом, с генерацией активных форм кислорода, а одним из методов, позволяющих
45 оценить кислородзависимую биоцидность нейтрофильных гранулоцитов, является хемилюминесцентный анализ. Нейтрофильные гранулоциты несут на своей поверхности широкий спектр рецепторов, часть из которых может взаимодействовать
50 с неопсонизированными бактериями (CR- и Toll-рецепторы). Фагоцитоз без опсонизации связан с наличием у микробов особых факторов вирулентности, с помощью которых они проникают в клетки. Фагоцитоз является одной из главных систем защиты организма от чужеродных агентов и играет важную роль при гнойно-воспалительных заболеваниях, особенно при стафилококковой инфекции. Несомненным преимуществом метода является применение в качестве индуктора

бактерий *Staphylococcus epidermidis*, которые способны вызывать тяжелые воспалительные заболевания.

Способ осуществляют следующим образом. Из венозной крови обследуемого пациента выделяют нейтрофильные гранулоциты. Для этого к 5 мл крови с гепарином добавляют 1 мл полиглюкина. Смесь инкубируют в течение 30 мин при 37°C для ускорения осаждения эритроцитов. Полученный лейкоцитарный супернатант дважды отмывают в растворе Хенкса без фенолового красного по 10 мин при 400 g. Супернатант сливают, оставшиеся нейтрофильные гранулоциты разводят в 1 мл раствора Хенкса и получают взвесь. Подсчитывают количество нейтрофильных гранулоцитов в камере Горяева. Для проведения хемилюминесцентного анализа используют следующие реактивы: донорскую сыворотку (группа крови АВ, резус-фактор отрицательный), раствор Хенкса (без фенолового красного), люминол в концентрации 100 мкг/мл. Готовят пробу: 200 мкл взвеси нейтрофильных гранулоцитов, 20 мкл донорской сыворотки, 240 мкл раствора Хенкса, 50 мкл люминола и 40 мкл бактериальной суспензии *Staphylococcus epidermidis* в концентрации 10⁶ КОЕ/мл. Хемилюминесцентный анализ проводят в двух кюветах: спонтанная хемилюминесценция осуществляется без добавления индуктора, во вторую кювету добавляют бактериальную суспензию *Staphylococcus epidermidis*. Измерение хемилюминесцентного ответа осуществляют при помощи хемилюминесцентного анализатора, например «CL3604», в течение 90 мин. Регистрацию результатов и управление хемилюминесцентным анализатором осуществляют через компьютер. Получают кривые спонтанной и индуцированной бактериями хемилюминесценции. Индекс бактериальной активации нейтрофилов (ИБА-индекс) определяют по формуле:

$$\text{ИБА} = S_{\text{индуцированная}} / S_{\text{спонтанная}},$$

где:

$S_{\text{индуцированная}}$ - величина площади под кривой хемилюминесценции, индуцированной бактериальной суспензией *Staphylococcus epidermidis*;
 $S_{\text{спонтанная}}$ - величина площади под кривой спонтанной хемилюминесценции.

При ИБА-индексе ниже 1,47 диагностируют высокий уровень антибактериальной резистентности, при ИБА-индексе, равном 1,47 или выше, - низкий уровень антибактериальной резистентности организма.

Данный метод апробирован на 12 больных хроническим гайморитом, поступивших на лечение в ЛОР-отделение НУЗ "Дорожная клиническая больница" на ст.Красноярск ОАО РЖД, и на 45 здоровых лицах. Результаты обследования представлены в табл.1.

Таблица 1

Номер	Обследуемый	ИБА
1	Больной	1,65
2	Больной	0,89
3	Больной	1,72
4	Больной	1,64
5	Больной	1,75
6	Больной	1,96
7	Больной	3,27
8	Больной	6,40
9	Больной	1,64
10	Больной	1,48
11	Больной	1,68
12	Больной	2,15
13	Здоров	0,65
14	Здоров	0,57
15	Здоров	0,80
16	Здоров	1,36
17	Здоров	0,49
18	Здоров	0,93
19	Здоров	1,44
20	Здоров	1,36
21	Здоров	0,44
22	Здоров	0,13
23	Здоров	1,38
24	Здоров	0,57
25	Здоров	0,46
26	Здоров	0,43
27	Здоров	0,74
28	Здоров	0,49
29	Здоров	0,38
30	Здоров	0,59
31	Здоров	1,15
32	Здоров	0,76
33	Здоров	0,99
34	Здоров	1,33
35	Здоров	1,24

36	Здоров	1,29
37	Здоров	1,41
38	Здоров	1,44
39	Здоров	1,13
40	Здоров	1,45
41	Здоров	1,00
42	Здоров	0,64
43	Здоров	0,64
44	Здоров	0,85
45	Здоров	1,46
46	Здоров	1,38
47	Здоров	0,63
48	Здоров	0,76
49	Здоров	0,76
50	Здоров	1,15
51	Здоров	0,83
52	Здоров	1,37
53	Здоров	1,08
54	Здоров	1,39
55	Здоров	1,03
56	Здоров	0,18
57	Здоров	1,05

По результатам исследования установлено, что у всех 45 здоровых лиц величина ИБА-индекса ниже 1,47 (100% совпадение). У 11 больных также отмечено совпадение результатов анализа. У 1 больного величина индекса ниже 1,47. Таким образом, совпадение метода определения антибактериальной резистентности у больных хроническими гайморитами составляет 91,7%. При статистическом анализе (с подсчетом медианы (Me) и интерквартильного разброса ($C_{25}-C_{75}$)) установлены статистически достоверные различия ($P < 0,001$) по уровню ИБА в группах здоровых и больных людей (табл.2).

Уровень ИБА в группах здоровых и больных лиц				
Группы	N	Me	C ₂₅	C ₇₅
Здоровые	45	0,930000	0,630000	1,330000
Больные	12	1,700000	1,640000	2,055000

Клинический пример 1. Больной И., 43 г. История болезни №2149. Поступил на стационарное лечение в ЛОР-отделение НУЗ "Дорожная клиническая больница" на ст. Красноярск ОАО РЖД с диагнозом хронический риносинусит. При поступлении состояние больного средней степени тяжести, беспокоят слабость и головные боли. Проведено исследование заявляемым способом. ИБА равен 1,96 (выше 1,47).

Следовательно, у обследуемого низкий уровень антибактериальной резистентности. Клинический пример 2. Пациент С., 41 год, был обследован всеми основными врачами-специалистами, включая врача-инфекциониста и врача-иммунолога, при проведении профилактического осмотра сотрудников ОАО "Горэлектривязь" на базе клиники НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН. Признан здоровым. Проведено исследование заявляемым способом.

ИБА равен 1,15 (ниже 1,47). Следовательно, у обследуемого высокий уровень антибактериальной резистентности.

Технический результат предлагаемого способа:

- автоматизированное определение функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов;

- оценка результатов не зависит от субъективных факторов.

Таким образом, способ информативен, точен, отвечает современным требованиям к методам лабораторной диагностики, позволяет значительно упростить процесс определения факторов неспецифической защиты организма, его функциональной активности и резервных возможностей, дает возможность выявить недостаточность фагоцитарной защиты и ее реактивной или патологической активации.

Формула изобретения

Способ определения антибактериальной резистентности организма человека при заболеваниях, вызванных стафилококковой инфекцией, основанный на исследовании нейтрофилов крови, отличающийся тем, что функциональную активность нейтрофильных гранулоцитов периферической крови пациента исследуют с помощью хемилюминесцентного анализа, определяют индекс бактериальной активации нейтрофилов (ИБА-индекс), представляющий собой отношение площади под кривой, индуцированной бактериями *Staphylococcus epidermidis* хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов, к площади под кривой спонтанной хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов, и при величине этого индекса ниже 1,47 определяют высокий уровень антибактериальной резистентности, а при величине равной 1,47 и выше - низкий уровень антибактериальной резистентности организма.