(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 053076 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2026.04.16

(21) Номер заявки
202590440

(22) Дата подачи заявки
2024.12.11

(51) Int. Cl. ***G01N 33/569*** (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

(54) СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИЙ МОЧЕВЫВОДЯЩИХ ПУТЕЙ ПРИ ЦИРРОЗЕ ПЕЧЕНИ С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТАГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ

(43) **2026.04.08**
(96) **2024/EA/0079 (BY) 2024.12.11**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ "ГОМЕЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ" (BY)

(72) Изобретатель:
Стома Игорь Олегович, Малаева Екатерина Геннадьевна, Воропаев Евгений Викторович, Осипкина Ольга Викторовна, Ковалев Алексей Алексеевич, Шафорост Александр Сергеевич, Зятьков Алексей Александрович (BY)

(56) MASLENNIKOV R. et al. Gut dysbiosis is associated with poorer long-term prognosis in cirrhosis, WORLD J. HEPATOL. 2021 May;13(5):557-570, doi: 10.4254/wjh.vl3.i5.557, реферат
RU-C1-2680268
US-B2-10337069
CHEN Y. ET AL. Characterization of Fecal Microbial Communities in Patients with Liver Cirrhosis, HEPATOLOGY 2011; vol. 54, no. 2, p.562-572, реферат

(57) Изобретение относится к медицине, а именно к терапии, гастроэнтерологии, нефрологии, урологии, и может быть использовано для совершенствования диагностики инфекций мочевыводящих путей у пациентов с циррозом печени. Способ диагностики инфекций мочевыводящих путей при циррозе печени с применением метагеномного секвенирования кишечной микробиоты, заключающийся в комбинированном анализе пробы кала, включающем полимеразную цепную реакцию (ПЦР), электрофоретическую детекцию, высокопроизводительное секвенирование по протоколу 16S рРНК с определением последовательности гипервариабельных регионов V3 и V4 гена бактерий и биоинформатический анализ данных с последующим расчетом модифицированного коэффициента дисбиоза MDR (modified dysbiosis ratio) по формуле: MDR=[Gammaproteobacteria(%)+Bacilli(%)/[Prevotella(%)+Clostridioides(%)+Bacteroidota(%)], и при значении MDR больше 1,301 диагностируется инфекция мочевыводящих путей у пациентов с циррозом печени. Предлагаемый способ, в результате совершенствования диагностических технологий в клинике внутренних болезней, позволяет своевременно выявлять пациентов с высоким риском развития неблагоприятных событий и исходов, повышать эффективность оказания медицинской помощи пациентам с циррозом печени.

053076 B1

053076 B1

Область техники

Изобретение относится к медицине, а именно к терапии, гастроэнтерологии, нефрологии, урологии и может быть использовано для совершенствования диагностики инфекций мочевыводящих путей у пациентов с циррозом печени.

Уровень техники

Инфекции мочевыводящих путей (ИМВП) представляют значительный практический интерес ввиду широкой распространенности, наличия осложнений в виде генерализации инфекции с развитием сепсиса, рецидивирующего течения, негативных последствий, связанных с интенсивным применением антибактериальных лекарственных средств, в виде развития Clostridioides difficile-ассоциированных колитов и антибиотикорезистентности.

ИМВП имеют высокое распространение у пациентов с циррозом печени (ЦП) (у госпитализированных пациентов - до 50%), усугубляют естественное течение заболевания и являются независимым предиктором снижения 90-дневной выживаемости пациентов с декомпенсированным циррозом [1]. У большинства пациентов с ЦП распространена бактериурия, особенностью которой является преобладание представителей семейства Enterobacteriaceae и наличие в моче смешанной микрофлоры. ИМВП являются потенциальным триггером прогрессирования почечной недостаточности у пациентов с ЦП, несмотря на разрешение инфекции, и ассоциированы с развитием тяжелой стадии почечной патологии [2].

Проведя патентный поиск, нами не выявлено прямого прототипа предлагаемого способа диагностики ИМВП при ЦП с применением метагеномного секвенирования кишечной микробиоты.

Наиболее распространенным способом диагностики ИМВП является микробиологическое исследование мочи, включающее посев материала на питательные среды, которые позволяют проводить обнаружение и идентификацию микроорганизмов, определять степень бактериурии по количеству выделенных колоний, чувствительность бактерий к антибактериальным лекарственным средствам [3]. Микробиологическое исследование мочи позволяет идентифицировать быстрорастущие, аэробные уропатогены с хорошей диагностической точностью, в совокупности с клиническими и лабораторно-инструментальными данными. При отсутствии клинических проявлений (болевого синдрома, дизурических расстройств, озноба, повышения температуры тела и других) и лабораторных маркеров воспаления и при наличии микроорганизмов в мочевых путях в клинически значимом титре (равном или более 10^5 КОЕ /мл в двух последовательных анализах у женщин и одном анализе у мужчин, при катетеризации - при концентрации более 10^2 КОЕ /мл у лиц обоих полов) диагностируется бессимптомная бактериурия, которая не требует назначения антибактериальных лекарственных средств [4].

Недостатком данного способа является то, что для большинства пациентов с ЦП в стадии декомпенсации характерен синдром иммунной дисфункции и наблюдаются признаки системного воспалительного ответа, что может способствовать генерализации процесса и маскировать малосимптомное течение ИМВП. Кроме того, наличие у всех пациентов с декомпенсированным ЦП печеночной энцефалопатии затрудняет сбор объективного анамнеза заболевания и жалоб, характерных для ИМВП (дизурических расстройств и других), что представляет трудности для диагностики симптомных ИМВП и проведения дифференциальной диагностики между бессимптомной бактериурией и ИМВП и, соответственно, выбора тактики ведения пациента.

Кроме особенностей клинико-лабораторных проявлений ИМВП при ЦП следует отметить ограничения микробиологического метода исследования мочи. Обычные культуральные методы микробиологии не позволяют выявлять атипичные медленнорастущие, анаэробные и требовательные в плане питательных сред патогены. В то же время достижения в технологии секвенирования микробной 16S рРНК позволили обнаружить наличие богатой и разнообразной микробиоты мочевых путей, которая может вызывать ИМВП [5, 6].

Существует прямая связь состояния кишечной микробиоты с развитием ИМВП: источником большинства возбудителей, выделяемых при данном заболевании из мочи пациентов, являются формируемые уропатогенами резервуары в кишечнике [7-9]. Последующая контаминация промежности, периуретрального пространства и миграция в мочевыводящие пути - неотъемлемая часть патогенеза большинства неосложненных эпизодов ИМВП [10]. Развивающееся при дисбиозе кишечника смещение баланса микробиоты с увеличением представленности условно-патогенных и патогенных бактерий может рассматриваться как независимый фактор риска развития ИМВП [11]. Другой компонент дисбиоза - уменьшение представленности полезных комменсалов. Они способствуют устойчивости кишечника к колонизации различными патогенами, конкурируя за питательные вещества и участки для адгезии, изменяют pH среды и образуют антимикробные метаболиты [12]. Важность комменсалов подтверждается недавними исследованиями, показывающими, что уровирулентность патогенных штаммов не определяется конкретной генетической структурой, а значение имеет экспрессия таких генов, которая в свою очередь может зависеть от различных факторов, в том числе от представленности комменсальной микробиоты [13]. Используя метагеномные методы, установлено, что пациенты с рецидивирующей ИМВП в анамнезе имеют менее разнообразную кишечную микробиоту, обедненную бутиратом, который выполняет множество функций, способствуя целостности кишечного барьера [14]. M. Magruder и соавт.

было установлено, что повышенное количество Escherichia coli в кишечнике связано с будущим развитием E. coli-бактериурии и ИМВП [15]. В другом исследовании у детей с ИМВП было обнаружено повышение E. coli и снижение титров Bifidobacterium spp. и Lactobacillus spp. Отмечалась высокая частота и титры других представителей семейства Enterobacteriaceae - Klebsiella spp., Enterobacter spp., Proteus spp. N. Paalanne и соавт. также отметили более высокое содержание Enterobacteriaceae в кишечной микробиоте пациентов с ИМВП по сравнению со здоровыми, и, наоборот, Peptostreptococcaceae были более распространены у здоровых субъектов [16]. M. Magruder и соавт. в другом исследовании продемонстрировали, что высокая относительная численность двух бактериальных таксонов - Faecalibacterium и Romboutsia - может быть связана со снижением риска бактериурии Enterobacteriaceae и ИМВП у реципиентов почечного трансплантата. При этом сообщается об обратной зависимости относительной численности двух вышеупомянутых таксонов с Enterobacteriaceae, что еще раз подтверждает мнение о том, что кишечные комменсальные организмы связаны с более низким риском инфекционных осложнений [17].

Дисбиоз кишечника может быть описан с помощью следующих компонентов: активный рост условно-патогенных микроорганизмов, которые могут вызывать заболевания или обладать провоспалительным потенциалом, уменьшение комменсалов, выполняющих ряд полезных функций, в том числе обладающих противовоспалительным действием, а также уменьшение микробного разнообразия.

Некоторыми исследователями предлагаются коэффициенты дисбиоза при ЦП, которые используют упрощенный подход с расчетом показателя соотношения потенциально патогенных и автохтонных бактерий, которые характеризуются достоверностью и стабильностью с течением времени и упрощают их практическое использование для диагностики заболеваний, например, ИМВП. Так как таксоны Proteobacteria и Bacilli связаны с бактериальной транслокацией и развитием вторичных инфекций некоторыми авторами предлагается модифицированная формула

$$(Bacilli\ (\%) + Proteobacteria\ (\%))/(Clostridia\ (\%) + Bacteroidetes\ (\%))$$

для определения дисбиоза [18].

Описание изобретения

Задачей заявляемого изобретения является разработка способа диагностики инфекций мочевыводящих путей при циррозе печени на основе метагеномного секвенирования кишечной микробиоты, позволяющего достоверно определить наличие данного заболевания, в том числе вызванного некультивируемыми микроорганизмами.

Поставленная задача решается тем, что предложен способ диагностики инфекций мочевыводящих путей при циррозе печени с применением метагеномного секвенирования кишечной микробиоты, заключающийся в комбинированном анализе пробы кала, включающем полимеразную цепную реакцию (ПЦР), электрофоретическую детекцию, высокопроизводительное секвенирование по протоколу 16S рРНК с определением последовательности гипервариабельных регионов V3 и V4 гена бактерий и биоинформатический анализ данных с последующим расчетом модифицированного коэффициента дисбиоза MDR (modified dysbiosis ratio) по формуле:

$$MDR = [Gammaproteobacteria(\%)+Bacilli(\%)]/[Prevotella(\%)+Clostridioides(\%)+Bacteroidota(\%)],$$

и при значении MDR больше 1,301 диагностируется инфекция мочевыводящих путей у пациентов с циррозом печени.

Описание фигур

На фиг. 1 приведены диаграммы сравнения таксонов кала у пациентов с циррозом печени без ИМВП (0) и с ИМВП (1).

На фиг. 2 приведено сравнение групп пациентов с циррозом печени без ИМВП (0) и с ИМВП (1) по уровню MDR кала.

Способ осуществляют следующим образом.

В качестве биологического материала используют кал. Сбор биологического материала для метагеномного секвенирования проводится в специальные сухие стерильные флаконы с использованием одноразовых стерильных лопаток. Хранение образцов кала осуществляется при температуре до минус 80°C.

Критерии включения:

возраст пациентов 18-80 лет;

установленный диагноз - цирроз печени;

информированное согласие пациента.

Критерии исключения:

аутоиммунные заболевания;

ВИЧ положительные;

онкологические заболевания;

трансплантация органов;

прием антибактериальных лекарственных средств или иммунодепрессантов за 1 месяц до исследования.

Метод осуществляется следующим образом.

Проводят экстракцию ДНК из биологического материала с использованием коммерческих наборов, адаптированных для высокопроизводительного секвенирования. Для дальнейшего анализа используют образцы, для которых соотношение экстинкций составляет: $A_{260}/A_{280} \geq 1,67$, $A_{260}/A_{230} \geq 1,90$.

Исследование состава фекальной микробиоты проводят методом высокопроизводительного секвенирования на платформе Illumina MiSeq согласно руководству по пробоподготовке образцов для секвенирования фрагмента гена 16S рРНК прокариот, включающему ряд этапов:

1. Целевая ПЦР. Проводят с использованием набора праймеров на V3-V4 регион гена 16S рРНК прокариот:

прямой V3-V4: 5'cgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagcctacgggnggcwgcag'3,

обратный V3-V4: 5'gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacaggactachvgggtatctaatcc'3.

2. Оценка результата целевой ПЦР. Выполняют проведением электрофоретического разделения нуклеиновых кислот. Для образцов с выявленной на электрофореграмме зоной (около 550 п.н. (пар нуклеотидов)) проводят очистку продуктов целевой ПЦР с использованием магнитных частиц.

3. Очистка продуктов целевой ПЦР и нормализация концентрации образцов.

4. Индексная ПЦР с применением коммерческого набора индексов.

5. Очистка продуктов индексной ПЦР с использованием магнитных частиц.

6. Оценка результата индексной ПЦР. Проводят путем электрофоретического разделения нуклеиновых кислот и выявления зоны около 630 п.н. на электрофореграмме. Выполняют измерение концентрации ДНК с использованием флуориметра и коммерческого набора для измерения концентрации двуцепочечной ДНК.

7. Нормализация концентрации образцов после индексной ПЦР. Приготовление образца для секвенирования проводят путем эквимолярного объединения нормализованных образцов после индексной ПЦР.

8. Приготовление образца для секвенирования с заданной концентрацией для проведения высокопроизводительного секвенирования.

9. Настройка высокопроизводительного секвенатора.

Для определения состава фекальной микробиоты выполняют биоинформатический анализ с использованием специализированного программного обеспечения (FastQC, Trimmonatic, Preprocess 16S, Kraken2).

Проводят расчет модифицированного коэффициента дисбиоза MDR (modified dysbiosis ratio) по формуле:

$$MDR = [Gammaproteobacteria(\%)+Bacilli(\%)]/[Prevotella(\%)+Clostridioides(\%)+Bacteroidota(\%)].$$

При значении MDR больше 1,301 диагностируется инфекция мочевыводящих путей у пациентов с циррозом печени.

Проведено проспективное когортное одноцентровое исследование в соответствии с принципами клинической биоэтики 79 пациентов, находящихся на стационарном лечении в городском отделении гастроэнтерологии с диагнозом "Цирроз печени". У пациентов получено информированное согласие на исследование, утвержденное комитетом по этике учреждения образования "Гомельский государственный медицинский университет" (протокол №4 от 30.09.2021 г.). Пациентам проведено исследование согласно Клинического протокола "Диагностика и лечение пациентов с заболеваниями органов пищеварения", а также сбор и низкотемпературное замораживание образцов кала. Для диагностики ИМВП использованы стандартные критерии на основании микробиологического исследования мочи. Исследование зарегистрировано в Clinicaltrials.gov (NCT05335213). Испытания проводились на базе научно-исследовательской лаборатории учреждения образования "Гомельский государственный медицинский университет".

Высокопроизводительное секвенирование проводилось с помощью генетического анализатора MiSeq (Illumina, США) с использованием протокола, основанного на анализе вариабельных регионов гена 16s рРНК. Результаты 16S секвенирования в виде файлов с набором биологических последовательностей и показателей качества каждого элемента последовательности подверглись программной обработке для получения таблицы таксономических уровней и данных о количественном таксономическом составе для каждого образца. Проверка качества прочтений осуществлялась с помощью программного обеспечения FastQC. Удаление последовательностей праймеров осуществлялось с помощью программного обеспечения preprocess 16S. Удаление низкокачественных фрагментов прочтений выполнялось с помощью программного обеспечения Trimmomatic. Назначение таксономических уровней и количественная оценка состава микробиома выполнялись с помощью программы Kraken 2 (база данных Kraken Standard). Статистическая обработка данных проводилась в среде программирования R (версия 4.2.1) с применением библиотеки tidyverse (version 1.3.1) и пакетов phyloseq (version 1.41.0), rstatix (version

0.7.0), microbiome (version 1.19.0), HMP (version 2.0.1), DESeq2 (version 1.37.4), ANCOMBC (version 1.99.1), datawizard (version 0.4.1), vegan (version 2.6-2). Уровень значимости принят равным 0,05.

Выборка включала 79 пациентов с циррозом печени (К74), в том числе с ИМВП (n=40) и без ИМВП (n=39). Средний возраст пациентов составил 53,9 лет, из них 42 (53,2%) - мужчины, 37 (46,8%) - женщины, класс тяжести А - 17, В - 15, С -47 человек. Значимых различий по полу и возрасту у пациентов без/с ИМВП не установлено (группа пациентов без ИМВП: средний возраст 55,3 лет, мужчин - 23 (59%), женщин - 16 (41%); группа пациентов с ИМВП: средний возраст 52,5 лет, мужчин - 20 (50%), женщин - 20 (50%)($p>0,05$).

Проведен анализ таксономического разнообразия микробиоты кишечника у пациентов с ЦП без ИМВП (n=39) и с ИМВП (n=40)(фиг. 1).

У пациентов с ЦП и наличием ИМВП (по сравнению без ИМВП) наблюдается увеличение насыщенности микробиоты кишечника таксонами Gammaproteobacteria и Bacilli, которые вовлечены в процессы бактериальной транслокации при заболеваниях печени и развитие бактериальных инфекций, в том числе ИМВП, на фоне снижения таксонов Prevotella, Clostridioides, Bacteroidota, представители которого относятся к потенциально полезным бактериям у пациентов с ЦП.

На основании представленных данных о структуре микробиоты кишечника у пациентов с ЦП с ИМВП (n=40) и без ИМВП (n=39) предложена формула для расчета модифицированного коэффициента дисбиоза (modified dysbiosis ratio, MDR):

$$MDR = [Gammaproteobacteria(\%)+Bacilli(\%)]/[Prevotella(\%)+Clostridioides(\%)+Bacteroidota(\%)],$$ где

Gammaproteobacteria (%) - относительная представленность бактерий класса Gammaproteobacteria;

Bacilli (%) - относительная представленность бактерий класса Bacilli;

Prevotella (%) - относительная представленность бактерий рода Prevotella;

Clostridioid.es (%) - относительная представленность бактерий рода Clostridioides;

Bacteroidota (%) - относительная представленность бактерий типа Bacteroidota.

Таким образом, формула MDR включает расчет соотношения насыщенности микробиоты кишечника как потенциально патогенными таксонами, связанными с синтезом эндотоксинов или липополисахаридов, процессом бактериальной транслокации и развитием ИМВП, в том числе с учетом классических возбудителей ИМВП, таких как Escherichia, Klebsiella, Acinetobacter, относящихся к классу Gammaproteobacteria, а также автохтонных таксонов, таких как рода Prevotella, Clostridioides, связанными с образованием короткоцепочечных жирных кислот и вторичных желчных кислот из первичных желчных кислот, которые оказывают протективную роль и препятствуют развитию инфекции у пациентов с циррозом печени.

При значении MDR больше 1,301 можно говорить о наличии ИМВП и значимом различии между группами пациентов без/с ИМВП ($p=0,000311$). Согласно ROC-анализу, данный признак имеет умеренную прогностическую ценность (AUC=0,7314). При значении порога отсечения cut-off=1,301 чувствительность Se=0,5, специфичность Sp=0,8718 (фиг. 2).

Практическую возможность применения способа подтверждают следующие примеры.

Пример 1. Пациент А., мужчина, 48 лет, госпитализирован в отделение гастроэнтерологии с жалобами на слабость, повышение температуры тела до 37,5°С, одышку, пожелтение кожных покровов и склер, увеличение живота, учащенное мочеиспускание. При объективном исследовании: кожные покровы и склеры имеют интенсивную желтую окраску, лимфоузлы не увеличены. В легких дыхание везикулярное, частота дыхания 20 в мин., сатурация 96%. Тоны сердца ритмичные, шумов нет, ЧСС 100 уд. в мин., АД 110/70 мм рт ст. Живот увеличен в объеме за счет асцита, перкуторно размеры печени и селезенки увеличены. Мочеиспускание свободное, безболезненное, 10-12 раз в день, 3-4 раза ночью. Стул оформленный 1 раз в день без патологических примесей. Общий анализ крови: эритроциты $3,79\times10^{12}$/л, тромбоциты 147×10^{9} /л, лейкоциты $12,1\times10^{9}$ /л, гемоглобин 100 г/л, эозинофилы 1,88%, базофилы 1,21%, лимфоциты 44,81%, моноциты 8,3%, нейтрофилы 43,8%, СОЭ 16 мм/ч. Биохимический анализ крови: аланинаминотрансфераза 84 Ед/л, щелочная фосфатаза 125 Ед/л, аспартатаминотрасфераза 60 Ед/л, гамма-глутамилтранспептидаза 128 Ед/л, билирубин общий 252,1 мкмоль/л, общий белок 64 г/л, глюкоза 5,6 ммоль/л, сывороточное железо 11,7 мкмоль/л, С-реактивный белок 10 мг/мл. Общий анализ мочи: относительная плотность 1011, pH кислая, глюкоза, белок, ацетон не обнаружены, лейкоциты 10-12, эритроциты 2-3, эпителий 1-3 в поле зрения. Микробиологическое исследование мочи: выделена Klebsiella pneumoniae в титре 5×10^{4} КОЕ /мл, чувствительная к гентамицину, триметоприму/сульфаметоксазолу, пиперациллину/тазобактаму, имипенему, меропенему.

Компьютерная томография органов грудной клетки: легкие воздушны, без патологических объемных образований и инфильтративных изменений; легочный рисунок не изменен; просвет трахеи и видимых бронхов не деформирован; внутригрудные лимфоузлы не увеличены; плевральные полости свободны. УЗИ органов брюшной полости: признаки цирроза печени. Спленомегалия. Большое количество свободной жидкости в брюшной полости. ЭГДС: варикозные вены пищевода 2 ст. Эритематозная гастропатия.

В связи с наличием у пациента повышения температуры, лекоцитоза, лейкоцитурии, повышения С-реактивного белка, отсутствия диагностического титра Klebsiella pneumoniae при микробиологическом исследовании мочи и отсутствия другого источника инфекции было выполнено метагеномное секвенирование кала с определением модифицированного коэффициента дисбиоза MDR (modified dysbiosis ratio) по формуле:

$$MDR = [Gammaproteobacteria(\%)+Bacilli(\%)]/[Prevotella(\%)+Clostridioides(\%)+Bacteroidota(\%)].$$

Значение MDR составило 1,87, диагностирована инфекция мочевыводящих путей, назначена антибактериальная терапия с положительной динамикой, через 3 дня температура нормализовалась, через 5 дней уровень лейкоцитов крови снизился до $8,7\times10^9$ /л, СОЭ до 10 мм/ч, общий анализ мочи без патологических изменений. При повторном микробиологическом исследовании мочи роста бактерий не получено.

Пример 2. Пациент Б., женщина, 54 года, госпитализирована в отделение гастроэнтерологии с жалобами на увеличение живота в течение 3 месяцев. При объективном исследовании: кожные покровы и склеры желтушны, лимфоузлы не увеличены. Наблюдается симптом астериксиса, инверсия сна, изменение психометрических тестов. В легких дыхание везикулярное, частота дыхания 18 в мин., сатурация 98%. Тоны сердца ритмичные, шумов нет, ЧСС 88 уд. в мин., АД 115/70 мм рт ст. Живот увеличен в объеме за счет асцита, перкуторно размеры печени и селезенки увеличены. Мочеиспускание свободное, безболезненное, 5-6 раз в день, 1-2 раза ночью. Стул оформленный 1 раз в 2 дня без патологических примесей. Общий анализ крови: эритроциты $4,01\times10^{12}$/л, тромбоциты 155×10^9/л, лейкоциты $10,4\times10^9$/л, гемоглобин 108 г/л, СОЭ 12 мм/ч. Биохимический анализ крови: аланинаминотрансфераза 184 Ед/л, щелочная фосфатаза 195 Ед/л, аспартатаминотрасфераза 166 Ед/л, гамма-глутамилтранспептидаза 89 Ед/л, билирубин общий 97,2 мкмоль/л, общий белок 68 г/л, глюкоза 5,0 ммоль/л, С-реактивный белок 6 мг/мл. Общий анализ мочи: относительная плотность 1018, pH щелочная, глюкоза, белок, ацетон не обнаружены, лейкоциты 8-10, эритроциты 0-1, эпителий 2-4 в поле зрения. Микробиологическое исследование мочи: выделена Escherichia coli в титре 5×10^5 КОЕ /мл в течение двух последовательных анализов, чувствительная к гентамицину, ципрофлоксацину, цефтазидиму. Из-за отсутствия жалоб пациента ввиду печеночной энцефалопатии, сомнительных лабораторных данных воспалительного процесса, наличия положительного результата микробиологического исследования мочи выполнено метагеномное секвенирование кала с определением модифицированного коэффициента дисбиоза MDR (modified dysbiosis ratio) по формуле:

$$MDR = [Gammaproteobacteria(\%)+Bacilli(\%)]/[Prevotella(\%)+Clostridioides(\%)+Bacteroidota(\%)].$$

Значение MDR составило 1,28, инфекция мочевыводящих путей не выявлена и антибактериальная терапия не назначалась.

Предлагаемый способ эффективно использовать в случае отсутствия классических диагностических критериев ИМВП, а именно:

есть клинические проявления и лабораторные признаки ИМВП, но микробиологический результат исследования мочи отрицательный или сомнительный;

микробиологический результат исследования мочи положительный, но нет явных клинических проявлений (из-за печеночной энцефалопатии) или лабораторных признаков ИМВП.

В таких случаях применяется метагеномное секвенирование, которое повышает точность и эффективность диагностики ИМВП, что способствует правильному выбору лечения и решению вопроса о назначении антибактериальных лекарственных средств.

Предлагаемый способ, в результате совершенствования диагностических технологий в клинике внутренних болезней, позволяет своевременно выявлять пациентов с высоким риском развития неблагоприятных событий и исходов, повышать эффективность оказания медицинской помощи пациентам с циррозом печени.

Своевременное точное установление диагноза инфекций мочевыводящих путей при циррозе печени дает возможность решения вопроса о необходимости назначения антибактериальных лекарственных средств, способствует увеличению процента выживаемости пациентов, большинство из которых трудоспособного возраста, повышению эффективности оказания медицинской помощи пациентам с циррозом печени.

Используемая литература.

1. Lingiah VA, Pyrsopoulos NT. Bacterial infections in cirrhotic patients in a tertiary care hospital. J Clin Transl Hepatol. 2021;9(1):32-39. DOI: 10.14218/JCTH.2020.00076.

2. Reuken P.A., Stallmach A., Bruns T. Mortality after urinary tract infections in patients with advanced cirrhosis - relevance of acute kidney injury and comorbidities. Liver Int. 2013;33(2):220-30. DOI:10.1111/liv.12029.

3. Клиническая лабораторная микробиология : пособие для студентов медико-диагностического факультета (специальность 1-79 01 04 Медико-диагностическое дело) / под ред. доц. С.В. Лелевича. – Гродно : ГрГМУ, 2015 – 192 с.

4. EAU Guidelines. Compilations of all Guidelines. Edn. presented at the EAU Annual Congress Milan Italy 2021. [Electronic resource]. [date of access 2024 November 07]. Available from: https://uroweb.org/guidelines/ compilations-of-all-guidelines/

5. Малаева, Е. Г. Инфекции мочевыводящих путей и микробиота / Е. Г. Малаева // Проблемы здоровья и экологии. – 2021. – Т. 18, № 3. – С. 5-14. – DOI: 10.51523/2708-6011.2021-18-3-1.

6. Kim D.S., Lee J.W. Urinary tract infection and microbiome. Diagnostics (Basel). 2023;13(11):1921. DOI:10.3390/diagnostics13111921.

7. Gupta K. Urinary tract infection challenges: beyond the basics. Infect. Dis. Clin. North Am. 2024;38(2):i. DOI:10.1016/S0891-5520(24)00017-5.

8. Engel D.R., Wagenlehner F.M.E., Shevchuk O. Scientific advances in understanding the pathogenesis, diagnosis, and prevention of urinary tract infection in the past 10 years. Infect. Dis. Clin. 2024;38(2):229–240. DOI:10.1016/j.idc.2024.03.002.

9. Du Y, Sui X, Bai Y, Shi Z, Liu B, Zheng Z, Zhang Z, Zhao Y, Wang J, Zhang Q, Zhu Y, Liu Q, Wang M, Sun H, Shao C. Dietary influences on urinary tract infections: unraveling the gut microbiota connection. Food Funct. 2024;15(19):10099-10109. DOI: 10.1039/d4fo03271c.

10. Sturov NV, Popov SV, Zhukov VA, Lyapunova TV, Rusanova EI, Kobylyanu GN. Intestinal microbiota correction in the treatment and prevention of urinary tract infection. Turk J Urol. 2022;48(6):406-414. DOI: 10.5152/tud.2022.22119.

11. Vagios S, Hesham H, Mitchell C. Understanding the potential of lactobacilli in recurrent UTI prevention. Microb Pathog. 2020;148:104544. DOI: 10.1016/j.micpath.2020.104544.

12. Brüssow H. Problems with the concept of gut microbiota dysbiosis. Microb Biotechnol. 2020 Mar;13(2):423-434. DOI: 10.1111/1751-7915.13479.

13. Finucane TE. Urinary tract infection and the microbiome. Am J Med. 2017 Mar;130(3):e97-e98. DOI: 10.1016/j.amjmed.2016.08.018

14. Schembri MA, Nhu NTK, Phan MD. Gut-bladder axis in recurrent UTI. Nat Microbiol. 2022 May;7(5):601-602. DOI: 10.1038/s41564-022-01113-z.

15. Magruder M, Sholi AN, Gong C, Zhang L, Edusei E, Huang J, Albakry S, Satlin MJ, Westblade LF, Crawford C, Dadhania DM, Lubetzky M,

Taur Y, Littman E, Ling L, Burnham P, De Vlaminck I, Pamer E, Suthanthiran M, Lee JR. Gut uropathogen abundance is a risk factor for development of bacteriuria and urinary tract infection. Nat Commun. 2019;10(1):5521. DOI: 10.1038/s41467-019-13467-w.

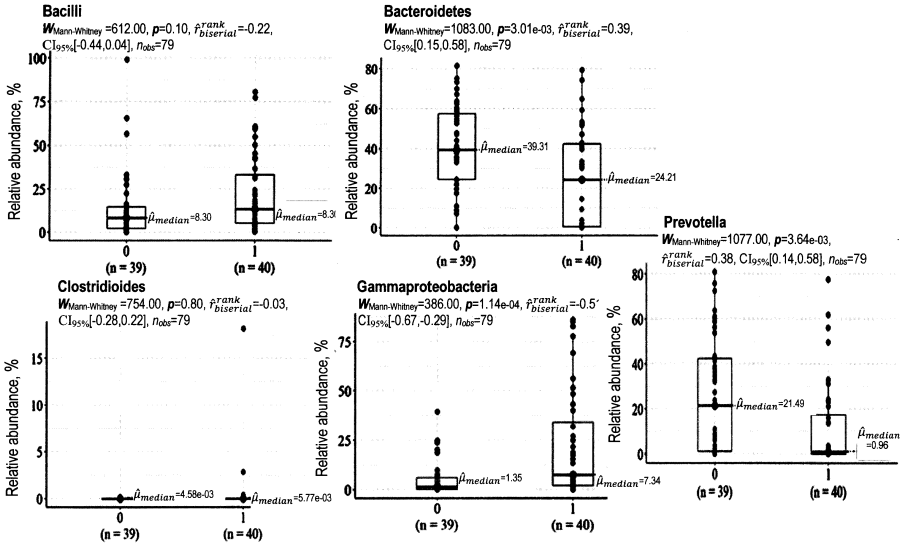
16. Paalanne N, Husso A, Salo J, Pieviläinen O, Tejesvi MV, Koivusaari P, Pirttilä AM, Pokka T, Mattila S, Jyrkäs J, Turpeinen A, Uhari M, Renko M, Tapiainen T. Intestinal microbiome as a risk factor for urinary tract infections in children. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2018;37(10):1881-1891. DOI: 10.1007/s10096-018-3322-7.

17. Magruder M, Edusei E, Zhang L, Albakry S, Satlin MJ, Westblade LF, Malha L, Sze C, Lubetzky M, Dadhania DM, Lee JR. Gut commensal microbiota and decreased risk for *Enterobacteriaceae* bacteriuria and urinary tract infection. Gut Microbes. 2020;12(1):1805281. DOI: 10.1080/19490976.2020.1805281.

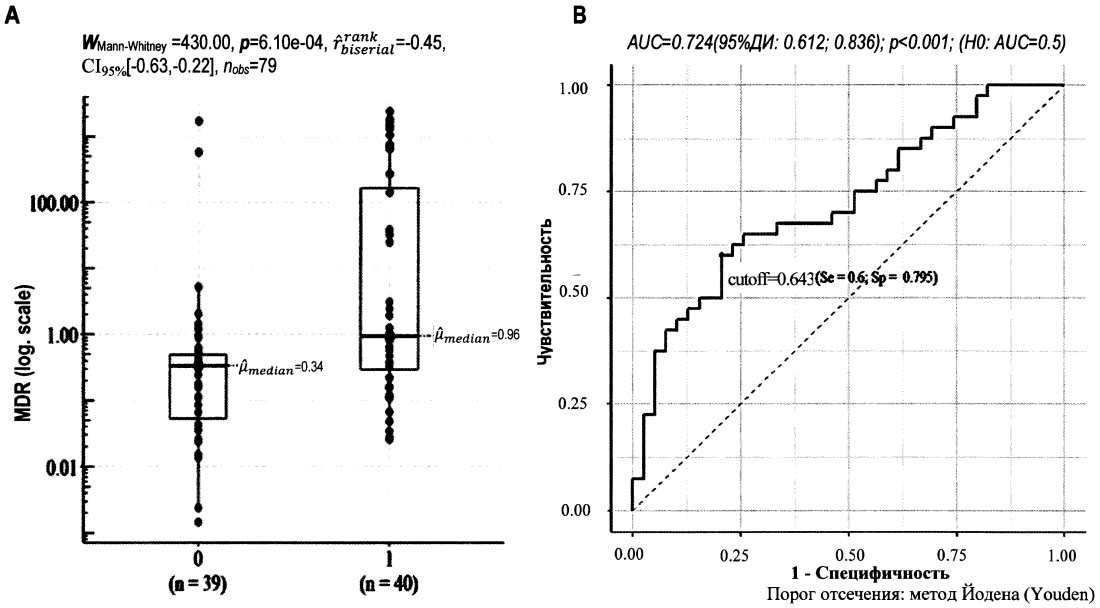
18. Maslennikov R, Ivashkin V, Efremova I, Alieva A, Kashuh E, Tsvetaeva E, Poluektova E, Shirokova E, Ivashkin K. Gut dysbiosis is associated with poorer long-term prognosis in cirrhosis. World J Hepatol. 2021;13(5):557-570. DOI: 10.4254/wjh.v13.i5.557.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ диагностики инфекций мочевыводящих путей при циррозе печени с применением метагеномного секвенирования кишечной микробиоты, заключающийся в комбинированном анализе пробы кала, включающем полимеразную цепную реакцию (ПЦР), электрофоретическую детекцию, высокопроизводительное секвенирование по протоколу 16S рРНК с определением последовательности гипервариабельных регионов V3 и V4 гена бактерий и биоинформатический анализ данных с последующим расчетом модифицированного коэффициента дисбиоза MDR (modified dysbiosis ratio) по формуле: MDR=[Gammaproteobacteria(%)+Bacilli(%)]/[Prevotella(%)+Clostridioides(%)+Bacteroidota(%)], и при значении MDR больше 1,301 диагностируется инфекция мочевыводящих путей у пациентов с циррозом печени.



Фиг. 1


A
$W_{Mann-Whitney}$ =430.00, p=6.10e-04, $\hat{r}^{rank}_{biserial}$=-0.45,
$CI_{95\%}$[-0.63,-0.22], n_{obs}=79
MDR (log. scale)
100.00
1.00
0.01
$\hat{\mu}_{median}$=0.34
$\hat{\mu}_{median}$=0.96
0
(n = 39)
1
(n = 40)
B
AUC=0.724(95%ДИ: 0.612; 0.836); p<0.001; (H0: AUC=0.5)
Чувствительность
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
cutoff=0.643(Se = 0.6; Sp = 0.795)
0.00
0.25
0.50
0.75
1.00
1 - Специфичность
Порог отсечения: метод Йодена (Youden)

Фиг. 2