



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G16H 50/30 (2023.05); G01N 21/76 (2023.05)

(21)(22) Заявка: 2023115796, 16.06.2023

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
16.06.2023

Дата регистрации:
21.07.2023

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 16.06.2023

(45) Опубликовано: 21.07.2023 Бюл. № 21

Адрес для переписки:

450077, г. Уфа, ул. Ленина, 3,
БАШГОСМЕДУНИВЕРСИТЕТ, пат.отдел,
Ахатов Искандер Шаукатович

(72) Автор(ы):

Галимова Эльмира Фанисовна (RU),
Галимова Саида Шамилевна (RU),
Мочалов Константин Сергеевич (RU),
Галимов Камиль Шамилович (RU),
Бодрова Елизавета Сергеевна (RU),
Галимов Шамиль Нариманович (RU),
Павлов Валентин Николаевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "БАШКИРСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ"
Министерства здравоохранения Российской
Федерации (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2155337 C1, 27.08.2000.

СЕРГЕЕВА И.В. и др. Геморрагическая
лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) в
Красноярске. Клинический пример.
Современные проблемы науки и образования.
2015; 5: 126. МОЧАЛОВ К.С. Влияние
препаратов иммуноглобулинов для
внутривенного введения на функционально-
метаболическую активность фагоцитов и
генерацию свободных (см. прод.)

(54) СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ С
ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ ПО ПОКАЗАТЕЛЯМ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО РЕЗЕРВА
ФАГОЦИТАРНОГО ЗВЕНА СИСТЕМЫ ИММУНИТЕТА

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно
к патофизиологии, лабораторной диагностике,
инфектологии и терапии, и может быть
использовано для диагностики степени тяжести
геморрагической лихорадки с почечным
синдромом (ГЛПС). Проводят люминол-
зависимую хемилюминесценцию
гепаринизированной цельной крови с

добавлением зимозана. Определяют
интенсивность зимозан-индуцированной
генерации активных форм кислорода фагоцитами.
Определяют показатель резерва функциональной
активности фагоцитов. При значении указанного
показателя 2,8-3,3 усл. ед. диагностируют ГЛПС
средней степени тяжести, 2,0-2,7 усл. ед. – ГЛПС
тяжелой степени тяжести, 1,9 усл. ед. и менее -

ГЛПС тяжелой степени с острой почечной недостаточностью. Способ обеспечивает упрощенную и точную диагностику степени

тяжести ГЛПС за счет оценки функционального резерва фагоцитарного звена системы иммунитета. 6 пр.

(56) (продолжение):

радикалов. Автореф. дисс. канд. биол. наук. Уфа, 2009, 24 с.. REN D. et al. The Clinical Characteristics and Outcomes of Hemorrhagic Fever With Renal Syndrome in Pregnancy. Front. Med. 2022; 9: 839224. Published: 21 February 2022.

RU 2800407 C1

RU 2800407 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

G16H 50/30 (2023.05); *G01N 21/76* (2023.05)(21)(22) Application: **2023115796, 16.06.2023**(24) Effective date for property rights:
16.06.2023Registration date:
21.07.2023

Priority:

(22) Date of filing: **16.06.2023**(45) Date of publication: **21.07.2023** Bull. № 21

Mail address:

**450077, g. Ufa, ul. Lenina, 3,
BASHGOSMEDUNIVERSITET, pat.otdel,
Akhatov Iskander Shaukatovich**

(72) Inventor(s):

**Galimova Elmira Fanisovna (RU),
Galimova Saida Shamilevna (RU),
Mochalov Konstantin Sergeevich (RU),
Galimov Kamil Shamilevich (RU),
Bodrova Elizaveta Sergeevna (RU),
Galimov Shamil Narimanovich (RU),
Pavlov Valentin Nikolaevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe biudzhethnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniia «BASHKIRSKII
GOSUDARSTVENNYI MEDITSINSKII
UNIVERSITET» Ministerstva
zdravookhraneniia Rossiiskoi Federatsii (RU)**(54) **METHOD OF DIAGNOSTICS OF SEVERITY OF HEMORRHAGIC FEVER WITH RENAL SYNDROME
BY INDICATORS OF FUNCTIONAL RESERVE OF PHAGOCYTE LINK OF IMMUNITY SYSTEM**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, namely to pathophysiology,
laboratory diagnostics, infectology and therapy.SUBSTANCE: invention can be used to diagnose
the severity of hemorrhagic fever with renal syndrome
(HFRS). Luminol-dependent chemiluminescence of
heparinized whole blood with the addition of zymosan
is performed. The intensity of zymosan-induced
generation of reactive oxygen species by phagocytes is
determined. The indicator of the reserve of functional
activity of phagocytes is determined. If the value of thesaid indicator is 2.8–3.3 r.u. — HFRS of moderate
severity is diagnosed, if the value of the said indicator
is 2.0–2.7 r.u. — severe HFRS is diagnosed, if the value
of the said indicator is 1.9 r.u. and less — severe HFRS
with acute renal failure is diagnosed.EFFECT: method provides a simplified and accurate
diagnosis of the severity of HFRS by assessing the
functional reserve of the phagocytic link of the immune
system.

1 cl, 6 ex

Изобретение относится к медицине, а именно к патофизиологии, лабораторной диагностике, инфекционных болезней, терапии и может быть использовано для диагностики тяжести течения геморрагической лихорадки с почечным синдромом, осложненным острой почечной недостаточностью.

5 Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) - острое вирусное инфекционное заболевание природно-очагового характера. ГЛПС вызывается РНК-содержащим ортохантавирусом (семейство Hantaviridae, отряд Orthohantavirus) [Liem, T. et al., 2011; Jiang, H., 2016; Lee, S.A. et al., 2018; Гилязова И.Р. и др., 2023]. ГЛПС занимает верхние позиции в перечне самых распространенных природно-очаговых
10 заболеваний человека в Российской Федерации. Наибольшую долю всей заболеваемости ГЛПС в России составляет Приволжский федеральный округ (ПФО), в первую очередь - республика Башкортостан. Летальность при ГЛПС в Российской Федерации составляет 1-10% в зависимости от регионов РФ. Острая почечная недостаточность (ОПН) при ГЛПС является одним из основных и грозных осложнений данной нозологии. ОПН -
15 это синдром внезапной потери выделительной функции почек, сопровождающийся олиго- и/или анурией, протеинурией, гематурией и быстрым снижением скорости клубочковой фильтрации (СКФ), что приводит к отекам, нарушениям электролитного и кислотно-щелочного баланса [Ускова Ю.Г., Павелкина В.Ф. и др. 2018, Галимова С.Ш., и др., 2023]. Повреждение почек, как правило, связано с иммунопатологическими
20 механизмами, вызывающими характерное ухудшение функции эндотелиальных клеток и нарушение барьерных функций сосудистой сети.

Многочисленные исследования указывают, что первичным фактором иммунологической защиты при ГЛПС является фагоцитарное звено. На изменение показателей фагоцитоза, влияет, прежде всего, наличие первичных и вторичных
25 повреждений клеток, за счет активации перекисного окисления липидов приводящих к снижению фагоцитарной активности клеток фагоцитов. Одним из критериев диагностики тяжести прогноза течения геморрагической лихорадки с почечным синдромом является анализ определения функциональных резервов метаболизма фагоцитов.

30 Известен способ дифференциальной диагностики инфекционных заболеваний на догоспитальном этапе [патент RU 2341803, 2008], который предполагает исследование мазка крови больного, окрашенного цитохимическим методом Суданом черным В и определение липидного индекса нейтрофилов. В зависимости от полученных значений липидного индекса нейтрофилов выставляется предварительный диагноз - ГЛПС.

35 Недостатки данного метода:

1. Анализ основан лишь на визуальном исследовании крови методом использования специального красителя.
2. Имеет субъективный характер, зависящий от лабораторных навыков лаборанта.
3. Недостаточно высокая точность диагностических исследований.

40 Известен способ дифференциальной диагностики геморрагической лихорадки с почечным синдромом от острых респираторных вирусных инфекций и воспалительных заболеваний почек, заключающийся в том, что у больного проводят комплексное хемилюминесцентное исследование клеток. При повышении хемилюминесценции до значения 51 ± 12 единиц диагностируют геморрагическую лихорадку с почечным
45 синдромом [патент № RU 2104540, 1998].

Наиболее близким аналогом изобретения является способ прогнозирования тяжести геморрагической лихорадки с почечным синдромом, заключающийся в том, что проводят общее и биохимическое исследование крови, определяют: гематокрит,

относительное содержание сегментоядерных и палочкоядерных лейкоцитов и моноцитов, концентрацию креатинина и С-реактивного белка. Вычисляют значения функций классификации степеней тяжести ГЛПС по формулам дискриминантного анализа [патент RU 2688691, 2019]. Недостатками прототипа являются трудоемкость и сложность

5 расчета ввиду использования большого количества показателей и формул расчета. Задачей изобретения является разработка способа диагностики степени тяжести ГЛПС по показателям функционального резерва фагоцитарного звена системы иммунитета.

Технический результат при использовании изобретения - упрощение способа при высокой точности диагноза.

10 Предлагаемый способ диагностики степени тяжести геморрагической лихорадки с почечным синдромом осуществляется следующим образом. Забор крови проводят из локтевых вен у пациентов с ГЛПС в утренние часы в период с 8 ч до 10 ч. по стандартной методике (Меньшиков В.В. и др. 1999). В кровь добавляют гепарин в количестве 50 ед./мл и разливают в лунки 96-луночного пластикового планшета. Для стимуляции

15 кислород-зависимого метаболизма во все лунки добавляют по 0,01 мл суспензий с объектами фагоцитоза - частицами зимозана в виде суспензии на изотоническом 0,9% растворе натрия хлорида (зимозан - биополимер, выделенный из оболочек дрожжевых клеток и состоящий в основном из глюкана) и инкубируют при 37°C в течение 15 минут. Методом люминол-зависимой хемилюминесценции определяют интенсивность зимозан-

20 индуцированной генерации активных форм кислорода фагоцитами. Интенсивность генерации фагоцитами активных форм кислорода (АФК) определяют с помощью регистрации уровня люминолзависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ) в течение 5 минут. Для этого 0,1 мл крови вносят в 2 мл раствора люминола 10^{-5} М на физиологическом

25 растворе и определяют интенсивность индуцированного (Iind) и спонтанного свечения (Isp) методом регистрации хемилюминесценции.

Затем оценивают резерв функциональной активности фагоцитов по формуле:

$$X = \frac{Iind - Isp}{Isp},$$

где:

где X - резерв функциональной активности фагоцитов;

Iind - интенсивность индуцированного свечения крови,

Isp - интенсивность спонтанного свечения крови.

Полученные результаты пересчитывают в усл. ед. Одна условная единица - $5,1 \cdot 10^5$ квант/с.

При значении резерва функциональной активности фагоцитов в цельной крови 2,8-3,3 усл. ед. диагностируют ГЛПС средней степени тяжести, 2,0-2,7 усл. ед. - ГЛПС

40 тяжелой степени тяжести, 1,9 усл. ед. и менее - ГЛПС тяжелой степени с острой почечной недостаточностью (ОПН). Проведено исследование на 105 пациентах с ГЛПС, проходивших лечение в стационаре на базе Республиканской клинической инфекционной больницы г. Уфы. Группу пациентов со средней степенью тяжести ГЛПС составили 35 больных, с тяжелой степенью - 35 человек, с ОПН - 35 человек, группу сравнения

45 составили 46 здоровых индивидов. Образцы крови пациентов собирались в день госпитализации. Повторный забор крови проводили через 7 дней. Ни один из пациентов до сбора крови не получал противовирусное лечение. Все пациенты с ГЛПС инфицированы PUUV. Диагноз ГЛПС был основан на клинических данных (лихорадка

> 38°C, острое повреждение почек, тромбоцитопения) и был подтвержден серологически.

Для определения метаболизма фагоцитов использована венозная гепаринизированная кровь - с добавлением гепарина 50 ед./мл, которую разливали в лунки 96-луночного
 5 пластикового планшета. Для стимуляции кислород-зависимого метаболизма во все лунки добавляли по 0,01 мл суспензий с объектами фагоцитоза - частицы зимозана в виде суспензии на изотоническом 0,9% растворе натрия хлорида (зимозан - биополимер, выделенный из оболочек дрожжевых клеток и состоящий в основном из глюкана) и инкубировали при 37°C в течение 15 минут. Интенсивность генерации фагоцитами АФК определяли с помощью регистрации уровня ЛЗХЛ. Для этого 0,1 мл крови вносят в 2
 10 мл раствора люминола 10^{-5} М на физиологическом растворе и определяли интенсивность индуцированного и спонтанного свечения (I) в течение 5 минут.

Для полной характеристики активности фагоцитарного звена системы иммунитета необходимо иметь представление о емкости этого функционального резерва. Для оценки резерва функциональной активности фагоцитов крови применялась формула,
 15 показывающая кратность отношения резерва к спонтанному свечению

$$I_{ind} - I_{sp}$$

$$X = \frac{I_{ind} - I_{sp}}{I_{sp}},$$

$$I_{sp}$$

20 где X - функциональный резерв;

I_{ind} - максимальная интенсивность индуцированного свечения крови

I_{sp} - максимальная интенсивность спонтанного свечения крови.

Полученные результаты пересчитывали в усл. ед

При значении резерва функциональной активности фагоцитов в цельной крови 2,8-
 3,3 усл. ед. диагностируют ГЛПС средней степени тяжести, 2,0-2,7 усл. ед. - ГЛПС
 25 тяжелой степени тяжести, 1,9 усл. ед. и менее - ГЛПС тяжелой степени с острой почечной недостаточностью ($p \leq 0.05$). Разработанный способ диагностики рекомендуется применять для оценки тяжести течения геморрагической лихорадки с почечным
 30 синдромом. Угнетение генерации АФК клетками крови и, следовательно, защитной функции крови при действии вируса ГЛПС является негативным фактором, поскольку приводит к снижению адаптационных возможностей организма, прежде всего угнетению фагоцитарного звена иммунологической реактивности.

Сущность изобретения поясняется следующими клиническими примерами.

35 Пример 1

Пациент С., 47 лет, поступила в Республиканскую клиническую больницу №4 г. Уфы с диагнозом: Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом. Госпитализирована на 6-й день болезни в состоянии средней тяжести с явлениями интоксикации, болевым синдромом в поясничной области. В общем анализе крови - лейкоцитоз до 9×10^9 ; в
 40 биохимическом анализе крови - креатинин 180 мкмоль/л, мочевины 6,2 ммоль/л. В анализе мочи - изостенурия, протенурия до 0,033%, лейкоциты - единичные, эритроциты - 2-4-6 в поле зрения, гиалиновые цилиндры. Показатель функционального резерва фагоцитов в крови у пациентки составил 3,3 усл. ед.

Заключение: Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, средней степени
 45 тяжести, верифицированная методом изучения показателя функционального резерва фагоцитов в цельной крови. У пациентки диагноз подтвержден методом нарастания титра антител в парных сыворотках.

Пример 2

Пациент Ф., 31 лет, поступил в Республиканскую клиническую больницу №4 г. Уфы с диагнозом: Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, на 7-й день болезни в состоянии средней тяжести. При поступлении наблюдались: выраженная интоксикация, лихорадка, болевой, выраженный астеновегетативный синдром, ухудшения зрения. На 7 сутки отмечается снижение суточного диуреза до 700 мл. В общем анализе крови - лейкоцитоз до $11,5 \times 10^9/\text{л}$, креатинин - 254 мкмоль/л, мочевины - 17,2 мкмоль/л. В анализе мочи: протенурия до 1,65%, эритроциты - до 10 в поле зрения большом количестве, зернистые и гиалиновые цилиндры, клетки Дунаевского. Показатель функционального резерва фагоцитов в цельной крови у пациента составил 2,8 усл. ед. На фоне интенсивной терапии, на 10 день болезни, диурез начал увеличиваться, состояние больного улучшилось. Анализы нормализовались, но в моче остались следы белка, гипостенурия. Заключение: Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, средней степени тяжести, верифицированная методом изучения показателя функционального резерва фагоцитов в цельной крови у пациента. Диагноз подтвержден методом нарастания титра антител в парных сыворотках.

Пример 3

Больной И., 30 лет, поступил в городскую больницу с диагнозом геморрагической лихорадки с почечным синдромом. На 3-й день болезни состояние ухудшилось. Появилась лихорадка до 39 градусов, рвота, кровавые диареи. Пациент жаловался на боль в животе и поясничной области. В общем анализе крови - снижение гемоглобина до 90 г/л, тромбоцитопения, повышение уровня креатинина до 450 мкмоль/л. В общем анализе мочи - белок 2,5%, появление эритроцитов и цилиндров. Количественное определение антител к вирусу показало их наличие. Диагноз был подтвержден клинически и методом количественного определения антител. Показатель функционального резерва фагоцитов в цельной крови у пациента составил 2,7 усл. ед.

Заключение: Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом тяжелой степени, верифицированная методом изучения показателя функционального резерва фагоцитов в цельной крови. Диагноз подтвержден методом нарастания титра антител в парных сыворотках.

Пример 4

Больной Н., 45 лет, обратился в больницу с жалобами на головную боль, лихорадку, гиперемии глаз, сильную боль в мышцах и суставах. На 3-й день болезни он был госпитализирован с подозрением на геморрагическую лихорадку с почечным синдромом. У больного был олигоурический период длительностью 5 дней, диурез составлял 300 мл в сутки при высоком содержании креатинина в крови - 512 мкмоль/л. Общий анализ мочи показал высокое содержание белка - 1,8%, анализ крови выявил умеренный лейкоцитоз и снижение числа тромбоцитов. Показатель функционального резерва фагоцитов в цельной крови у пациента составил 2,0 усл. ед.

Заключение: Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом тяжелой степени без ОПН, верифицированная методом изучения показателя функционального резерва фагоцитов в цельной крови у пациента. Диагноз подтвержден методом нарастания титра антител в парных сыворотках.

Пример 5

Больная С., 47 лет, поступила в Республиканскую клиническую больницу №4 г. Уфы с подозрением на диагноз: геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, на 4-й день болезни в тяжелом состоянии с явлениями интоксикации, болевым синдромом, в поясничной области, боли в животе, петехиальная сыпь на теле, тошнота, рвота, выраженная слабость. Олигоурия развилась на 5 день болезни, количество мочи до 600

мл в сутки. С 7-го дня болезни развилась анурия. Объем мочи составлял до 350 мл в сутки. Анурия длилась до 12 дня болезни. В общем анализе крови: умеренный лейкоцитоз, в биохимическом анализе крови: креатинин 468 мкмоль/л, мочевины 19,2 ммоль/л., ионы калия - 7,8 моль/л., снижение протромбинового индекса. В общем анализе мочи - гипостенурия, протенурия до 3,2%, лейкоциты - единичные, микрогематурия, гиалиновые цилиндры, клетки Дунаевского. Показатель функционального резерва фагоцитов в крови у пациентки составил 1,9 усл. ед. Заключение: Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом тяжелой степени с ОПН: диурез <0,5 мл/кг в час в течение 12 часов, верифицированная методом изучения показателя функционального резерва фагоцитов в цельной крови у пациента. Диагноз подтвержден методом нарастания титра антител в парных сыворотках.

Пример 6

Пациент В., 53 г., поступил в Республиканскую клиническую больницу №4 г. Уфы подозрением на диагноз: Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, с лихорадкой в течение 3 дней, астеновегетативным синдромом, слабость, со 2-го дня диспепсический синдром. В общем анализе крови: умеренный лейкоцитоз, в биохимическом анализе крови: креатинин 43 мкмоль/л, мочевины 6,2 ммоль/л. Показатель функционального резерва фагоцитов в крови у пациента составил 0,7 усл. ед.

Заключение: Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом тяжелой степени с ОПН: содержание креатинина в сыворотке $\geq 0,3$ мг/дл (43 мкмоль/л) в течение 48 часов, увеличение сывороточного креатинина в $\geq 1,5$ раза по сравнению с предыдущими 7 днями, объем мочи <0,5 мл/кг/час в течение 6 часов, верифицированная методом изучения показателя функционального резерва фагоцитов в цельной крови у пациента. Диагноз подтвержден методом нарастания титра антител в парных сыворотках.

Преимущества заявляемого метода:

1. Применение показателей фагоцитоза, кислородзависимого метаболизма и функционального резерва фагоцитов в цельной крови в качестве биомаркера тяжести течения геморрагической лихорадки с почечным синдромом может быть использовано в практической и теоретической медицине.

2. Эффективность предлагаемого способа состоит в том, что с помощью метода регистрации хемилюминесценции цельной крови возможно объективно и своевременно оценить состояние больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом, установить степень тяжести заболевания

3. Предлагаемый способ диагностики является дополнительным перспективным методом раннего выявления ГЛПС с возможностью его использования для коррекции нарушений гемостаза и осложнений в виде ОПН.

(57) Формула изобретения

Способ диагностики степени тяжести геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС), включающий исследование цельной крови, отличающийся тем, что проводят люминол-зависимую хемилюминесценцию гепаринизированной цельной крови с добавлением зимозана, определяют интенсивность зимозан-индуцированной генерации активных форм кислорода фагоцитами, оценивают резерв функциональной активности фагоцитов по формуле:

$$X = \frac{I_{\text{ind}} - I_{\text{sp}}}{I_{\text{sp}}},$$

где:

X – резерв функциональной активности фагоцитов, усл.ед.;

I_{ind} – интенсивность индуцированного свечения крови крови, квант/с;

I_{sp} – интенсивность спонтанного свечения крови, квант/с;

- 5 и при значении резерва функциональной активности фагоцитов 2,8-3,3 усл. ед. диагностируют ГЛПС средней степени тяжести, 2,0-2,7 усл. ед. – ГЛПС тяжелой степени тяжести, 1,9 усл. ед. и менее - ГЛПС тяжелой степени с острой почечной недостаточностью.

10

15

20

25

30

35

40

45