



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) UA

(11) 116003

(13) U

(51) МПК

G01N 33/493 (2006.01)

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки:	u 2016 09247	(72) Винахідник(и):	Чуб Ольга Ігорівна (UA), Більченко Олександр Вікторович (UA)
(22) Дата подання заявки:	05.09.2016	(73) Власник(и):	ХАРКІВСЬКА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ ПІСЛЯДИПЛОМНОЇ ОСВІТИ (ХМАПО), вул. Амосова, 58, м. Харків, 61176 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель:	10.05.2017		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	10.05.2017, Бюл.№ 9		

## (54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ АНТИБІОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТІ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ПІЄЛОНЕФРИТ ІЗ СУПУТНІМ ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ 2 ТИПУ

### (57) Реферат:

Спосіб діагностики антибіотикорезистентності у хворих на хронічний пієлонефрит з супутнім цукровим діабетом 2 типу включає дослідження біологічного матеріалу. Спочатку визначають наявність факторів, які достовірно пов'язані з виявленням плазмід-індукованих механізмів резистентності, а саме: ХХН III та IV стадій, АГ, фактів стаціонарного лікування упродовж останнього року та прийому β-лактамів та/або фторхінолонів з різних причин у поточному році, віковий діапазон старше 55 років, тривалість ХП більше 10 років; потім проводять діагностику експресії плазмідних βЛРС та генів резистентності до фторхінолонів методом полімеразної ланцюжкової реакції, проте, у разі відсутності факторів ризику, але наявності бактеріальної резистентності in vitro до амінопеніцилінів, слід проводити визначення βЛРС типів blaCTX-M, blaTEM, blaSHV; при наявності бактеріальної резистентності in vitro до цефалоспоринів - βЛРС, протеїнів QnrA та AAC(6 ')-Ib-cr; при наявності бактеріальної резистентності in vitro до фторхінолонів - βЛРС, QnrA, AAC(6 ')-Ib-cr та ефлюкс насос QepA; при наявності бактеріальної резистентності in vitro до аміноглікозидів - blaCTX-M, QnrA, QepA.

UA 116003 U



Корисна модель належить до медицини, а саме до терапії і може бути використана для визначення необхідних антибіотиків для лікування хронічного пієлонефриту з супутнім цукровим діабетом 2 типу.

На тлі цукрового діабету (ЦД), ХП діагностується практично у кожного четвертого хворого, що у 2-3 рази частіше, ніж в загальній популяції. Крім того, у пацієнтів із цукровим діабетом, ХП, в більшості випадків, протікає без симптомів, що може призвести до серйозного пошкодження нирок з розвитком ниркової недостатності. Атипові та резистентні ІСС також частіше зустрічаються у пацієнтів із ЦД. Тому якісна діагностика та лікування ХП, особливо на тлі ЦД, є актуальним завданням сучасної медичної практики.

Ефективність лікування хронічного пієлонефриту (ХП) значною мірою лімітується формуванням стійкості до антибактеріальних препаратів (АБП). Резистентність до АБП збільшує захворюваність, смертність та витрати на лікування. Проте, незважаючи на серйозність проблеми антибіотикорезистентності і величезної кількості досліджень, проведених у цьому напрямку, маловивченою залишається резистентність, що пов'язана з перенесенням генів стійкості між бактеріями мобільними ДНК-плазмідами.

Відомим є спосіб визначення антибіотикорезистентності, який здійснюють диско-дифузійним методом Bauer-Kirby на середовищі Хінтон-Мюллера з використанням готових комерційних дисків відповідно до діючих нормативних документів. [Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів: Наказ. - [Чинний від 2007-04-05]. - К.: МОЗ України, 2007. - 78 с - (Нормативний документ МОЗ України. Вказівки, Наказ).] Проте, цей спосіб не враховує можливість визначення генетичних механізмів резистентності, зокрема індукованих плазмідами, та часовий інтервал дослідження досить тривалий (7-10 днів).

Найближчим аналогом є спосіб бактеріологічного дослідження сечі з визначенням чутливості виділених збудників до антибіотиків [Колесник М.О. Уніфікований клінічний протокол медичної допомоги: діагностика, лікування та профілактика хронічного неускладненого та ускладненого пієлонефриту з рецидивним перебігом / М.О. Колесник, Н.М. Степанова, О.В. Художина та ін. // Український журнал нефрології та діалізу. - 2012.-№4(36).- С 63-69.] Обсяг і тривалість терапії залежать від віку, статі хворого, наявності ускладнень, супутньої патології та частоти рецидивів.

Недоліки способу пов'язані з тривалістю дослідження (7-10 днів), тоді як антибактеріальну терапію в більшості випадків треба починати одразу; емпірично, можливою невідповідністю результатів чутливості *in vitro* та *in vivo*, що пов'язано з індивідуальними особливостями мікро- та макроорганізмів. Крім того, внаслідок швидкого поширення генів резистентності за допомогою плазмід, кількість штамів *Escherichia coli* зі зниженою чутливістю до фторхінолонів, 3-ї генерації цефалоспоринових та аміноглікозидів, щороку збільшується (European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2012. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2013). У зв'язку з тим, що мобільні плазміди являють собою дрібні генетичні елементи у вигляді зв'язаних у кільце ниток ДНК, вони здатні переносити від одного до декількох генів резистентності не тільки серед бактерій одного виду, але і мікробів різних видів (Carattoli A., 2011), що призводить до обмеження терапевтичних можливостей.

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалення способу діагностики антибіотикорезистентності у хворих на хронічний пієлонефрит з супутнім цукровим діабетом 2 типу, в якому за рахунок зміни характеру дослідження, досягається можливість раціонального призначення антибактеріальних препаратів, не чекаючи результатів бактеріологічного дослідження сечі, та враховуючи експресію різних типів - індукованих плазмідами генів антибіотикорезистентності, підвищити ефективність емпіричної антибіотикотерапії та зменшити поширення бактеріальної мультирезистентності.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб діагностики антибіотикорезистентності у хворих на хронічний пієлонефрит з супутнім цукровим діабетом 2 типу, який включає дослідження біологічного матеріалу, в якому згідно з корисною моделлю, визначають наявність факторів, що достовірно пов'язані з виявленням плазмід-індукованих механізмів резистентності, а саме: ХХН III та IV стадій; АГ; віку старше 55 років, тривалості ХП більше 10 років, фактів стаціонарного лікування упродовж останнього року та прийом β-лактамів та фторхінолонів з різних причин у поточному році; у пацієнтів з наявністю 2-х та більше факторів проводять дослідження експресії плазмідних βЛРС та генів резистентності до фторхінолонів методом полімеразної ланцюжкової реакції. При відсутності факторів ризику проте наявності бактеріальної резистентності *in vitro* до амінопеніцилінів, цефалоспоринових та фторхінолонів рекомендовано визначати експресію плазмід-індукованих βЛРС та генів резистентності до фторхінолонів - *QnrA*, *AAC(6')-Ib-cr*; при наявності резистентності до аміноглікозидів генів

blaCTX-M, QnrA та QerA; при наявності резистентності до цефалоспоринов - експресію  $\beta$ ЛРС та генів QnrA та AAC(6')-Ib-cr.

Таким чином, поставлена задача вирішується наступним алгоритмом діагностичних заходів: при наявності клінічних симптомів загострення хронічного пієлонефриту у хворих ЦД 2 типу, до обсягу стандартних обстежень (скринінг, лабораторні дослідження крові та сечі, визначення активності лейкоцитестерази, культуральне дослідження сечі) додається оцінка факторів ризику виявлення плазмідних генів резистентності та/або, при наявності бактеріальної резистентності *in vitro* до антибіотиків визначення експресії плазмідних  $\beta$ -лактамаз розширеного спектра та генів стійкості до фторхінолонів.

Отже, дослідження експресії плазмід-індукованих генів резистентності серед уропатогенів є актуальним і перспективним напрямом, який дозволить поглибити розуміння механізмів формування резистентності й підійти з нової позиції до підвищення ефективності антибактеріальної терапії. Крім того, ідентифікація резистентних бактеріальних штамів, є необхідним для епідеміологічного вивчення та інфекційного контролю з метою виявлення плазмідної мультirezистентності та розробки ефективних заходів запобігання її поширенню.

Суть корисної моделі пояснює фіг. 1-2, де на фіг. 1 зображений алгоритм визначення плазмід-індукованої антибіотикорезистентності у хворих на ХП і супутній ЦД 2 типу в залежності від наявності/відсутності факторів ризику виявлення плазмідних генів стійкості та бактеріальної чутливості/резистентності *in vitro*, на фіг. 2 - тактика ведення та обсяг діагностичних заходів у пацієнтів з хронічним пієлонефритом і супутнім цукровим діабетом 2 типу.

Спосіб, що заявляється, здійснюють таким чином.

При верифікації діагнозу ХП і ЦД 2 типу та наявності у пацієнта факторів, пов'язаних з виявленням плазмід-індукованих механізмів резистентності (ХХН III та IV стадій; АГ; віку старше 55 років, тривалості ХП більше 10 років, фактів стаціонарного лікування упродовж останнього року та прийом  $\beta$ -лактамів та фторхінолонів з різних причин у поточному році), в план обстеження доцільно включати дослідження експресії плазмідних генів стійкості -  $\beta$ ЛРС та генів резистентності до фторхінолонів. У разі відсутності факторів ризику проте наявності бактеріальної резистентності *in vitro* до амінопеніцилінів слід проводити визначення  $\beta$ ЛРС типів blaCTX-M, blaTEM, blaSHV; при наявності бактеріальної резистентності *in vitro* до цефалоспоринов -  $\beta$ ЛРС, протеїнів QnrA та AAC(6')-Ib-cr; при наявності бактеріальної резистентності *in vitro* до фторхінолонів  $\beta$ ЛРС, QnrA, AAC(6')-Ib-cr та ефлюкс насос QerA; при наявності бактеріальної резистентності *in vitro* до аміноглікозидів - blaCTX-M, QnrA, QerA.

Дослідження плазмід-індукованих механізмів резистентності полягають в діагностиці генів blaTEM, blaSHV і blaCTX-M, що кодують вироблення  $\beta$ -лактамаз розширеного спектра та генів QnrA, AAC(6')-Ib-cr, QerA, які опосередковують стійкість до фторхінолонів. Визначення експресії плазмідних генів резистентності проводять методом полімеразної ланцюжкової реакції (ПЛР) з відповідними праймерами для цих генів. ПЛР здійснюється за стандартною схемою за допомогою програмованого термоциклера "Терцик-2" фірми ДНК-технологія (ARNFINN SUNDSFJORD, 2004).

Приклад. Хвора С, 62 років, госпіталізована в стаціонар зі скаргами на підвищення температури тіла до 37.8С, озноб, ниючі болі в поперековій області, зміну кольору сечі до мутного. Установлений попередній клінічний діагноз: ХБП II ст., пієлонефрит, фаза загострення.

Пацієнтці призначене стандартне клінічне та лабораторне обстеження. Додатково проведено визначення факторів ризику виявлення плазмідних генів резистентності, і встановлено, що: хвора 58 років, страждає хронічним пієлонефритом більше 10 років, артеріальну гіпертензію діагностовано з 50 років, у поточному році лікувалася цефтриаксоном ( $\beta$ -лактамний антибіотик) з приводу пневмонії.

Отже, пацієнтка має 4 фактори ризику виявлення плазмідних генів стійкості, тому в план обстеження ми включили дослідження плазмідних  $\beta$ -лактамаз розширеного спектра та генів стійкості до фторхінолонів. Пацієнтці призначено дезитоксикаційну та спазмолітичну терапію.

По даних клінічних та лабораторних обстежень, попередній клінічний діагноз був підтверджений. По даних додаткових обстежень, було визначено експресію плазмідних  $\beta$ -лактамаз розширеного спектра дії типів blaTEM та blaCTX-M. Згідно з цими результатами, до групи  $\beta$ -лактамних АБП збудники мають бути резистентні, тому ми призначили фторхінолоні-левофлоксацин 500 мг на добу. Через 7 днів ми отримали результати бактеріологічного дослідження сечі, де виділено E.coli 10<sup>6</sup> КУО/мл, що дійсно була резистентна до групи амінопеніцилінів та цефалоспоринов.

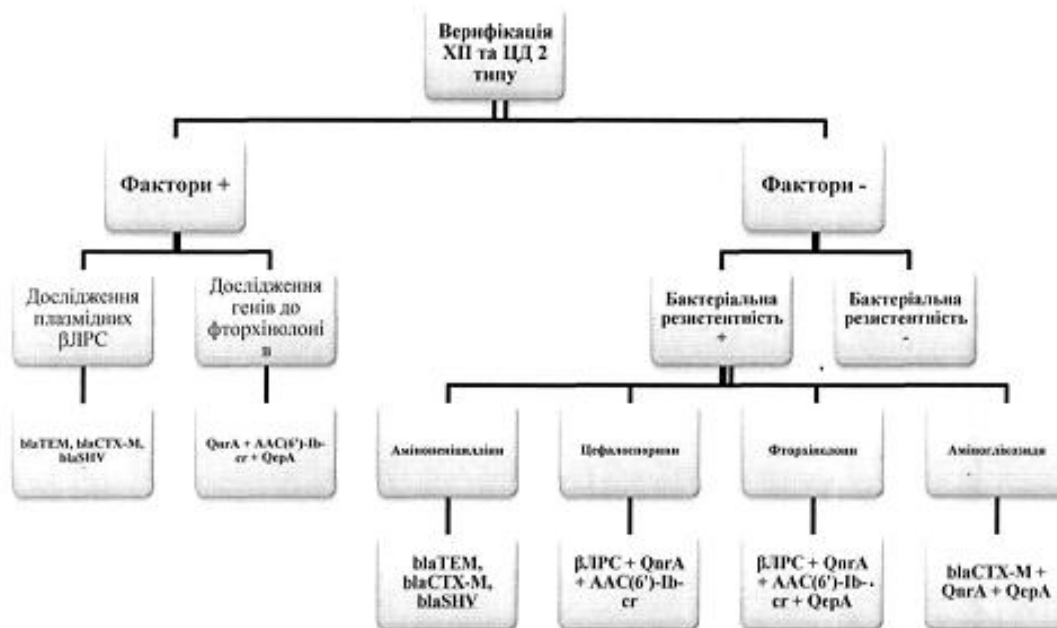
Отже, ми раціонально призначили максимально ефективний антибіотик для емпіричної терапії хронічного пієлонефриту з урахуванням факторів ризику та виявленою експресією

плазмідних генів резистентності, що дозволило не чекати результатів бактеріологічного дослідження сечі.

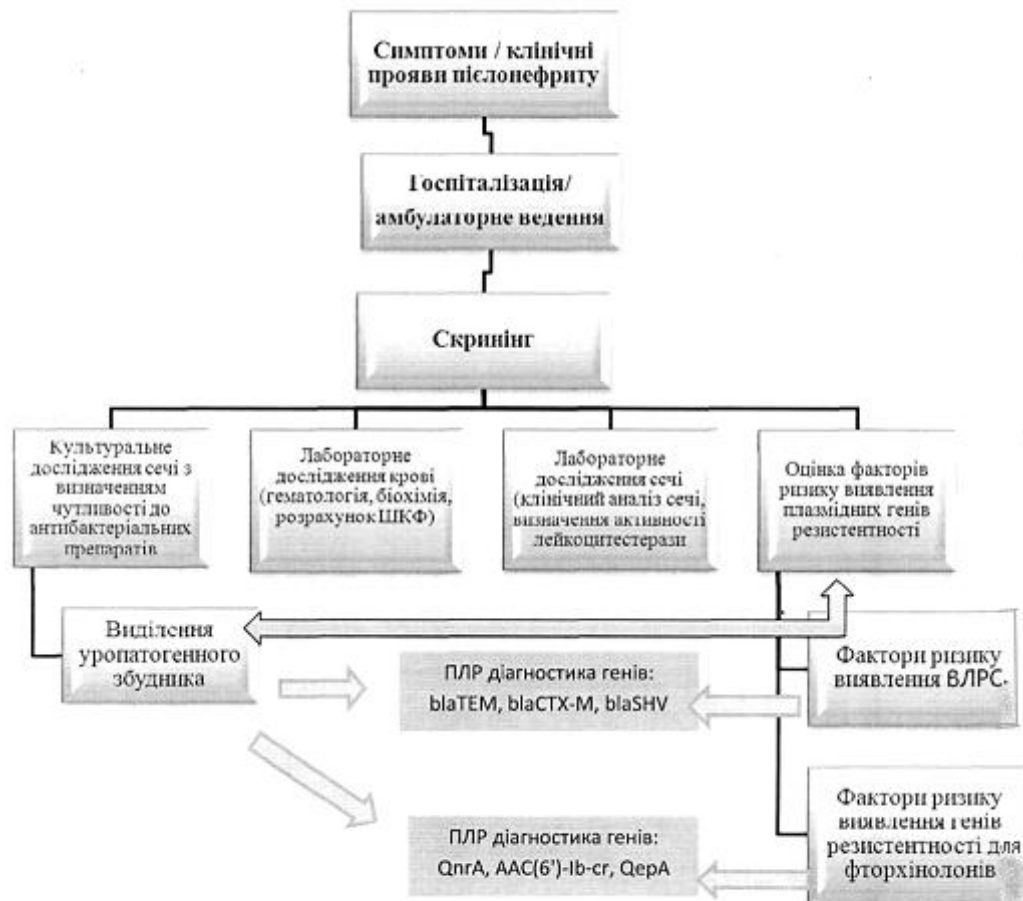
Таким чином, запропонований спосіб діагностики антибіотикорезистентності у хворих на хронічний пієлонефрит з супутнім цукровим діабетом 2 типу дозволяє відокремити основні категорії пацієнтів, яким доцільно в план обстеження включати дослідження експресії плазмідних генів стійкості, що сприяє поліпшенню діагностики антибіотикорезистентності та може використовуватися закладами практичної охорони здоров'я.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб діагностики антибіотикорезистентності у хворих на хронічний пієлонефрит з супутнім цукровим діабетом 2 типу, який включає дослідження біологічного матеріалу, який відрізняється тим, що спочатку визначають наявність факторів, які достовірно пов'язані з виявленням плазмід-індукованих механізмів резистентності, а саме: ХХН III та IV стадій, АГ, фактів стаціонарного лікування упродовж останнього року та прийому β-лактамів та/або фторхінолонів з різних причин у поточному році, віковий діапазон старше 55 років, тривалість ХП більше 10 років; потім проводять діагностику експресії плазмідних βЛРС та генів резистентності до фторхінолонів методом полімеразної ланцюгової реакції, проте, у разі відсутності факторів ризику, але наявності бактеріальної резистентності in vitro до амінопеніцилінів, слід проводити визначення βЛРС типів blaCTX-M, blaTEM, blaSHV; при наявності бактеріальної резистентності in vitro до цефалоспоринов - βЛРС, протеїнів QnrA та AAC(6')-Ib-cr; при наявності бактеріальної резистентності in vitro до фторхінолонів - βЛРС, QnrA, AAC(6')-Ib-cr та ефлюкс насос QerA; при наявності бактеріальної резистентності in vitro до аміноглікозидів - blaCTX-M, QnrA, QerA.



Фіг. 1



Фіг. 2