

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **046276**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2024.02.21**

**(21)** Номер заявки  
**202192954**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2020.04.30**

**(51)** Int. Cl. **G01N 33/558** (2006.01)  
**G01N 33/68** (2006.01)  
**G01N 33/543** (2006.01)

---

**(54) ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОЕ ИЗМЕРЕНИЕ D-ЛАКТАТА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ИНФЕКЦИОННОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ**

---

**(31)** 19171761.0

**(32)** 2019.04.30

**(33)** EP

**(43)** 2022.03.18

**(86)** PCT/EP2020/061999

**(87)** WO 2020/221847 2020.11.05

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ИНФЕКТОТЕСТ ГМБХ (DE)**

**(72)** Изобретатель:  
**Карбышева Светлана (DE)**

**(74)** Представитель:  
**Хмара М.В. (RU)**

**(56)** RU-C1-2642659

WO-A1-2019055520

US-A1-2013075277

YERMAK KATSIARYNA ET AL:

"Performance of synovial fluid D-lactate for the diagnosis of periprosthetic joint infection: A prospective observational study", JOURNAL OF INFECTION, ACADEMIC PRESS, LONDON, GB, vol. 79, no. 2, 21 May 2019 (2019-05-21), pages 123-129, XP085737006, ISSN: 0163-4453, DOI: 10.1016/J.JINF.2019.05.015 [retrieved on 2019-05-21] the whole document

SVETLANA KARBYSHEVA ET AL:

"Synovial Fluid d-Lactate-A Novel Pathogen-Specific Biomarker for the Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection", THE JOURNAL OF ARTHROPLASTY, 16 March 2020 (2020-03-16), XP055710062, AMSTERDAM, NL ISSN: 0883-5403, DOI: 10.1016/j.arth.2020.03.016 the whole document

---

**(57)** Настоящее изобретение относится к *in vitro* способу диагностики, прогнозирования, оценки риска, мониторинга, терапевтического ведения и/или терапевтического контроля инфекционного заболевания, включающему (а) обеспечение образца субъекта, проявляющего клинические симптомы инфекции и/или подозреваемого на наличие инфекции, (b) определение уровня D-лактата в указанном образце, (с) при этом уровень D-лактата указывает на наличие инфекционного заболевания, отличающемся тем, что (d) уровень D-лактата в указанном образце определяют с помощью электрохимической сенсорной системы (биосенсора). Согласно вариантам осуществления электрохимическая сенсорная система содержит потенциометрический или амперометрический сенсор. Предпочтительно, электрохимическая система содержит связывающую D-лактат молекулу, которая предпочтительно иммобилизована на электроде определения (рабочем). Согласно вариантам осуществления электрод определения с иммобилизованной связывающей D-лактат молекулой состоит из (одноразовой) тест-полоски для вставки в портативное устройство считывания.

---

**046276**  
**B1**

**046276**  
**B1**

Настоящее изобретение относится к *in vitro* способу диагностики, прогнозирования, оценки риска, мониторинга, терапевтического ведения и/или терапевтического контроля инфекционного заболевания, включающему (а) обеспечение образца субъекта, проявляющего клинические симптомы инфекции и/или подозреваемого на наличие инфекции, (b) определение уровня D-лактата в указанном образце, (с) при этом уровень D-лактата указывает на наличие инфекционного заболевания, отличающемся тем, что (d) уровень D-лактата в указанном образце определяют с помощью электрохимической сенсорной системы (биосенсора). Согласно вариантам осуществления электрохимическая сенсорная система содержит потенциометрический или амперометрический сенсор. Предпочтительно электрохимическая система содержит связывающую D-лактат молекулу, которая предпочтительно иммобилизована на электроде определения (рабочем). Согласно вариантам осуществления электрод определения с иммобилизованной связывающей D-лактат молекулой состоит из (одноразовой) тест-полоски для вставки в портативное устройство считывания.

#### **Уровень техники изобретения**

Инфекции протезных суставов представляют собой серьезное осложнение, связанное со значительной смертностью и заболеваемостью (1, 2). Своевременный и точный диагноз инфекции имеет решающее значение для планирования адекватного лечения, включающего артроскопическое или открытое хирургическое вмешательство. В протезных суставах низкий уровень воспаления и слабовыраженные клинические симптомы могут препятствовать диагностике инфекции протезного сустава (PJI (от англ. - prosthetic joint infection)), которая обычно возникает через несколько месяцев или лет после артропластики.

Кроме того, инфекционные заболевания в целом представляют собой важную проблему для здоровья, и срочно необходима ранняя и надежная диагностика с использованием быстрых и последовательных способов тестирования для улучшения терапевтического вмешательства у пациентов с подозрением на инфекционное заболевание или с диагностированным инфекционным заболеванием.

Используемые в настоящее время диагностические тесты синовиальной жидкости не обладают высокой чувствительностью и высокой специфичностью в отношении инфекции. Для посева синовиальной жидкости требуется время, пока не начнется рост микробов, и он характеризуется ограниченной чувствительностью и специфичностью, особенно при хронической PJI легкой степени (3-5). Количество лейкоцитов в синовиальной жидкости и отдельных видов лейкоцитов (т.е. процент гранулоцитов) имеет высокую чувствительность (6), но может быть повышено без инфекции в случае вывихов, перипротезного перелома или в течение первых 6 недель после хирургического вмешательства из-за физиологического воспалительного процесса заживления. Новые биомаркеры в синовиальной жидкости, такие как альфа-дефензин, лейкоцитарная эстераза и кальпротектин (7-9), в большом количестве присутствуют в нейтрофилах, поэтому не могут быть применимы для диагностики PJI у пациентов с асептическими состояниями, связанными с высоким количеством лейкоцитов в синовиальной жидкости.

Перипротезная инфекция сустава (PJI (от англ. - periprosthetic joint infection)) представляет собой тяжелое осложнение после артропластики, которое связано со значительной заболеваемостью и смертностью. Точный диагноз инфекции имеет решающее значение для планирования адекватного лечения. Инфекция является причиной повторного хирургического вмешательства более чем в 25% случаев в эпоху ортопедических имплантатов, таких как эндопротезы суставов (26). Используемые в настоящее время диагностические тесты синовиальной жидкости не обладают как высокой чувствительностью, так и высокой специфичностью в отношении инфекции (27). Для посева синовиальной жидкости требуется время, и он характеризуется ограниченной чувствительностью и специфичностью при хронической PJI легкой степени (28-30). Низкий уровень воспаления и слабовыраженные клинические симптомы могут затруднить диагностику PJI, которая может возникать через несколько месяцев или лет после артропластики. Диагноз также затруднен в раннем послеоперационном периоде, когда количество лейкоцитов, С-реактивный белок и клинические признаки затрудняют надежный диагноз из-за местного воспаления тканей (31-33).

Было предпринято несколько попыток исследовать различные биомаркеры, такие как альфа-2-макроглобулин, аденозиндезаминаза, прокальцитонин, IL-1, IL-6, IL-1 $\beta$  и альфа-дефензин, которые могут помочь отличить PJI от асептической патологии (34-36).

D-лактат представляет собой специфический в отношении патогена метаболит, используемый для диагностики бактериальной инфекции в первую очередь в стерильных жидкостях организма (10). L- и D-вращающие изомеры лактата являются продуктами внутриклеточного метаболизма. Однако клетки млекопитающих содержат только фермент L-лактатдегидрогеназу (LDH (от англ. -lactate dehydrogenase)) и могут продуцировать почти исключительно L-лактат. Концентрация D-лактата в сыворотке крови человека чрезвычайно низка, в диапазоне от наномолярного до микромолярного, поскольку это второстепенный побочный путь гликолиза.

Напротив, виды бактерий обладают как D-LDH, так и L-LDH и, следовательно, продуцируют как D-лактат, так и L-лактат. В результате при бактериальных инфекциях концентрация D-лактата увеличивается до миллимолярного диапазона (13, 14). Поэтому в предыдущих отчетах предполагалось, что определение D-лактата в синовиальной жидкости может быть применимо для ранней диагностики септического артрита, особенно по сравнению с окрашиванием по Граму и культивированием (11, 12).

Еще в 1990-х годах было проведено несколько исследований по измерению концентрации D-лактата в некоторых первичных стерильных жидкостях организма, чтобы отличить инфекцию от асептического воспаления (40-42). Было показано, что D-лактат является многообещающим маркером для диагностики инфекций в различных жидкостях организма, например, при бактериальном менингите и септическом артрите (41, 43), в том числе у пациентов, получающих противомикробную терапию (40).

Однако установленные тесты для диагностики инфекционных заболеваний и, в частности, РЛ характеризуются относительно низкой специфичностью. Это также оказалось верным при измерении концентрации D-лактата в образце с использованием общепринятых анализов D-лактата, в частности, спектрофотометрических анализов.

В области химического и биологического определения наблюдается тенденция к применению многоцелевых устройств, которые не требуют или почти не требуют обучения пользователя. Существует множество вариантов преобразователей для преобразования сигнала химического распознавания в электрический сигнал: оптические, массовые, тепловые и электрохимические сенсоры. Среди химических сенсоров электрохимические сенсоры не требуют внешних компонентов, таких как громоздкие оптические линзы или источники света, и обеспечивают высокий уровень интеграции и, во многих случаях, низкий предел обнаружения. Более того, доступен широкий ряд готовых компонентов, что делает электрохимические сенсоры особенно привлекательными в условиях, когда ценятся портативность и низкая стоимость. Эти сенсоры обычно бывают амперометрическими, импедиметрическими или потенциометрическими и успешно используются в качестве химических и биологических сенсоров (58, 59). Исходя из этого, потенциометрия обеспечивает эффективный, но простой способ обнаружения нескольких типов аналитов, таких как нуклеиновые кислоты, антигены и следовые металлы. Возможные области применения включают диагностику по месту оказания медицинской помощи и персонализированную медицину. Среди потенциометрических способов сенсоры на основе транзисторов представляют хорошую альтернативу одноразовым сенсорам при низкой стоимости и при надежности. Если такими сенсорами можно управлять с помощью недорогого и простого в использовании измерительного оборудования, то сенсоры можно будет использовать в широком диапазоне условий, особенно в удаленных и бедных ресурсами местах, с минимальным обучением пользователя.

Кроме того, совершенно неясно, может ли электрохимический сенсор для D-лактата обеспечивать надежные и воспроизводимые результаты для определения уровня D-лактата в образце, которые можно использовать в контексте *in vitro* способа диагностики, прогнозирования, оценки риска, мониторинга, терапевтического ведения и/или терапевтического контроля инфекционного заболевания.

Соответственно, в данной области существует потребность в надежном *in vitro* способе диагностики, прогнозирования, оценки риска, мониторинга, терапевтического ведения и/или терапевтического контроля инфекционного заболевания, который преодолевает ограничения известных способов. В частности, срочно необходим диагностический способ с высокой чувствительностью, а также специфичностью. Предпочтительно, такие способы должны предусматривать электрохимическую сенсорную систему, которая позволяет выполнять простой тест, обеспечивая воспроизводимые результаты.

#### **Краткое описание изобретения**

В свете предшествующего уровня техники техническая проблема, лежащая в основе настоящего изобретения, заключается в обеспечении улучшенного *in vitro* способа диагностики, прогнозирования, оценки риска, мониторинга, терапевтического ведения и/или терапевтического контроля инфекционного заболевания.

Эта проблема решается с помощью признаков независимых пунктов формулы изобретения. Предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения представлены в зависимых пунктах формулы изобретения.

Следовательно, согласно первому аспекту настоящее изобретение относится к *in vitro* способу диагностики, прогнозирования, оценки риска, мониторинга, терапевтического ведения и/или терапевтического контроля инфекционного заболевания, включающему

- a) обеспечение образца субъекта, проявляющего клинические симптомы и/или подозреваемого на наличие инфекции,
- b) определение уровня D-лактата в указанном образце,
- c) при этом уровень D-лактата указывает на наличие инфекционного заболевания, отличающийся тем, что
- d) уровень D-лактата в указанном образце определяют с помощью электрохимической сенсорной системы (биосенсора).

Настоящее изобретение основано на неожиданном открытии того, что измерение D-лактата с помощью электрохимической сенсорной системы (биосенсора) для определения уровня D-лактата в образце согласно способу в соответствии с настоящим изобретением обеспечивает тест, который характеризуется удивительно высокой специфичностью по сравнению с аналогичными способами, в которых используются другие средства для определения уровня D-лактата, например, спектрофотометрические измерения.

Большим преимуществом способа в соответствии с настоящим изобретением является то, что час-

тота ложноположительных событий может быть резко снижена по сравнению с известными тестами с использованием спектрофотометрических измерений. Неожиданно обнаружили, что количество эритроцитов, а также концентрация гемоглобина в образце, выделенном от субъекта, проявляющего клинические симптомы и/или подозреваемого на наличие инфекции, коррелировали с уровнем D-лактата, определенным с помощью спектрофотометрического измерения. Вероятно, это связано с тем, что гемоглобин и D-лактат имеют interfering длины волн поглощения, т.е. 540 нм для гемоглобина и 570 нм для D-лактата. Следовательно, контаминация крови образца может привести к ложноположительному результату в способе с использованием спектрофотометрического измерения. Напротив, обнаружили, что на электрохимическое измерение, используемое в контексте настоящего изобретения, не влияет наличие эритроцитов, а частота ложноположительных результатов и специфичность теста были существенно улучшены по сравнению с известными способами. Важно отметить, что чувствительность способа в соответствии с настоящим изобретением приблизительно равна очень высоким чувствительностям известных способов, в которых используют спектрофотометрические измерения D-лактата, например, для диагностики РЛ.

Согласно предпочтительным вариантам осуществления электрохимическая сенсорная система в соответствии с настоящим изобретением является высокоспецифической в отношении обнаружения D-лактата, тогда как присутствие L-лактата не определяется и не влияет на определение уровня D-лактата. Определение D-лактата полностью не зависит от присутствия L-лактата, поскольку L-лактат не распознается электрохимической сенсорной системой, специфической для D-лактата.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения электрохимическая сенсорная система содержит потенциометрический сенсор, предпочтительно потенциометрический сенсор на основе транзистора.

Согласно вариантам осуществления электрохимическая сенсорная система содержит ионно-чувствительный полевой транзистор (ISFET от англ. - ion sensitive field-effect transistor). ISFET представляет собой потенциометрический сенсор на основе потенциометрического транзистора.

Согласно следующим вариантам осуществления электрохимическая сенсорная система содержит амперометрический сенсор.

Согласно вариантам осуществления сенсор электрохимической сенсорной системы представляет собой потенциометрический сенсор. Согласно альтернативному варианту осуществления сенсор электрохимической сенсорной системы представляет собой амперометрический сенсор.

Согласно вариантам осуществления электрохимическая сенсорная система содержит связывающую D-лактат молекулу, такую как, например, D-LDH. Связывающая D-лактат молекула присутствует в электрохимической ячейке электрохимической сенсорной системы. Связывающая D-лактат молекула может быть иммобилизована на подложке электрохимического сенсора, предпочтительно на электроде определения. Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения связывающая D-лактат молекула, такая как D-LDH, может быть обеспечена в растворе, например, в буфере, который добавляют в электрохимическую систему для измерения, например, путем разбавления в нем образца, выделенного у пациента.

В случае применения связывающего D-лактат фермента электрохимическая ячейка и/или буфер для образца в соответствии с настоящим изобретением могут содержать дополнительные компоненты, необходимые для выполнения химической реакции, катализируемой связывающим D-лактат ферментом. В случае D-LDH электрохимическая система может содержать никотинамидадениндинуклеотид НАД.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения электрохимическая сенсорная система содержит тест-полоску или чип с соответствующими электродами на их поверхности для осуществления электрохимического обнаружения D-лактата, предпочтительно с использованием потенциометрического или амперометрического сенсора. Согласно вариантам осуществления тест-полоска или чип являются одноразовыми. Согласно следующим вариантам осуществления тест-полоска или чип являются многоразовыми.

Согласно предпочтительным вариантам осуществления тест-полоску или чип электрохимической сенсорной системы можно использовать путем вставки в подходящее устройство считывания, такое как переносное компактное устройство считывания, которое может питаться от батареи. Являющиеся компактными переносные устройства считывания, обеспечивающие мобильное применение и использующие электрохимические тест-полоски, известны в уровне техники для других анализов, таких как глюкоза. Такие устройства обладают преимуществом, поскольку измерение и определение уровня соответствующего аналита могут быть обеспечены мгновенно на месте выделения образца. Примером такого устройства является система мониторинга уровня глюкозы и  $\beta$ -кетона в крови Freestyle Precision Pro.

Согласно вариантам осуществления электрохимическая сенсорная система содержит предпочтительно одноразовую тест-полоску (чип) для электрохимического определения уровня D-лактата, при этом тест-полоска содержит электрод определения с иммобилизованной связывающей D-лактат молекулой и предпочтительно также противозлектрод и/или электрод сравнения.

Согласно вариантам осуществления измерение или определение уровня D-лактата происходит в устройстве считывания, предпочтительно питающемся от батареи переносном компактном устройстве считывания. Согласно вариантам осуществления одноразовая тест-полоска может быть помещена в

предпочтительно питающееся от батареи переносное компактное устройство считывания для осуществления измерения D-лактата. Согласно вариантам осуществления устройство считывания является не переносным устройством, а настольным устройством считывания.

Согласно предпочтительным вариантам осуществления электрохимическая сенсорная система основана по меньшей мере на одном из амперометрии, потенциометрии и полевого транзистора.

Согласно вариантам осуществления электрохимическая сенсорная система содержит связывающую D-лактат молекулу, предпочтительно D-лактатдегидрогеназу (D-LDH).

Согласно вариантам осуществления электрохимическая сенсорная система содержит электрод определения (рабочий), предпочтительно включающий поверхность из углерода или золота.

Согласно предпочтительным вариантам осуществления связывающая D-лактат молекула, предпочтительно D-LDH, иммобилизована на электроде определения.

Согласно следующим вариантам осуществления настоящего изобретения электрохимическая сенсорная система содержит электрод определения (рабочий), предпочтительно включающий поверхность из углерода или золота, при этом связывающая D-лактат молекула, предпочтительно связывающий D-лактат фермент, более предпочтительно D-лактатдегидрогеназа (D-LDH), иммобилизована на поверхности электрода определения (рабочего).

Согласно предпочтительным вариантам осуществления электрохимическая сенсорная система содержит электрод определения, включающий иммобилизованную связывающую лактат молекулу. Согласно предпочтительным вариантам осуществления связывающая лактат молекула представляет собой D-LDH.

Согласно вариантам осуществления иммобилизация связывающей D-лактат молекулы, такой как D-LDH, на поверхности электрода определения достигается любым из адсорбции, ковалентного связывания, захвата, инкапсуляции, сшивания или взаимодействия тиол-золото, предпочтительно сшивания или взаимодействия тиол-золото.

Предпочтительным является применение связывающего D-лактат фермента, катализирующего химическую реакцию, приводящую к образованию восстановленного никотинамидадениндинуклеотида НАДН. Поэтому применение D-LDH является благоприятным, поскольку она катализирует обратимую реакцию D-лактата в присутствии НАД<sup>+</sup> до пирувата и НАДН. Фермент D-LDH, подлежащий применению для иммобилизации на электроде определения (рабочем) электрохимической сенсорной системы, может представлять собой коммерчески доступную D-LDH.

Согласно вариантам осуществления предпочтительным является осуществление некоторых модификаций электрода перед связыванием D-LDH на поверхности электрода, таких как покрытие наночастицами металла и/или другие конструкции электрода, такие как графеновые электроды с использованием полученных собственными силами чипов, для чувствительности в правильном диапазоне концентраций D-лактата.

НАДН, высвобождаемый в результате химической реакции, катализируемой D-LDH (D-лактат+НАД<sup>+</sup>→пируват+НАДН), разлагается на НАД<sup>+</sup>+H<sup>+</sup> и 2e<sup>-</sup> под действием приложенного напряжения. 2e<sup>-</sup> (электроны) могут быть обнаружены электродом определения (рабочим), который может находиться на поверхности тест-полоски (чипа), а электрохимический сигнал может быть измерен устройством считывания, находящимся в контакте с электродом определения, например, устройством считывания, в которое вставляется тест-полоска. Такое устройство считывания может представлять собой питающееся от батареи переносное компактное устройство считывания. Согласно предпочтительным вариантам осуществления в таком устройстве считывания используется амперометрия. Кроме того, в контексте настоящего изобретения можно использовать устройство считывания, в котором используется потенциометрия.

В контексте настоящего изобретения можно пересчитать электрический сигнал в молярную концентрацию. Например, электрохимическая сенсорная система может быть откалибрована с использованием тестовых образцов, имеющих известные концентрации D-LDH, в подходящей среде, такой как подходящий буфер. Электрохимическая сенсорная система может быть предварительно откалибрована. Согласно вариантам осуществления система в соответствии с настоящим изобретением может предусматривать различные режимы определения, соответствующие различным условиям образца, например, соответствующие измерениям различных физиологических жидкостей.

В контексте настоящего изобретения иммобилизация D-LDH на поверхности электрода определения может быть достигнута любым из адсорбции, ковалентного связывания, захвата, инкапсуляции или предпочтительно сшивания или посредством взаимодействия тиол-золото. Согласно вариантам осуществления могут быть использованы другие методики иммобилизации, известные специалисту в данной области.

Для адсорбции может быть обеспечено прилипание ферментов к поверхностям электрода со слабым взаимодействием, чтобы избежать денатурации фермента. Это оказалось особенно успешным, когда поверхность электрода была ионизирована сначала плазменной или кислотной обработкой, ковалентной модификацией поверхности, такой как аминирование, или осаждением ионного полимера посредством электрополимеризации или покрытия методом литья каплями/центрифугирования.

Сшивание является часто используемым способом, при котором диальдегиды (глутаральдегид) часто реагируют с аминогруппами ферментов и аминогруппами на аминированных поверхностях. Другим способом является взаимодействие тиол-золото, при котором к ферменту добавляют тиоловую группу (или применяют цистеины в ферменте), что позволяет ферменту связываться с поверхностью путем тиирования золота.

Инкапсуляция является еще одним очень распространенным способом иммобилизации, известным специалисту. Способы инкапсуляции включают электрохимическую полимеризацию или сшивание тонкой сетки полимера поверх фермента на поверхности. Таким образом, фермент не может покинуть поверхность, но по-прежнему обеспечивает доступ молекул субстрата для ферментативной реакции.

Согласно вариантам осуществления электрод определения модифицируют, предпочтительно перед иммобилизацией связывающей D-лактат молекулы, для точной настройки характеристик обнаружения и повышения и/или регулировки чувствительности биосенсора в подходящем диапазоне концентраций D-лактата.

Согласно вариантам осуществления электрохимическая сенсорная система содержит электрод определения, покрытый наночастицами металла.

Согласно вариантам осуществления электрохимическая сенсорная система содержит электрод определения, содержащий графен или состоящий из графена.

Кроме того, согласно вариантам осуществления система позволяет параллельно определять уровни D-лактата более чем в одном образце. Большим преимуществом настоящего изобретения является то, что оно позволяет мультиплексировать несколько образцов, которые можно измерять параллельно.

Согласно вариантам осуществления инфекционное заболевание в соответствии с настоящим изобретением представляет собой микробную бактериальную и/или грибковую инфекцию, предпочтительно по меньшей мере с одним инфекционным возбудителем, выбранным из группы, состоящей из *Staphylococcus aureus*, коагулазонегативных стафилококков, *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, анаэробов, грамотрицательных бактерий и *Candida spp.*

В контексте настоящего изобретения инфекционное заболевание может представлять собой инфекцию сустава, инфекцию протезного сустава (ПИ), менингит, перитонит, инфекцию плевральной полости, инфекцию перикардального пространства и/или инфекцию кровотока.

Особенно предпочтительным является применение настоящего изобретения для диагностики менингита. Неожиданно обнаружили, что электрохимическое определение D-лактата в спинномозговой жидкости является особенно благоприятным по сравнению с другими способами обнаружения D-лактата, поскольку образцы спинномозговой жидкости часто контаминируются кровью во время процедуры выделения образца.

Кроме того, настоящее изобретение особенно применимо для определения D-лактата в образцах крови, которые нельзя использовать в спектрофотометрических измерениях из-за большого количества красных кровяных телец и гемоглобина. Следовательно, образцы сыворотки или плазмы крови должны быть взяты из крови или образцов крови для обнаружения циркуляции D-лактата. Настоящее изобретение позволяет определять уровни D-лактата в образце крови сразу после выделения, что делает ненужным стадию получения сыворотки или плазмы крови.

Если инфекционное заболевание представляет собой инфекцию суставов, в качестве образца можно использовать синовиальную жидкость. В этом контексте измерение D-лактата с использованием электрохимической сенсорной системы особенно выгодно по сравнению со спектрофотометрическими измерениями, поскольку суставные аспираты часто контаминированы кровью. Кроме того, синовиальная жидкость протезных суставов часто контаминирована кровью, особенно после хирургического вмешательства. Соответственно, присутствие красных кровяных телец (RBC (от англ. - red blood cell)) или гемоглобина из лизированных RBC контаминировывает образцы, полученные из образцов, содержащих кровь, и, следовательно, наблюдается тенденция к ложным результатам при измерении спектрофотометрическими способами.

Если инфекционное заболевание представляет собой перитонит, то в качестве образца можно использовать асциты, выделенные с перитонеальным катетером или без него. Если инфекционное заболевание представляет собой инфекцию плевральной полости, то в качестве образца можно использовать плевральную жидкость.

Если инфекционное заболевание представляет собой инфекцию перикардального пространства или перикардит, то в качестве образца можно использовать перикардальную жидкость.

В случае инфекции кровотока или сепсиса кровь или полученный из крови материал можно использовать в качестве образца, при этом кровь может быть выделена с помощью внутрисосудистого катетера или без него.

Согласно вариантам осуществления повышенный уровень D-лактата, определяемый электрохимической сенсорной системой в указанном образце, по сравнению с соответствующим контролем, таким как образец от здорового субъекта, указывает на наличие инфекционного заболевания.

Согласно следующему варианту осуществления настоящего изобретения измерение тока или напряжения с помощью электрохимической сенсорной системы, соответствующего уровню D-лактата в

указанном образце, равному или превышающему 1,2 ммоль/л, указывает на наличие инфекционного заболевания.

Согласно следующим вариантам осуществления измерение тока или напряжения с помощью электрохимической сенсорной системы, соответствующее уровню D-лактата в указанном образце, равному или превышающему 0,4 ммоль/л, предпочтительно 0,5 ммоль/л, более предпочтительно равному или превышающему 1,0 ммоль/л, наиболее предпочтительно равному или превышающему 1,2 ммоль/л, указывает на наличие инфекционного заболевания.

Кроме того, способ в соответствии с настоящим изобретением может быть охарактеризован тем фактом, что измерение тока или напряжения с помощью электрохимической сенсорной системы, соответствующее уровню D-лактата в указанном образце, равному или превышающему 0,5 ммоль/л, предпочтительно равному или превышающему 1,0 ммоль/л, более предпочтительно равному или превышающему 1,2 ммоль/л, указывает на то, что требуется начало или изменение лечения антибиотиком.

Кроме того, возможные пороговые уровни в соответствии с настоящим изобретением составляют 0,4, 0,45, 0,5, 0,55, 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9, 0,95, 1, 1,05, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0 ммоль/л. Диапазоны, охватывающие любую комбинацию значений, раскрываемых в настоящем документе в качестве пределов, считаются представляющими раскрываемые варианты осуществления настоящего изобретения.

Раскрываемые в настоящем документе пороговые уровни предпочтительно относятся к измерениям D-лактата в образце синовиальной жидкости, полученном от пациента с помощью диагностического набора D-Lactam®, предоставленного Sivital (Витебск, Беларусь), полученного от VL-Diagnostics (Лейпциг) и используемого в контексте примеров настоящего изобретения. Соответственно, раскрываемые в настоящем документе значения могут до некоторой степени варьировать в зависимости от используемой системы или набора обнаружения/измерения, и раскрываемые в настоящем документе конкретные значения предназначены также для считывания соответствующих значений, определенных другими системой или наборами для измерения. Например, сравнение спектрофотометрических измерений D-лактата с использованием двух разных тестовых наборов (предоставленных Sigma-Aldrich (Сент-Луис, Миссури, США) и VL-Diagnostics (Лейпциг, Германия), соответственно) показало, что специально определенные значения отсечки также зависят от тестового набора и способа определения уровня D-лактата (Karbysheva et al. Performance of synovial fluid D-lactate for the diagnosis of acute and chronic/low-grade PJI; Abstract at EFORT Conference 2018, Barcelona, Spain).

Соответственно, согласно вариантам осуществления настоящего изобретения значения отсечки, которые должны использоваться в контексте электрохимического измерения, такого как амперометрия или потенциометрия, могут соответствовать различным концентрациям D-лактата по сравнению с пороговыми концентрациями D-лактата, которые были определены спектрофотометрическими измерениями с использованием специального тестового набора.

Считывания данных электрохимических измерений включают обнаружение токов и напряжений. Обнаруженные значения зависят от конфигурации электрохимической сенсорной системы. Модификации различных компонентов системы или способа в соответствии с настоящим изобретением (например, образца) влияют на обнаруживаемые токи или напряжения, соответственно. Следовательно, невозможно обеспечить общее значение отсечки или пороговое значение для электрохимического измерения. Однако, поскольку согласно вариантам осуществления электрохимическая сенсорная система в соответствии с настоящим изобретением требует калибровки эталонными образцами с предварительно определенными известными концентрациями D-лактата, можно обеспечить любую заданную электрохимическую систему, подходящую для определения значений отсечки/пороговых значений уровня D-лактата, которые соответствуют конкретной концентрации D-лактата, что, как было показано, указывает на инфекционное заболевание и необязательно на начало лечения антибиотиками для определенного вида образца.

Согласно предпочтительным вариантам осуществления настоящего изобретения образец разбавляют фосфатным буфером. Согласно вариантам осуществления pH указанного фосфатного буфера составляет 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 или 10. Диапазоны, охватывающие любую комбинацию раскрываемых значений как пределов представляют собой раскрываемые варианты осуществления настоящего изобретения. Буфер или раствор образцов с pH приблизительно 7,5-9,5 является предпочтительным, при этом Ph приблизительно 8-9 является более предпочтительным, а pH 8,5 является особенно предпочтительным. Было показано, что связывающие D-лактат молекулы и, в частности, D-LDH работают очень эффективно в обнаружении D-лактата в контексте электрохимической сенсорной системы при pH 8,5. Возможным буферным раствором для разбавления образца, такого как физиологическая жидкость, например, синовиальная жидкость, является фосфатный буфер.

Согласно вариантам осуществления электрохимическую сенсорную систему калибруют с использованием одного или нескольких калибровочных образцов с определенной концентрацией D-лактата перед определением уровня D-лактата в указанном образце. Например, коммерчески доступный D-лактат, разбавленный до известной концентрации подходящим буферным раствором, который может быть таким же, как буферный раствор, используемый для определения уровня D-лактата в указанном образце, может быть использован для определения напряжения, соответствующего конкретной концентрации D-лактата

в образце.

Согласно некоторым вариантам осуществления, включающим потенциометрический сенсор, напряжение приблизительно 85 мВ соответствует уровню D-лактата 1,2 ммоль/л и может указывать на наличие инфекционного заболевания. Измерение напряжения электрохимической сенсорной системой может варьировать в зависимости от точной настройки системы и типа сенсора.

Согласно некоторым вариантам осуществления, включающим амперометрический сенсор, ток приблизительно 422 нА соответствует уровню D-лактата приблизительно 1,2 ммоль/л и может указывать на наличие инфекционного заболевания. Измерение тока электрохимической сенсорной системой может варьировать в зависимости от точной настройки системы и типа сенсора.

Способ *in vitro* по любому из предыдущих пунктов, при котором измерение тока или напряжения с помощью электрохимической сенсорной системы, соответствующее уровню D-лактата в указанном образце, равному или превышающему 1,2 ммоль/л, указывает на то, что требуется начало или изменение лечения антибиотиком.

Однако ток или напряжение, соответствующие уровню D-лактата 1,2 ммоль/л, могут представлять собой предпочтительное значение отсечки в контексте настоящего изобретения, в частности, в случае образцов синовиальной жидкости, которые можно использовать для обнаружения инфекций суставов.

Предпочтительно уровень D-лактата, определяемый с помощью электрохимической сенсорной системы в контексте способа в соответствии с настоящим изобретением, не зависит от количества эритроцитов и/или гемоглобина, присутствующих в указанном образце.

Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения образец выбирают из группы, включающей образец физиологической жидкости, образец гомогенизированной ткани, образец крови, образец сыворотки крови, образец плазмы, образец мочи, суставной аспират, образец синовиальной жидкости, образец асцита, образец перитонеальной жидкости, образец плевральной жидкости, образец перикардиальной жидкости и/или образец спинномозговой жидкости.

Согласно следующему аспекту настоящее изобретение относится к электрохимической сенсорной системе (биосенсору) для определения уровня D-лактата в образце. Электрохимическая сенсорная система в соответствии с настоящим изобретением представляет собой систему, раскрываемую в контексте способа и набора в соответствии с настоящим изобретением.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение также относится к набору для осуществления способа в соответствии с настоящим изобретением, включающему

электрохимическую сенсорную систему для определения уровня D-лактата в образце,

эталонные данные, такие как эталонный уровень, предпочтительно соответствующий уровню D-лактата в указанном образце, равному или превышающему 1,2 ммоль/л, при этом указанные эталонные данные необязательно хранятся на машиночитаемом носителе и/или используются в форме исполняемого компьютером кода, сконфигурированного для сравнения определенных уровней D-лактата с указанными эталонными данными, и

необязательно реагенты для калибровки электрохимической сенсорной системы.

Настоящее изобретение также относится к набору для осуществления способа в соответствии с настоящим изобретением, включающего

электрохимическую сенсорную систему для определения уровня D-лактата в образце, предпочтительно включающую тест-полоску (чип) с соответствующими электродами на поверхности или сенсор на основе транзистора для электрохимического обнаружения, при этом электрохимический сигнал измеряют с помощью устройства считывания, предпочтительно питающегося от батареи переносного компактного устройства считывания,

эталонные данные, такие как эталонный уровень, предпочтительно соответствующий уровню D-лактата в указанном образце, равному или превышающему 1,2 ммоль/л, при этом указанные эталонные данные необязательно хранятся на машиночитаемом носителе и/или используются в форме исполняемого компьютером кода, сконфигурированного для сравнения определенных уровней D-лактата с указанными эталонными данными, и

необязательно реагенты для калибровки электрохимической сенсорной системы.

Кроме того, настоящее изобретение относится к набору для осуществления способа в соответствии с настоящим изобретением, включающему:

электрохимическую сенсорную систему для определения уровня D-лактата в образце, при этом электрохимическая сенсорная система предпочтительно содержит:

i. тест-полоску (чип) для электрохимического определения уровня D-лактата, при этом тест-полоска содержит электрод определения с иммобилизованной связывающей D-лактат молекулой и предпочтительно также противозлектрод и/или электрод сравнения,

ii. и необязательно переносное компактное устройство считывания для вставки тест-полоски и выполнения измерения D-лактата,

эталонные данные, такие как эталонный уровень, предпочтительно соответствующий уровню D-лактата в указанном образце, равному или превышающему 1,2 ммоль/л, при этом указанные эталонные данные необязательно хранятся на машиночитаемом носителе и/или используются в форме исполняемо-

го компьютером кода, сконфигурированного для сравнения определенных уровней D-лактата с указанными эталонными данными, и

необязательно реагенты для калибровки электрохимической сенсорной системы.

Наборы в соответствии с настоящим изобретением могут также содержать инструкции по применению. Значения отсечки, предоставляемые набором, могут варьировать в зависимости от инфекционного заболевания и образцов, подлежащих использованию для осуществления способа в соответствии с настоящим изобретением. Набор может обеспечивать перечень подходящих значений отсечки для перечня инфекционных заболеваний и/или образцов, подлежащих использованию.

Реагенты для калибровки электрохимической системы могут содержать D-лактат и подходящие буферные растворы для создания подходящих калибровочных образцов. Такие образцы могут быть предоставлены в готовом виде, или основной материал и реагенты для создания таких образцов могут быть предоставлены набором, чтобы пользователь мог создавать специальные калибровочные образцы для конкретного применения набора, выполняемого соответствующим пользователем.

Согласно следующему аспекту настоящее изобретение относится к электрохимической сенсорной системе (биосенсору) для определения уровня D-лактата в образце. Варианты осуществления электрохимической сенсорной системы в соответствии с настоящим изобретением раскрываются в контексте способа и набора в соответствии с настоящим изобретением. Согласно предпочтительному варианту осуществления электрохимическая сенсорная система для определения уровня D-лактата в образце содержит D-LDH в качестве компонента распознавания D-лактата, иммобилизованного на тест-полоске для вставки в переносное устройство считывания.

Согласно вариантам осуществления электрохимическая сенсорная система в соответствии с настоящим изобретением содержит потенциометрический сенсор и/или амперометрический сенсор. Система предпочтительно содержит электрод определения (рабочий) с иммобилизованной на поверхности электрода связывающей D-лактат молекулой, предпочтительно D-LDH. Согласно предпочтительным вариантам осуществления электрохимическая сенсорная система содержит (предпочтительно одноразовую) тест-полоску, которая содержит электрод определения с иммобилизованной связывающей D-лактат молекулой и предпочтительно также противозлектрод и/или электроды сравнения. Согласно вариантам осуществления электрохимическая сенсорная система также содержит устройство считывания, предпочтительно портативное переносное устройство считывания, подходящее для вставки тест-полоски и для измерения D-лактата в образце.

Все признаки, которые были раскрыты в контексте способа в соответствии с настоящим изобретением, наряду с этим также раскрываются в контексте набора и электрохимической сенсорной системы в соответствии с настоящим изобретением и наоборот. Соответственно, признаки вариантов осуществления способа в соответствии с настоящим изобретением также могут быть признаками вариантов осуществления набора и электрохимической сенсорной системы в соответствии с настоящим изобретением и наоборот.

### **Подробное описание изобретения**

Настоящее изобретение относится к *in vitro* способу диагностики, прогнозирования, оценки риска, мониторинга, терапевтического ведения и/или терапевтического контроля инфекционного заболевания, включающему (а) обеспечение образца субъекта, проявляющего клинические симптомы инфекции и/или подозреваемого в наличии инфекции, (b) определение уровня D-лактата в указанном образце, (c) при этом уровень D-лактата указывает на наличие инфекционного заболевания, отличающемся тем, что (d) уровень D-лактата в указанном образце определяют с помощью электрохимической сенсорной системы (биосенсора).

Используемый в настоящем документе термин "диагностика" в контексте настоящего изобретения относится к распознаванию и (раннему) обнаружению клинического состояния субъекта, связанного с инфекционным заболеванием. Также термин "диагностика" может охватывать оценивание тяжести инфекционного заболевания. Термин "прогнозирование" относится к предсказанию исхода или конкретного риска для субъекта на основании инфекционного заболевания. Это также может включать оценку шанса восстановления или шанса неблагоприятного исхода для указанного субъекта.

Термин "оценка риска" и, возможно, последующая стратификация пациентов относится к группированию субъектов в различные группы риска в соответствии с их прогнозом. Оценка риска также относится к стратификации для применения превентивных и/или терапевтических мер. Кроме того, способы в соответствии с настоящим изобретением можно использовать для стратификации терапии, при этом термин "стратификация терапии", в частности, относится к группировке или классификации пациентов в различные группы, такие как группы риска или получающие терапию группы, которые получают определенные дифференцированные терапевтические меры в зависимости от их классификации. Термин "стратификация терапии" также относится к группировке или классификации пациентов с инфекциями или с симптомами инфекционного заболевания в группу, которая не нуждается в получении определенных терапевтических мер, таких как лечение антибиотиками.

Способы в соответствии с настоящим изобретением также можно использовать для мониторинга. Термин "мониторинг" в контексте способа в соответствии с настоящим изобретением, касающегося ин-

фекционных заболеваний, относится к отслеживанию уже диагностированного инфекционного заболевания, нарушения, осложнения или риска, например, для анализа прогрессирования заболевания или влияния конкретного лечения или терапии на прогрессирование заболевания у тяжелобольного пациента или инфекционного заболевания у пациента. Термины "мониторинг терапии" и "терапевтический контроль" в контексте настоящего изобретения относятся к мониторингу и/или корректировке терапевтического лечения указанного субъекта, например, путем получения обратной связи, информирующей об эффективности терапии. Используемый в настоящем документе термин "терапевтическое ведение" относится к применению определенных терапевтических средств, терапевтических действий или медицинских вмешательств на основании уровня D-лактата, определенного в контексте настоящего изобретения. Это включает корректировку терапии или прекращение терапии.

Термин "инфекционное заболевание" предусматривает и включает все заболевания или нарушения, которые связаны с инфекцией и/или вызваны инфекцией, такой как, в частности, бактериальная, вирусная и/или грибковая инфекция. Используемый в настоящем документе термин "инфекция" относится к патологическому процессу, вызванному инвазией в обычно стерильную ткань или жидкость патогенных или потенциально патогенных возбудителей/патогенов, организмов и/или микроорганизмов, и предпочтительно относится к инфекции(ям), вызываемой (вызываемым) бактериями, вирусами, грибами и/или паразитами. Соответственно, инфекция может представлять собой бактериальную инфекцию, вирусную инфекцию и/или грибковую инфекцию. Инфекция может быть местной или системной инфекцией. Для целей настоящего изобретения вирусная инфекция может рассматриваться как инфекция, вызванная микроорганизмом.

Настоящее изобретение охватывает нозокомиальные инфекции. Нозокомиальные инфекции также называют внутрибольничными инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи, поскольку инфекции могут быть переданы в больнице, доме престарелых, реабилитационном учреждении, амбулаторной клинике или других клинических или медицинских учреждениях. Нозокомиальная инфекция может передаваться восприимчивому пациенту в клинических условиях различными способами. Инфекцию может распространять медицинский персонал в дополнение зараженному оборудованию, постельному белью или воздушно-капельной среде. Инфекция может происходить из внешней среды, другого инфицированного пациента, персонала, который может быть инфицирован, или, в некоторых случаях, источник инфекции не может быть определен. В некоторых случаях микроорганизм происходит из собственной микробиоты кожи пациента, становясь условно-патогенным после хирургического вмешательства или других процедур, нарушающих защитный кожный барьер. Хотя пациент мог заразиться инфекцией через собственную кожу, инфекция по-прежнему считается нозокомиальной, поскольку развивается в медицинском учреждении.

Согласно вариантам осуществления субъект, страдающий инфекцией, может одновременно страдать от более чем одного источника инфекции. Например, субъект может страдать бактериальной инфекцией и вирусной инфекцией; вирусной инфекцией и грибковой инфекцией; бактериальной и грибковой инфекцией, а также бактериальной инфекцией, грибковой инфекцией и вирусной инфекцией, или может страдать смешанной инфекцией, включающей одну или несколько инфекций, перечисленных в настоящем документе, включая потенциально суперинфекцию, например, одну или несколько бактериальных инфекций в дополнение к одной или нескольким вирусным инфекциям и/или к одной или нескольким грибковым инфекциям.

В контексте настоящего изобретения инфекционное заболевание предпочтительно связано с бактериальной и/или грибковой инфекцией, предпочтительно по меньшей мере с одним инфекционным возбудителем, выбранным из группы, включающей *Staphylococcus aureus*, коагулазонегативные стафилококки, *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, анаэробы, грамотрицательные бактерии и *Candida spp.*

Согласно одному варианту осуществления инфекция, подлежащая обнаружению или подлежащая тестированию, может быть выбрана из видов *Bordetella*, таких как *Bordetella pertussis*, *Borrelia*, таких как *Borrelia burgdorferi*, *Brucella*, таких как *Brucella abortus*, *Brucella canis*, *Brucella melitensis* или *Brucella suis*, *Campylobacter*, таких как *Campylobacter jejuni*, *Chlamydia* и *Chlamydomphila*, таких как *Chlamydia pneumonia*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydomphila psittaci*, *Clostridium*, таких как *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium*, таких как *Corynebacterium diphtheria*, *Enterococcus*, таких как *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia*, таких как *Escherichia coli*, *Francisella*, таких как *Francisella tularensis*, *Haemophilus*, таких как *Haemophilus influenza*, *Helicobacter*, таких как *Helicobacter pylori*, *Legionella*, таких как *Legionella pneumophila*, *Leptospira*, таких как *Leptospira interrogans*, *Listeria*, таких как *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium*, таких как *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycoplasma*, таких как *Mycoplasma pneumonia*, *Neisseria*, таких как *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas*, таких как *Pseudomonas aeruginosa*, *Rickettsia*, таких как *Rickettsia rickettsia*, *Salmonella*, таких как *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella*, таких как *Shigella sonnei*, *Staphylococcus*, таких как *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus*, таких как *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumonia*, *Streptococcus pyogenes*, *Treponema*, таких как *Treponema pallidum*, *Vibrio*, таких как *Vibrio cholera*, *Yersinia*, таких как *Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolitica* или *Yersinia pseudotuberculosis*.

Патогенные грибки представляют собой грибки, которые вызывают заболевание у людей или других организмов. Виды *Candida* являются важными патогенами человека, которые, как хорошо известно, вызывают оппортунистические инфекции у хозяев с ослабленным иммунитетом (например, у перенесших трансплантацию пациентов, страдающих синдромом приобретенного иммунодефицита СПИДом, больных раком пациентов). Инфекции трудно поддаются лечению и могут быть очень тяжелыми: 30-40% системных инфекций приводят к смерти. Аспергиллез вызывается еще одним потенциальным грибковым патогеном. *Aspergillus* может вызывать заболевание тремя основными способами: через продуцирование микотоксинов; за счет индуцирования аллергических реакций и через локализованные или системные инфекции. В отношении последних двух категорий иммунный статус хозяина имеет решающее значение. Наиболее распространенными патогенными видами являются *Aspergillus fumigatus* и *Aspergillus flavus*. *Aspergillus flavus* продуцирует афлатоксин, который является одновременно токсином и канцерогеном и потенциально может загрязнять пищевые продукты. *Aspergillus fumigatus* и *Aspergillus clavatus* могут вызывать заболевание. *Cryptococcus neoformans* может вызывать заболевание у людей. *Cryptococcus laurentii* и *Cryptococcus albidus* иногда вызывают заболевания средней и тяжелой степени у людей с ослабленным иммунитетом. *Cryptococcus gattii* является эндемиком тропических частей континента Африки и Австралии и может вызывать заболевание. *Histoplasma capsulatum* может вызывать гистоплазмоз у людей, собак и кошек. *Pneumocystis jirovecii* (или *Pneumocystis carinii*) может вызывать форму пневмонии у людей с ослабленной иммунной системой, таких как недоношенные дети, пожилые люди и пациенты со СПИДом. *Stachybotrys chartarum* или "черная плесень" может вызывать поражение дыхательных путей и сильные головные боли.

Согласно одному варианту осуществления инфекция, подлежащая обнаружению или подлежащая тестированию, может быть выбрана из инфекции, вызываемой *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter Iwoffii*, *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas caviae*, *Morganella morganii*, *Aeromonas hydrophila*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Aspergillus flavus*, *Neisseria meningitidis*, *Aspergillus nidulans*, *Pasteurella multocida*, *Aspergillus niger*, *Pasteurella pneumotropica*, *Aspergillus terreus*, *Propionibacterium acnes*, *Bacillus anthracis*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus cereus*, *Providencia rettgeri*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacteroides fragilis*, *Salmonella choleraesuis*, *Brucella melitensis*, *Serratia liquefaciens*, *Burkholderia cepacia*, *Serratia marcescens*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Candida dubliniensis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida glabrata*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Candida krusei*, *Staphylococcus hominis*, *Candida parapsilosis*, *Staphylococcus saccharolyticus*, *Candida tropicalis*, *Staphylococcus warneri*, *Capnocytophaga canimorsus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Citrobacter braakii*, *Streptococcus agalactiae*, *Citrobacter freundii*, *Streptococcus anginosus*, *Clostridium perfringens*, *Streptococcus bovis*, *Corynebacterium jeikeium*, *Streptococcus constellatus*, *Enterobacter aerogenes*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Enterobacter cloacae*, *Streptococcus mutans*, *Enterobacter sakazakii*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus salivarius*, *Escherichia coli*, *Streptococcus sanguinis*, *Shigella* spp., *Streptococcus suis*, *Gemella haemolysans*, *Vibrio vulnificus*, *Gemella morbillorum*, *Yersinia enterocolitica*, *Haemophilus influenzae*, *Yersinia pestis*, *Kingella kingae*, *Yersinia pseudotuberculosis* и *Klebsiella oxytoca*.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения инфекционное заболевание представляет собой инфекцию сустава, инфекцию протезного сустава (РЖ), инфекцию центральной нервной системы, менингит, перитонит, инфекцию плевральной полости, инфекцию перикардального пространства и/или инфекцию кровотока.

В контексте вариантов осуществления настоящего изобретения образец предпочтительно соответствует физиологической жидкости, которая находится в контакте с тканью или органом, которые предпочтительно инфицированы. Например, в случае инфекции центральной нервной системы ЦНС или менингита предпочтительно можно использовать образец спинномозговой жидкости СМЖ.

Менингит представляет собой острое воспаление защитных оболочек головного мозга и спинного мозга, известных под общим названием мозговые оболочки. Наиболее частыми симптомами являются жар, головная боль и скованность шеи. Другие симптомы включают спутанность сознания или измененное сознание, рвоту и неспособность переносить свет или громкие звуки. Маленькие дети часто проявляют только неспецифические симптомы, такие как раздражительность, сонливость или плохой аппетит. Если присутствует сыпь, это может указывать на конкретную причину менингита; например, менингит, вызванный менингококковыми бактериями, может сопровождаться характерной сыпью. Воспаление может быть вызвано инфицированием вирусами, бактериями или другими микроорганизмами, реже - некоторыми лекарственными средствами. Менингит может быть опасным для жизни из-за близости воспаления к головному мозгу и спинному мозгу; следовательно, состояние классифицируется как требующее срочной медицинской помощи. Менингит можно диагностировать или исключать по люмбальной пункции, при которой в позвоночный канал вводится игла для взятия образца спинномозговой жидкости (СМЖ).

Используемый в настоящем документе термин "инфекция крови" может включать в системную инфекцию кровотока, сепсис, тяжелый сепсис и/или септический шок.

Инфекция сустава, также известная как септический артрит или инфекционный артрит, представля-

ет собой инвазию сустава инфекционным возбудителем, что приводит к воспалению сустава. Симптомы обычно включают покраснение, жар и боль в одном суставе, связанные со снижением способности сустава двигаться. Начало обычно быстрое. Другие симптомы могут включать жар, слабость и головную боль. Иногда может быть затронуто более одного сустава. Причины включают бактерии, вирусы, грибки и паразиты. Факторы риска включают искусственный/протезный сустав, перенесенный артрит, диабет и плохую иммунную функцию. Чаще всего суставы инфицируются через кровь, но могут также инфицироваться через травму или инфекцию вокруг сустава. Диагностика обычно основывается на аспирации суставной жидкости и ее культивировании. Начальное лечение обычно включает антибиотики, такие как ванкомицин, цефтриаксон или цефтазидим. Также может быть проведено хирургическое вмешательство по очистке сустава. Без раннего лечения могут возникать долговременные проблемы с суставами. Септический артрит ежегодно встречается у приблизительно 5 человек на 100000. Чаще встречается у пожилых людей. При лечении умирают приблизительно 15% людей, а без лечения умирают 66%.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения способ в соответствии с настоящим изобретением может включать стадию лечения в случае, если электрохимическое определение D-лактата указывает на наличие инфекционного заболевания. На такой стадии лечения для соответствующего пациента могут быть применены одна или несколько терапевтических мер, раскрываемых в настоящем документе.

В контексте настоящего изобретения термин "медицинское лечение" или "лечение" включает различные виды лечения и терапевтические стратегии, в частности, виды лечения, которые известны квалифицированному специалисту для соответствующего диагностированного инфекционного заболевания. В контексте настоящего изобретения лечение может включать лечение антибиотиками, такими как внутривенный антибиотик, пероральные антибиотики или антибиотики для местного применения. Медицинское лечение в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой лечение антибиотиками, при котором можно вводить один или несколько "антибиотиков" или "антибиотических средств", если диагностирована инфекция или определены симптомы инфекционного заболевания.

Антибиотики или антибиотические средства в соответствии с настоящим изобретением также потенциально охватывают противогрибковые или противовирусные соединения, используемые для лечения диагностированной инфекции или сепсиса. Антибиотические средства, обычно применяемые при лечении любой данной инфекции, которые можно использовать в контексте настоящего изобретения, с разделением на классы по патогенам, включают

спектр действия - грамположительные: пенициллины (ампициллин, амоксициллин), устойчивые к пенициллиназе (диклоксациллин, оксациллин), цефалоспорины (1-го и 2-го поколения), макролиды (эритромицин, кларитромицин, азитромицин), хинолоны (гatifлоксацин, моксифлоксацин, левофлоксацин), ванкомицин, сульфонамид/триметоприм, клиндамицин, тетрациклины, хлорамфеникол, линезолид, синергид; спектр действия - грамотрицательные: пенициллины широкого спектра действия (тикарциллин, клавуланат, пиперациллин, тазобактам), цефалоспорины (2-го, 3-го и 4-го поколения), аминогликозиды, макролиды, азитромицин, хинолоны (ципрофлоксацин), монобактамы (азтреонам), сульфонамид/триметоприм, карбапенемы (имипенем), хлорамфеникол; спектр действия - *Pseudomonas*: ципрофлоксацин, аминогликозиды, некоторые цефалоспорины 3-го поколения, цефалоспорины 4-го поколения, пенициллины широкого спектра действия, карбапенемы;

противогрибковые виды лечения: аллиамин, амфотерицин В, флуконазол и другие азолы, итраконазол, вориконазол, позаконазол, равуконазол, эхинокандины, флуцитозин, сордарины, ингибиторы хитинсинтетазы, ингибиторы топоизомеразы, липопептиды, прадицины, липосомальный нистатин, вориконазол, эхинокандины, имидазол, триазол, тиазол, полиен;

противовирусные виды лечения: абакавир, ацикловир (Aciclovir), олигомеризер активированной каспазы, адефовир, амантадин, ампренавир (Agenegase), амплиген, арбидол, атазанавир, атрипла, балавир, цидофовир, комбивир, долутегравир, дарунавир, делавирдин, диданозин, двухнитевая рибонуклеиновая кислота РНК, докозанол, эдоксудин, эфавиренц, эмтрицитабин, энфувиртид, энтекавир, эколиевир, фамцикловир, комбинация с фиксированной дозой (противоретровирусная), фомивирсен, фосампренавир, фоскарнет, фосфонет, ингибитор слияния, ганцикловир, ибацитабин, имуновир, идоксуридин, имиквимод, индинавир, инозин, ингибитор интегразы, интерферон III типа, интерферон II типа, интерферон I типа, интерферон, ламивудин, лопинавир, ловирид, маравирок, мороксидин, метизазон, морфолинос, нельфинавир, невирапин, нексавир, нитазоксанид, аналоги нуклеозидов, новир, осельтамивир (тамифлю), пегинтерферон альфа-2а, пенцикловир, перамивир, плеконарил, подофиллотоксин, ингибитор протеазы (фармакология), ралтегравир, ингибитор обратной транскриптазы, рибавирин, рибозимы, рифампицин, римантадин, ритонавир, РНКазы Н, ингибиторы протеазы, пирамидин, саквинавир, софосбувир, ставудин, синергетический усилитель (противоретровирусный), теллапревир, тенофовир, тенофовир дизопротексил, типранавир, трифлуридин, тризивир, тромантадин, трувада, валацикловир (Valtrex), валганцикловир, викивирок, видарабин, вирамин, зальцитабин, занамивир (Relenza), зидовудин.

Кроме того, антибиотические средства включают бактериофаги для лечения бактериальных инфекций, можно использовать синтетические противомикробные пептиды или антагонисты железа/хелатирующее железное средство. Также терапевтические антитела или антагонист против патогенных

структур, такие как антитела против VAP (от англ. - vascular adhesion protein - сосудистый адгезивный белок), вакцинация против устойчивых клонов, введение иммунных клеток, таких как *in vitro* примированные или модулированные эффекторные Т-клетки, представляют собой антибиотические средства, которые являются вариантами лечения в контексте настоящего изобретения. Дополнительные антибиотические средства/виды лечения или терапевтические стратегии против инфекции или для предотвращения новых инфекций включают применение антисептических средств, обеззараживающих продуктов, противовирусных средств, таких как липосомы, санитарные меры, уход за раной, хирургическое вмешательство.

Также можно комбинировать несколько вышеупомянутых антибиотических средств или стратегий лечения.

Согласно вариантам осуществления настоящее изобретение включает введение антибиотика, подходящего для лечения, на основе информации, полученной раскрываемым в настоящем документе способом.

Способы в соответствии с настоящим изобретением особенно выгодны, поскольку электрохимическое измерение D-лактата в образцах пациентов, как оказалось, позволяет проводить диагностические тесты с очень высокой специфичностью и чувствительностью по сравнению с известными способами, которые являются неоптимальными в отношении по меньшей мере одного из этих тестовых свойств.

Чувствительность и специфичность представляют собой статистические показатели эффективности бинарного классификационного теста, также известного в статистике как классификационная функция, что широко используется в медицине. Чувствительность (также называемая показателем истинных положительных результатов, отзывом или вероятностью обнаружения в некоторых областях) измеряет долю фактических положительных результатов, которые правильно идентифицированы как таковые (например, процент больных людей, у которых правильно идентифицировано наличие состояния). Специфичность (также называемая показателем истинных отрицательных результатов) измеряет долю фактических отрицательных результатов, которые правильно идентифицированы как таковые (например, процент здоровых людей, у которых правильно идентифицировано отсутствие состояния). Во многих тестах, включая диагностические медицинские тесты, чувствительность представляет собой степень, в которой не игнорируются фактические положительные результаты (поэтому ложных отрицательных результатов не много), а специфичность представляет собой степень, в которой классифицируются фактические отрицательные результаты как таковые (поэтому ложных положительных результатов не много). Таким образом, высокочувствительный тест редко игнорирует действительный положительный результат (например, показывает "ничего неблагоприятного", несмотря на наличие чего-то неблагоприятного); высокоспецифичный тест редко регистрирует положительную классификацию чего-либо, что не является целью тестирования (например, обнаружение одного вида бактерий и принятие его за другой, близкородственный, который является истинной целью).

Используемые в настоящем документе чувствительность и специфичность диагностического и/или prognostического теста зависят не только от аналитического "качества" теста, они также зависят от определения того, что является аномальным результатом. На практике кривые операционной характеристики приемника (кривые ROC (от англ. - Receiver Operating Characteristic - операционная характеристика приемника)) обычно рассчитывают путем построения графика зависимости значения переменной от ее относительной частоты у "нормальных" (т.е. очевидно здоровых индивидуумов, не имеющих инфекции, и у "больных" популяций, например, у субъектов с инфекцией). В случае настоящего изобретения распределение уровней D-лактата для субъектов с заболеванием/состоянием и без такового, вероятно, будет перекрываться. В таких условиях тест не позволяет абсолютно отличить нормальное состояние от заболевания со 100% точностью, а область перекрывания может указывать на то, где тест не может отличить нормальное состояние от заболевания. Выбирают порог, ниже которого тест не считается нормальным, а выше которого тест считается нормальным или ниже или выше которого тест указывает на конкретное состояние, например, инфекцию. Площадь под кривой ROC является мерой вероятности того, что воспринимаемое измерение позволит правильно идентифицировать состояние. Кривые ROC можно использовать, даже если результаты теста не обязательно дают точное число. При условии, что можно ранжировать результаты, можно построить кривую ROC. Например, результаты теста на образцах "заболевания" могут быть ранжированы по степени (например, 1 - низкая, 2 - нормальная и 3 - высокая). Это ранжирование можно сопоставлять с результатами в "нормальной" популяции и создать кривую ROC. Эти способы хорошо известны в уровне техники; см., например, Hanley et al. 1982. *Radiology* 143: 29-36. Предпочтительно порог выбирают так, чтобы обеспечить площадь кривой ROC более приблизительно 0,5, более предпочтительно более приблизительно 0,7, еще более предпочтительно более приблизительно 0,8, еще более предпочтительно более приблизительно 0,85 и наиболее предпочтительно более приблизительно 0,9. Термин "приблизительно" в данном контексте относится к плюс/минус 5% данного измерения.

Горизонтальная ось кривой ROC представляет (1 - специфичность), которая увеличивается с увеличением частоты ложных положительных результатов. Вертикальная ось кривой представляет чувствительность, которая увеличивается с частотой истинных положительных результатов. Таким образом, для

конкретной выбранной отсечки может быть определено значение (1 - специфичность), и может быть получена соответствующая чувствительность. Площадь под кривой ROC является мерой вероятности того, что измеренный уровень маркера позволит правильно идентифицировать заболевание или состояние. Таким образом, площадь под кривой ROC может быть использована для определения эффективности теста.

Используемый в настоящем документе термин "пациент" или "субъект" может представлять собой позвоночное. В контексте настоящего изобретения термин "субъект" включает как людей, так и животных, в частности, млекопитающих, и другие организмы.

В соответствии с настоящим изобретением пациент, проявляющий симптомы инфекционного заболевания, представляет собой субъекта, у которого наблюдается без ограничения одно или несколько из лихорадки, диареи, усталости, мышечных болей, кашля, укуса животным, наличия затрудненного дыхания, сильной головной боли с лихорадкой, сыпи или отека, необъяснимой или продолжительной лихорадки или проблем со зрением. Другими симптомами могут быть жар и озноб, очень низкая температура тела, олигурия, учащенный пульс, учащенное дыхание, тошнота и рвота. Согласно вариантам осуществления симптомами инфекционного заболевания являются лихорадка, диарея, усталость, мышечные боли, учащенный пульс, учащенное дыхание, тошнота, рвота и/или кашель.

Используемый в настоящем документе термин "образец" означает биологический образец, полученный или выделенный у пациента или субъекта. Термин "образец", используемый в настоящем документе, может, например, относиться к образцу физиологической жидкости, образцу гомогенизированной ткани, образцу крови, образцу сыворотки крови, образцу плазмы, образцу мочи, суставному аспирату, образцу синовиальной жидкости, образцу асцита, образцу перитонеальной жидкости, образцу плевральной жидкости, образцу перикардальной жидкости и/или образцу спинномозговой жидкости. Образец предпочтительно выделяют или получают с целью диагностики, прогнозирования или оценивания представляющего интерес субъекта, такого как пациент. Образец в соответствии с настоящим изобретением может быть образцом физиологической жидкости, такой как кровь, сыворотка крови, плазма, спинномозговая жидкость, моча, слюна, мокрота, плевральный выпот, клетки, клеточный экстракт, образец ткани, биоптат ткани, образец стула и т.п. В частности, образец представляет собой кровь, плазму крови, сыворотку крови или мочу.

Используемый в настоящем документе образец крови представляет собой образец цельной крови, который не обрабатывается с целью изменения состава. В частности, образец крови содержит клетки крови. Образцы сыворотки крови и плазмы получают из крови. Термин "плазма" в контексте настоящего изобретения представляет собой практически бесклеточную надосадочную жидкость крови, содержащую антикоагулянт, полученную после центрифугирования. Иллюстративные антикоагулянты включают соединения, связывающие ионы кальция, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота ЭДТК или цитрат, и ингибиторы тромбина, такие как гепаринаты или гирудин. Бесклеточную плазму можно получить центрифугированием антикоагулированной крови (например, обработанной цитратом, ЭДТК или гепаринированной крови), например, в течение по меньшей мере 15 минут при 2000-3000 д. Термин "сыворотка крови" в контексте настоящего изобретения представляет собой жидкую фракцию цельной крови, которую собирают после того, как обеспечивают крови возможность свернуться. При центрифугировании коагулированной крови (свернувшейся крови) сыворотка крови может быть получена в виде надосадочной жидкости.

Образцы спинномозговой жидкости (СМЖ) собирают путем пункции полостей тела, заполненных СМЖ, также называемой ликвором. СМЖ в основном собирают при люмбальной пункции центрального канала спинного мозга. Спинномозговая жидкость (СМЖ) представляет собой прозрачную бесцветную жидкость организма, находящуюся в головном мозге и спинном мозге. Она продуцируется специализированными эпендимными клетками сосудистых сплетений желудочков головного мозга и абсорбируется арахноидальными грануляциями. Одновременно содержится приблизительно 125 мл СМЖ, а у взрослых людей ежедневно вырабатывается приблизительно 500 мл. СМЖ действует как подушка или буфер, обеспечивая базовую механическую и иммунологическую защиту головного мозга внутри черепа. СМЖ также выполняет жизненно важную функцию в церебральной ауторегуляции церебрального кровотока. СМЖ занимает субарахноидальное пространство (между арахноидальной оболочкой и мягкой мозговой оболочкой) и желудочковую систему вокруг и внутри головного мозга и спинного мозга. Она заполняет желудочки головного мозга, цистерны и борозды, а также центральный канал спинного мозга. Существует также соединение субарахноидального пространства с костным лабиринтом внутреннего уха через перилимфатический проток, где перилимфа сообщается со спинномозговой жидкостью. Эпендимные клетки сосудистых сплетений имеют несколько подвижных ресничек на их апикальных поверхностях, которые колеблются, чтобы перемещать СМЖ через желудочки. Образец СМЖ можно забирать с помощью люмбальной пункции. Это может выявить внутричерепное давление, а также указать на заболевание, включая инфекции головного мозга или окружающих его мозговых оболочек.

Образцы синовиальной жидкости особенно предпочтительны в контексте настоящего изобретения для диагностики инфекций суставов, в частности, в случае инфекций протезных суставов. Синовиальная жидкость, также называемая синовия, представляет собой вязкую неньютоновскую жидкость, обнаружи-

ваемую в полостях синовиальных суставов. Основная роль синовиальной жидкости заключается в уменьшении трения между суставными хрящами синовиальных суставов во время движения. Синовиальная жидкость представляет собой небольшой компонент трансцеллюлярной жидкости, входящей в состав внеклеточной жидкости. Внутренняя оболочка синовиальных суставов называется синовиальной оболочкой и выделяет синовиальную жидкость в полость сустава. Синовиальная жидкость представляет собой ультрафильтрат из плазмы и содержит полученные из плазмы крови белки и белки, которые продуцируются клетками в тканях суставов. Жидкость содержит гиалуронан, секретируемый фибробластоподобными клетками синовиальной оболочки, лубрицин (протеогликан 4; PRG4 (от англ. - proteoglycan 4)), секретируемый поверхностными хондроцитами суставного хряща, и интерстициальную жидкость, отфильтрованную из плазмы крови. Жидкость образует тонкий слой (примерно 50 мкм) на поверхности хряща, а также просачивается в микрополости и неровности на поверхности суставного хряща, заполняя все пустое пространство. Жидкость суставного хряща эффективно служит резервом синовиальной жидкости. Во время движения синовиальная жидкость, удерживаемая в хряще, механически выдавливается, чтобы поддерживать слой жидкости на поверхности хряща (так называемая просачивающаяся смазка). Функции синовиальной жидкости включают, в частности, уменьшение трения в суставе, амортизацию, транспортировку питательных веществ и отходов. Синовиальная ткань стерильна и состоит из васкуляризированной соединительной ткани, у которой отсутствует базальная мембрана. Синовиальную жидкость можно собрать шприцем в ходе процедуры, называемой артроцентезом, также известной как суставная аспирация.

Синовиальная жидкость может быть классифицирована на нормальную, невоспалительную, воспалительную, септическую и геморрагическую, при этом оцениваемые параметры могут включать вязкость, прозрачность, цвет и количество лейкоцитов. Такие параметры можно оценивать в дополнение к уровню D-лактата в контексте определенных вариантов осуществления настоящего изобретения.

Выражение "определение уровня D-лактата" относится к количественному измерению или обнаружению D-лактата. Уровень D-лактата можно определять с использованием различных измеряемых параметров, таких как напряжение или ток, которые соответствуют определенной концентрации D-лактата в контексте электрохимического измерения. При спектрофотометрических измерениях можно определить светопоглощение химического вещества, чтобы определить количество соответствующего вещества.

Лактаты представляют собой соли и сложные эфиры молочной кислоты. Молочная кислота встречается в двух энантиомерных формах, поэтому существуют также две соответствующие формы ее аниона лактата, которые обычно называют D- и L-формами в соответствии с их ориентацией в проекции Фишера. Молочная кислота представляет собой сильную карбоновую кислоту, которая в высокой степени диссоциирует в физиологических условиях. Анион имеет структурную формулу  $\text{CH}_3\text{-CH(OH)-COO-}$  и называется лактатом. Лактат, образующийся в организме человека, присутствует исключительно в L(+)-форме с вращением по часовой стрелке.

Сложные эфиры молочной кислоты ( $\text{CH}_3\text{-CH(OH)-COOR}$ ) также называют лактатами. Этиллактат (сложный этиловый эфир молочной кислоты) является наиболее важным представителем этих сложных эфиров и используется, среди прочего, в качестве растворителя. Другим представителем является бутиллактат (сложный бутиловый эфир молочной кислоты).

Самым распространенным лактатом, находящимся в организме человека, является лактат натрия. В основном он продуцируется в скелетных мышцах. Когда глюкоза или гликоген расщепляется до пирувата при гликолизе, кофермент  $\text{NAD}^+$  восстанавливается до  $\text{NADH/H}^+$ . Чтобы гликолиз происходил, он должен присутствовать в окисленной форме, такой как  $\text{NAD}^+$ . Только тогда он может действовать как акцептор электронов при окислении глицеральдегид-3-фосфата до 1,3-бисфосфоглицерата глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой. Поскольку в мышечных волокнах, бедных митохондриями, не весь  $\text{NADH/H}^+$  может так быстро окисляться при увеличении нагрузки, организм помогает себе сам, восстанавливая пируват до лактата. В процессе  $\text{NADH/H}^+$  повторно окисляется до  $\text{NAD}^+$ . Восстановление глюкозы до лактата также известно как гомоферментативная ферментация молочной кислоты. В медицине L-лактат используют в качестве маркера ишемии, поскольку он образуется в ткани при недостатке кислорода.

Микроорганизмы также продуцируют лактат во время ферментации молочной кислоты. В отличие от людей, они также могут образовывать D-изомер с помощью D-лактатдегидрогеназы.

Лактатдегидрогеназа (LDH или LD (от англ. - lactate dehydrogenase)) представляет собой фермент, находящийся почти во всех живых клетках. LDH катализирует превращение лактата в пируват и обратно, поскольку он превращает  $\text{NAD}^+$  в  $\text{NADH}$  и обратно. Дегидрогеназа представляет собой фермент, который переносит гидрид от одной молекулы к другой.

D-лактатдегидрогеназа (дегидрогеназа D-молочной кислоты, D-LDH, D-специфическая лактатдегидрогеназа, D-(-)-лактатдегидрогеназа ( $\text{NAD}^+$ ), D-дегидрогеназа молочной кислоты, D-лактатдегидрогеназа) представляет собой фермент с систематическим названием (R)-лактат: $\text{NAD}^+$  оксидоредуктаза. Этот фермент катализирует следующую химическую реакцию:  $(\text{R})\text{-лактат} + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{пируват} + \text{NADH}$ . D-LDH представляет собой предпочтительную связывающую D-лактат молекулу в соответствии с настоящим изобретением. Предпочтительной D-LDH является D-LDH Staphy-

*Staphylococcus epidermidis*.

В контексте настоящего изобретения связывающая D-лактат молекула представляет собой молекулу любого типа, которая специфически связывается с D-лактатом, но не с L-лактатом или другими молекулами, структурно родственными D-лактату. Согласно предпочтительным вариантам осуществления связывающая D-лактат молекула представляет собой фермент, который связывается с D-лактатом, чтобы катализировать реакцию, которая включает D-лактат в качестве субстрата. Наиболее предпочтительно связывающая D-лактат молекула представляет собой D-LDH.

Дополнительные связывающие D-лактат молекулы, подлежащие использованию в контексте настоящего изобретения, включают без ограничения D-LDH, такую как D-LDH микробного происхождения, например, D-LDH из *Staphylococcus epidermidis*; D-лактатоксидазу, такую как D-лактатоксидазу микробного происхождения, например, D-лактатоксидазу из *Glucanobacter* или *Zymomonas mobilis*.

В контексте способа в соответствии с настоящим изобретением определенный уровень D-лактата может указывать на наличие инфекционного заболевания. С его помощью можно сравнивать определенный уровень с соответствующим контролем, таким как контрольный образец или множественный образец из контрольной группы, такой как здоровые индивидуумы, или с эталонным значением, таким как пороговое значение или значение отсечки, при этом концентрация, превышающая таковую в контрольном образце, или равная эталонному значению, или превышающая эталонное значение, может указывать на инфекционное заболевание или обеспечивать прогностическое значение в отношении прогрессирования инфекционного заболевания.

В случае определения РЛ контрольной группой могут служить пациенты с протезными суставами, не страдающие РЛ. На основании сравнения определенных уровней D-лактата в образце индивидуума, страдающего соответствующим представляющим интерес инфекционным заболеванием, и уровней, определенных для соответствующей контрольной группы, можно получить подходящие эталонные значения, такие как значение отсечки или пороговое значение, при этом уровни, равные уровням D-лактата или превышающие уровни D-лактата, указывают на наличие соответствующего инфекционного заболевания.

В контексте настоящего изобретения можно использовать контрольные значения/образец или стандарты, которые обеспечивают образцы с D-лактатом или представляют его контрольные количества, уже полученные из предыдущих аналитических тестов. Можно использовать контрольные значения, полученные в результате тестирования когорт или других больших количеств субъектов, страдающих каким-либо данным инфекционным заболеванием, или контрольной группы. Соответствующие статистические средства для анализа и сравнения таких наборов данных известны специалистам в данной области. Контрольные образцы для положительных контролей (например, от больных) или отрицательных контролей (от здоровых субъектов) могут быть использованы для эталонных значений при одновременном или одновременном сравнении.

Используемый в настоящем документе термин "электрохимическая сенсорная система", которую также можно называть "биосенсором", относится к аналитическому устройству, используемому для обнаружения вещества/аналита, в данном случае D-лактата, которое объединяет биологический компонент с электрохимическим детектором. Сенсор содержит чувствительный биологический элемент, например, ткань, микроорганизмы, органеллы, молекулу, клеточные рецепторы, ферменты, антитела, нуклеиновые кислоты и т.д., который представляет собой биологически полученный материал или биомиметический компонент, который взаимодействует с представляющим интерес химическим аналитом, связывается с ним или распознает его. Биологически чувствительные элементы также могут быть созданы с помощью биологической инженерии.

Биосенсор дополнительно содержит преобразователь или детекторный элемент, который преобразует сигнал в электрохимический сигнал в результате взаимодействия аналита с биологическим элементом. На основе этого преобразования сигнала можно легко измерить и количественно определить уровни аналита в образце.

Электрохимическая система может содержать или может быть подключена к устройству считывания биосенсора, которое имеет связанные с ним электронные устройства или процессоры сигналов для соединения с трансформатором. Такие устройства считывания предпочтительно отвечают за отображение результатов в удобном для пользователя виде.

Биосенсор в соответствии с настоящим изобретением может содержать участок биораспознавания, компонент биопреобразователя и предпочтительно электронную систему, которая включает один или несколько из усилителя сигнала, процессора и дисплея. Компонент распознавания, часто называемый биорецептором, использует биомолекулы из организмов или рецепторы, смоделированные по биологическим системам, для взаимодействия с представляющим интерес аналитом. Это взаимодействие измеряется биопреобразователем, который выдает измеряемый сигнал, пропорциональный присутствию целевого аналита в образце. Общая цель конструкции биосенсора состоит в обеспечении быстрого и удобного тестирования в месте оказания медицинской помощи (РОС (от англ. - point of concern or care)), где был взят образец.

Биорецептор предназначен для взаимодействия с конкретным представляющим интерес аналитом

для получения измеряемого преобразователем эффекта. Высокая селективность в отношении аналита среди матрицы других химических или биологических компонентов является ключевым требованием к биорецептору. Хотя тип используемой биомолекулы может широко варьировать, биосенсоры можно классифицировать в соответствии с общими типами взаимодействий биорецепторов, включая антитело/антиген, ферменты/лиганды, нуклеиновые кислоты/дезоксирибонуклеиновая кислота ДНК, клеточные структуры/клетки или биомиметические материалы. В контексте настоящего изобретения биорецептор представляет собой связывающие D-LDH молекулы, такие как предпочтительно D-LDH. Соответственно, биосенсор/электрохимическая сенсорная система в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно предусматривает взаимодействие фермент/лиганд.

Способности к специфическому связыванию и каталитическая активность ферментов делают их популярными биорецепторами, которые обладают преимуществом по нескольким причинам, включающим пригодность для нескольких разных способов трансдукции при обнаружении аналита. Следует отметить, что, поскольку ферменты не расходуются в реакциях, биосенсор можно легко использовать непрерывно. Каталитическая активность ферментов также обеспечивает более низкие пределы обнаружения по сравнению с обычными методиками связывания.

Предпочтительно, в контексте биосенсора/электрохимической сенсорной системы биологические элементы, в данном случае связывающая D-лактат молекула, такая как D-LDH, присоединяется к поверхности сенсора, который может быть металлом, полимером или стеклом, например. Самый простой способ заключается в функционализации поверхности, чтобы покрыть ее биологическими элементами. Это можно сделать с помощью полилизина, аминосилана, эпоксисилана или нитроцеллюлозы в случае кремниевых чипов/кварцевого стекла. Впоследствии связанный биологический агент может быть, например, зафиксирован послойным осаждением противоположно заряженных полимерных покрытий. В качестве альтернативы, можно использовать трехмерные решетки (гидрогель/ксерогель) для химического или физического захвата их (при этом под химическим захватом подразумевается, что биологический элемент удерживается на месте прочной связью, при этом физически он удерживается на месте, не имея возможности проходить через поры гелевой матрицы). Наиболее широко используемым гидрогелем является золь-гель, стеклообразный диоксид кремния, образованный полимеризацией силикатных мономеров (добавленных в виде тетраалкилортосиликатов, таких как TMOS (от англ. - tetramethoxysilane - тетраметоксисилан) или TEOS (от англ. - tetraethoxysilane - тетраэтоксисилан)) в присутствии биологических элементов (наряду с другими стабилизирующими полимерами, такими как полиэтиленгликоль ПЭГ) в случае физического захвата. Другую группу гидрогелей, которые затвердевают в условиях, подходящих для клеток или белка, составляет акрилатный гидрогель, который полимеризуется при иницировании радикалами. Одним из типов инициатора радикальной полимеризации является пероксидный радикал, обычно образующийся путем объединения персульфата с TEMED (от англ. - tetramethylethylenediamine - тетраметилэтилендиамин) (полиакриламидный гель также обычно используют для электрофореза белков); в качестве альтернативы можно использовать свет в сочетании с фотоинициатором, таким как ДМФА (2,2-диметокси-2-фенилацетофенон).

Электрохимические биосенсоры обычно основаны на ферментативном катализе реакции, которая продуцирует или потребляет электроны (такие ферменты справедливо называются окислительно-восстановительными ферментами). Подложка сенсора обычно содержит три электрода: электрод сравнения, рабочий/электрод определения и противоелектрод. Целевой аналит участвует в реакции, которая происходит на активной поверхности электрода, и реакция может либо вызвать перенос электронов через двойной слой (создавая ток), либо способствовать потенциалу двойного слоя (создавая напряжение).

Соответственно, можно либо измерить ток (скорость потока электронов теперь пропорциональна концентрации аналита) при фиксированном потенциале, либо можно измерить потенциал при нулевом токе (это дает логарифмический отклик). Следует отметить, что потенциал рабочего/детектирующего/активного электрода чувствителен к пространственному заряду, и это часто используется.

Потенциометрический биосенсор (потенциал, создаваемый при нулевом токе) дает логарифмический отклик с высоким динамическим диапазоном. Такие биосенсоры часто изготавливают путем трафаретной печати рисунков электродов на пластиковой подложке, покрытой проводящим полимером, а затем прикрепляют фермент/биосенсор. У них всего два электрода, и они чрезвычайно чувствительны и надежны. Они позволяют обнаруживать аналиты на уровнях, ранее достижимых только с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии ВЭЖХ и жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии ЖХ/МС и без тщательной подготовки образцов.

Все биосенсоры обычно предусматривают минимальную подготовку образца, так как биологический чувствительный компонент высокоселективен в отношении рассматриваемого аналита. Сигнал создается электрохимическими и физическими изменениями в слое проводящего полимера из-за изменений, происходящих на поверхности сенсора. Такие изменения могут быть связаны с ионной силой, pH, гидратацией и окислительно-восстановительными реакциями, последние из-за того, что ферментная метка переключает субстрат. Полевые транзисторы, в которых область затвора была модифицирована ферментом/биосенсором, также могут обнаруживать очень низкие концентрации различных аналитов, поскольку связывание аналита с областью затвора FET (от англ. - field effect transistor - полевой транзистор) вы-

зывает изменение тока от стока к истоку.

Электрохимические биосенсоры в соответствии с настоящим изобретением используют для *in vitro* измерений D-лактата в образце. Измерение биосенсором может происходить в тестовой пробирке, культуральной чашке, микротитровальном планшете или в другом месте за пределами живого организма. В сенсоре используется биорецептор и преобразователь, раскрываемые выше. Предпочтительным является то, что настоящее изобретение может быть использовано в качестве теста в месте оказания медицинской помощи (РОСТ (от англ. - point-of-care test)), т.е. в том месте, где требуется тест. Соответственно, предпочтительно, чтобы биосенсор в соответствии с настоящим изобретением был переносным или портативным, предпочтительно переносным биосенсором. Устранение необходимости лабораторного тестирования может сэкономить время и деньги. Биосенсор РОСТ можно отправить прямо на место и можно использовать быстрый и простой тест.

Способы электрохимического определения в соответствии с настоящим изобретением включают методики аналитической химии, которые исследуют аналит путем измерения потенциала (вольт) и/или тока (амперов), предпочтительно в электрохимической ячейке, содержащей аналит. Эти способы можно разбить на несколько категорий в зависимости от того, какие аспекты ячейки контролируются, а какие измеряются. К трем основным категориям относятся потенциометрия (измеряется разность электродных потенциалов), кулонометрия (измеряется ток ячейки во времени) и амперометрия, в том числе вольтамперометрия (измеряется ток ячейки при активном изменении потенциала ячейки).

Потенциометрия пассивно измеряет потенциал раствора между двумя электродами, в очень незначительной степени влияя на раствор в процессе. Один электрод называется электродом сравнения и имеет постоянный потенциал, тогда как другой является электродом определения или рабочим электродом, потенциал которого изменяется в зависимости от состава образца. Следовательно, разность потенциалов между двумя электродами дает оценку состава образца. Фактически, поскольку потенциометрическое измерение является неразрушающим измерением, при условии, что электрод находится в равновесии с раствором, измеряется потенциал раствора. В потенциометрии обычно используются электроды определения, выполненные селективно чувствительными к представляющему интерес иону, например, к фториду в селективных в отношении фторида электродах, так что потенциал зависит исключительно от активности этого представляющего интерес иона. Время, необходимое электроду для установления равновесия с раствором, будет влиять на чувствительность или точность измерения. В водных средах часто используют платину из-за ее высоких кинетических показателей переноса электронов, хотя можно использовать электрод, сделанный из нескольких металлов, для улучшения кинетических показателей переноса электронов. Самым распространенным потенциометрическим электродом на сегодняшний день является электрод со стеклянной мембраной, используемый в рН-метре. Одним из вариантов потенциометрии является хронопотенциометрия, которая заключается в использовании постоянного тока и измерении потенциала как функции времени.

Потенциометрический сенсор представляет собой тип химического сенсора, который может быть использован для определения аналитической концентрации аналита, содержащегося в образце. Эти сенсоры измеряют электрический потенциал электрода при отсутствии тока. Сигнал измеряется как разность потенциалов (напряжение) между электродом определения/рабочим электродом и электродом сравнения. Потенциал рабочего электрода должен зависеть от концентрации аналита в образце. Электрод сравнения необходим для обеспечения определенного эталонного потенциала.

Среди различных потенциометрических методик определение на основе полевых транзисторов (FET) привлекло значительное внимание из-за его потенциала для миниатюризации, параллельного определения, короткого времени отклика и бесшовной интеграции в процессах изготовления электронных устройств, например, комплементарных металлооксидных полупроводников (CMOS (от англ. - complementary metal-oxide semiconductor)). Полевой транзистор (FET) представляет собой тип транзистора, в котором используется электрическое поле для управления потоком тока.

Концепция ионочувствительного FET (ISFET (от англ. - ion-sensitive field-effect transistor - ионочувствительный полевой транзистор)) была представлена в начале 1970-х годов и основана на полевом транзисторе с металлооксидным полупроводником (MOSFET (от англ. - metal oxide semiconductor field effect transistor)). Ионно-чувствительный полевой транзистор (ISFET) представляет собой полевой транзистор, используемый для измерения концентрации ионов в растворе; при изменении концентрации ионов (например,  $H^+$ , см. шкалу рН) ток через транзистор соответственно изменится. В данном случае раствор используется в качестве электрода затвора. Напряжение между подложкой и оксидными поверхностями возникает из-за ионной оболочки. Он представляет собой особый тип MOSFET (полевого транзистора с металлооксидным полупроводником), имеющий ту же базовую структуру, но с металлическим затвором, замененным ионочувствительной мембраной, раствором электролита и электродом сравнения. ISFET был первым FET биосенсора (BioFET (от англ. - biosensor field-effect transistor - полевой транзистор биосенсора)).

Биосенсор на основе полевого транзистора представляет собой специальный потенциометрический сенсор, также известный как полевой транзистор биосенсора (Bio-FET или BioFET), полевой биосенсор (FEB (от англ. - field-effect biosensor)) или MOSFET биосенсора, является полевым транзистором (на ос-

нове структуры MOSFET), который управляется изменениями поверхностного потенциала, индуцированными связыванием молекул. Когда заряженные молекулы, такие как биомолекулы, связываются с затвором полевого транзистора FET, который обычно представляет собой диэлектрический материал, они могут изменять распределение заряда лежащего в основании полупроводникового материала, что приводит к изменению проводимости канала FET. Bio-FET состоит из двух основных компарментов: один представляет собой элемент биологического распознавания, а другой является полевым транзистором. Структура BioFET в значительной степени основана на ионочувствительном полевым транзисторе (ISFET), типе полевого транзистора с металлооксидным полупроводником (MOSFET), в котором металлический затвор заменен ионочувствительной мембраной, раствором электролита и электродом сравнения.

Bio-FET соединяют транзисторное устройство с биочувствительным слоем, который может специфически обнаруживать биологически релевантные молекулы, такие как субстраты ферментов, нуклеиновые кислоты и белки. Система Bio-FET состоит из полупроводникового полевого транзистора, который действует как преобразователь, отделенный слоем изолятора (например,  $\text{SiO}_2$ ) от биологического элемента распознавания (например, фермента, рецептора или молекулярных зондов), который является селективным по отношению к целевой молекуле, называемой аналитом. Как только аналит связывается с элементом распознавания, распределение заряда на поверхности изменяется с соответствующим изменением электростатического поверхностного потенциала полупроводника. Это изменение поверхностного потенциала полупроводника действует так же, как напряжение затвора в традиционном MOSFET, т.е. изменяет величину тока, который может протекать между электродами истока и стока. Это изменение тока (или проводимости) можно измерить, таким образом, можно обнаружить связывание аналита. Точное соотношение между током и концентрацией аналита зависит от области работы транзистора. Изготовление системы Bio-FET включает несколько стадий, таких как, например, следующие: 1. поиск подложки, подходящей для использования в качестве места для FET, и формирование FET на подложке; 2. экспонирование активного участка FET с подложки; 3. обеспечение слоя чувствительной пленки на активном участке FET; 4. обеспечение рецептора на слое чувствительной пленки для использования при обнаружении ионов; 5. удаление полупроводникового слоя и утончение диэлектрического слоя; 6. травление оставшейся части диэлектрического слоя для экспонирования активного участка FET; 7. удаление фоторезиста и нанесение слоя чувствительной пленки с последующим формированием рисунка фоторезиста на чувствительной пленке; 8. травление незащищенной части слоя чувствительной пленки и удаление фоторезиста. Сенсоры BioFET и лежащие в их основе принципы известны специалисту, например, из публикации Kaisti M, 2017 (*Biosensors and Bioelectronics Volume 98*, 15 December 2017, Pages 437-448).

Электрохимические сенсорные системы (биосенсоры) и, в частности, Bio-FET, могут быть использованы для обнаружения в областях, таких как медицинская диагностика, биологические исследования, защита окружающей среды и анализ пищевых продуктов. Обычные измерения, такие как оптические и спектрометрические измерения, также могут быть использованы для анализа биологических молекул. Тем не менее, эти традиционные способы относительно трудоемки и дороги, включают многостадийные процессы, а также несовместимы с мониторингом в режиме реального времени. Напротив, биосенсоры, такие как Bio-FET, имеют небольшую массу, низкую стоимость массового производства, небольшие размеры и совместимы с коммерческими планарными процессами для крупномасштабных схем. Их можно легко интегрировать в цифровые микрожидкостные устройства для лаборатории на чипе, например, микрожидкостное устройство, которое управляет переносом капель образца, позволяя обнаруживать биомолекулы, обрабатывать сигналы и передавать данные с использованием универсального чипа. Кроме того, их можно использовать в переносных устройствах РОС. В способах в соответствии с настоящим изобретением не требуется никакой стадии маркировки и просто используются определенные молекулярные свойства сенсора, предпочтительно сенсорной поверхности, для обеспечения селективности.

Кулонометрия представляет собой еще одну методику электрохимического определения, которую можно использовать в контексте системы в соответствии с настоящим изобретением. Она использует приложенный ток или потенциал для полного преобразования аналита из одного состояния окисления в другое. В ней прямо или опосредованно измеряется полный прошедший ток для определения количества прошедших электронов. Информация о количестве прошедших электронов может указывать на концентрацию аналита или, если концентрация известна, количество электронов, перенесенных в окислительно-восстановительной реакции. Общие формы кулонометрии включают электролиз в объеме, также известный как потенциостатическая кулонометрия или кулонометрия с контролируемым потенциалом, а также различные кулонометрические титрования.

Амперометрические сенсоры являются дополнительными предпочтительными электрохимическими системами в соответствии с настоящим изобретением. Амперометрия является термином, обозначающим все электрохимические методики, в которых ток измеряется как функция независимой переменной, которой обычно являются время или потенциал электрода. Хроноамперометрия представляет собой методику, при которой ток измеряется при фиксированном потенциале в разные моменты времени с момента начала поляризации. Хроноамперометрию обычно проводят в растворе без перемешивания и на фиксированном электроде, т.е. в экспериментальных условиях, избегая конвекции как переноса массы к

электроду. С другой стороны, вольтамперометрия является подклассом амперометрии, в которой ток измеряется путем изменения потенциала, приложенного к электроду. В зависимости от формы волны, описывающей способ изменения потенциала как функцию от времени, определяются различные методики вольтамперометрии.

В однопотенциальной амперометрии любой аналит, который может окисляться или восстанавливаться, является кандидатом для амперометрического обнаружения. Самой простой формой амперометрического обнаружения является амперометрия с одним потенциалом или постоянным током (DC (от англ. - direct current)). Напряжение (потенциал) прикладывается между двумя электродами, расположенными в эффлюенте колонки. Измеренный ток изменяется по мере того, как электроактивный аналит окисляется на аноде или восстанавливается на катоде. Однопотенциальную амперометрию использовали для обнаружения анионов слабых кислот, таких как цианид и сульфид, которые проблематичны для кондуктометрических способов. Еще одно, возможно, более важное преимущество амперометрии перед другими способами обнаружения заключается в специфичности. Приложенный потенциал можно отрегулировать, чтобы максимизировать отклик для представляющего интерес аналита при минимизации отклика для мешающих аналитов.

Расширением однопотенциальной амперометрии является импульсная амперометрия, наиболее часто используемая для аналитов, которые имеют тенденцию загрязнять электроды. Аналиты, загрязняющие электроды, уменьшают сигнал при каждом анализе и требуют очистки электрода. При импульсном амперометрическом обнаружении (PAD (от англ. - pulsed amperometric detection)) рабочий потенциал прикладывается в течение короткого времени (обычно несколько сотен миллисекунд), за которым следуют более высокие или более низкие потенциалы, используемые для очистки электрода. Ток измеряется только при приложении рабочего потенциала, затем последовательные измерения тока обрабатываются детектором для получения плавного выходного сигнала. PAD чаще всего используют для обнаружения углеводов после анионообменного разделения, но дальнейшее развитие соответствующих методик показывает многообещающие результаты для аминов, восстановленных соединений серы и других электроактивных соединений.

Согласно следующим вариантам осуществления настоящего изобретения электрохимическая сенсорная система представляет собой вольтамперометрическую систему. При вольтамперометрии прикладывается постоянный и/или переменный потенциал на поверхность электрода и измеряется полученный ток с помощью трехэлектродной системы. Этот способ может выявить восстановительный потенциал аналита и его электрохимическую реактивность. Этот способ с практической точки зрения является неразрушающим, поскольку только очень небольшое количество аналита расходуется на двумерной поверхности рабочего/электрода определения и вспомогательного электрода. На практике растворы аналита обычно отбрасывают, поскольку трудно отделить аналит от основного электролита, и для эксперимента требуется небольшое количество аналита. Обычный эксперимент может включать 1-10 мл раствора с концентрацией аналита от 1 до 10 ммоль/л. Химически модифицированные электроды используются для анализа органических и неорганических образцов. Полярография представляет собой подкласс вольтамперометрии, в котором в качестве рабочего электрода используется падающий ртутный электрод.

Электрохимическая сенсорная система в соответствии с настоящим изобретением может потребовать калибровки, чтобы обеспечить концентрацию D-лактата в качестве результата измерения. Например, система может быть откалибрована либо "на полосе", в которой каждый тестовый прогон калибруется по отклику, генерируемому стандартным образцом, находящимся в капиллярной камере для образца, или, например, на заводе перед отправкой. Стандартные образцы, используемые для калибровки, содержат определенную и известную концентрацию аналита, в данном случае D-лактата. Кроме того, согласно вариантам осуществления электрохимическая сенсорная система может представлять собой систему, не требующую калибровки. Такие системы известны в уровне техники, например, системы, использующие "двухчастотный" подход для достижения работы электрохимических биосенсоров без калибровки, которые генерируют выходной сигнал с использованием квадратно-волновой вольтамперометрии для отслеживания вызванных связыванием изменений кинетических показателей переноса электронов.

Установки электродов, необходимые для различных электрохимических сенсорных систем, которые могут использоваться в контексте настоящего изобретения, описаны в уровне техники и известны специалистам. Они также включают предпочтительные электродные материалы и модификацию поверхности, а также возможный способ иммобилизации молекул на поверхности электродов (см., например, *Comprehensive Nanoscience and Nanotechnology (Second Edition), Volume 3, 2019*, в частности, Agnieszka A. Zuber et al., 3.06 - Biosensing, Pages 105-126; *Handbook of Electrochemistry, 2007*, в частности, Grant A. Edwards et al., 8 - Chemically Modified Electrodes, pages 295-327; Kenneth L. Brown, *Electrochemical Preparation and Characterization of Chemically Modified Electrodes*, DOI: 10.5772/intechopen.81752). Выбор соответствующего материала электрода, модификаций электродов и/или возможностей иммобилизации или прикрепления молекул на электроде зависит от соответствующего применения и ожидаемого диапазона концентраций, подлежащих обнаружению.

Согласно вариантам осуществления электрохимическая сенсорная система содержит тест-полоску или чип для электрохимического обнаружения D-лактата. Тест-полоска может содержать или состоять из сенсора на бумажной основе для применения в устройстве для оказания медицинской помощи, таком как переносное устройство считывания. Тест-полоску можно комбинировать с электрохимическим обнаружением с помощью небольших портативных электронных устройств. Кроме того, тест-полоска или чип могут представлять собой или содержать гибкий материал, такой как бумага, пластик или текстиль, в качестве подложки для биосенсорной платформы, которая может использоваться в контексте микрожидкостного устройства, биосенсорного устройства лаборатории на чипе (LOC (от англ. - lab-on-a-chip)) или устройства РОС.

Электрохимические сенсорные системы в соответствии с настоящим изобретением могут быть сконфигурированы для параллельного обнаружения уровней D-лактата в нескольких образцах за счет обеспечения нескольких электрохимических ячеек, что делает возможным мультиплексирование.

#### **Графические материалы**

Далее настоящее изобретение раскрывается с помощью следующих графических материалов. Они не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения и представляют собой предпочтительные варианты осуществления аспектов настоящего изобретения, представленных для более наглядной иллюстрации настоящего изобретения, раскрываемого в настоящем документе.

#### **Описание графических материалов**

Фиг. 1. Распределение лейкоцитов (А), процентное содержание гранулоцитов (В) и D-лактата (С) в синовиальной жидкости (левые панели) с соответствующими кривыми операционных характеристик приемника (ROC) (правые панели). AF (от англ. - aseptic failure) представляет собой асептическое поражение; PJI представляет собой перипротезную инфекцию сустава; AUC (от англ. - area under the curve) представляет собой площадь под кривой.

Фиг. 2. Концентрация D-лактата в синовиальной жидкости, стратифицированная по патогену.

Фиг. 3. Кривая ROC биомаркеров синовиальной жидкости для PJI. AUC D-лактата, количество лейкоцитов и процент гранулоцитов составляют 0,903, 0,910 и 0,861, соответственно.

Фиг. 4. Распределение D-лактата (А), количества лейкоцитов (В) и процента гранулоцитов (С) у пациентов с асептическим поражением и PJI. Двенадцать случаев с основными воспалительными состояниями и повышенным количеством лейкоцитов или процентом гранулоцитов выше порогового значения представлены темно-серыми точками.

Фиг. 5. Эффективность теста D-лактата синовиальной жидкости и количества лейкоцитов при раннем послеоперационном PJI (А) и отсроченном или позднем PJI (В). Различия при раннем PJI были значимыми ( $p=0,027$ ), тогда как при отсроченном/позднем PJI - нет ( $p=0,572$ ).

Фиг. 6. Корреляция между эритроцитами синовиальной жидкости и концентрацией D-лактата у пациентов с асептическим поражением и PJI. Примечание:  $r$  - корреляция Пирсона.

Фиг. 7. Электрохимическое измерение D-лактата с использованием потенциометрии. Разная концентрация D-лактата (монокристаллической соли) в качестве стандартного калибратора и соответствующее напряжение. Показаны средние значения, планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение.

Фиг. 8. Электрохимическое измерение D-лактата с использованием амперометрии. Различные концентрации D-лактата (D-лактата натрия) в качестве стандартного калибратора в фосфатном буфере с pH 6,5 и соответствующим током. Показаны средние значения, планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение.

Фиг. 9. Электрохимическое измерение D-лактата с использованием амперометрии. Различные концентрации D-лактата (D-лактата натрия) в качестве стандартного калибратора в фосфатном буфере с pH 8,5 и соответствующим током. Показаны средние значения, планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение.

#### **Примеры**

Далее настоящее изобретение раскрывается с помощью примеров и сравнительных примеров. Они не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения и представляют собой предпочтительные варианты осуществления аспектов настоящего изобретения, представленных для более наглядной иллюстрации настоящего изобретения, раскрываемого в настоящем документе.

Пример 1. D-лактат синовиальной жидкости в качестве специфического в отношении патогена биомаркера для точного и быстрого обнаружения перипротезной инфекции сустава.

Материалы и способы примера 1.

Схема исследования и популяция. Проспективно включали последовательно поступивших пациентов возрастом более или равного 18 лет, которым в период с июля 2016 года по июнь 2018 года была выполнена диагностическая суставная аспирация протеза бедра, колена и плеча. Аспирирование болезненных суставов проводили как часть стандартной диагностической процедуры в отделении неотложной помощи, амбулатории или перед разрезом суставной капсулы в операционной. Исключали пациентов, у которых аспирированная синовиальная жидкость была разбавлена путем инстилляцией жидкости. Получили одобрение институционального наблюдательного совета и регистрировали в публичном реестре

клинических испытаний [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) (NCT02530229). Пациенты давали письменное информированное согласие на включение в исследование. Результаты по D-лактату не были сообщены лечащим врачам и не влияли на решения о лечении.

Определения. Диагностировали РЛ в соответствии с рабочими критериями Европейского общества инфекций костей и суставов (EBJIS (от англ. - European Bone and Joint Infection Society)), как это было сделано в нескольких исследованиях (5, 7, 15-20). Соответственно, РЛ диагностировали при соблюдении одного или нескольких из следующих критериев: (i) наличие синусового тракта или макроскопического нагноения; (ii) положительная по воспалению гистопатология в перипротезной ткани, определяемая как больше или равно 23 гранулоцитов на 10 полей зрения при большом увеличении (т.е. тип II или III согласно Krenn et al. (21)); (iii) повышенное количество лейкоцитов в синовиальной жидкости, определяемое как больше  $2 \times 10^3$ /мкл, или процент нейтрофилов больше 70% (6); (iv) положительный посев синовиальной жидкости, перипротезной ткани или обработанной ультразвуком жидкости. Посев обработанной ультразвуком жидкости считали положительным, если обнаруживали больше или равно 50 колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл, за исключением *Staphylococcus aureus*, стрептококков и грамотрицательных палочек, для которых любой рост (т.е. больший или равный 1 КОЕ/мл) считали положительным (22). Следует отметить, что количество лейкоцитов в синовиальной жидкости не считали диагностическим критерием в пределах первых 6 недель после хирургического вмешательства при воспалительном заболевании суставов и в случае перипротезного перелома или вывиха. В этих ситуациях количество лейкоцитов могло повышаться даже при отсутствии инфекции (19).

Сбор образцов. Суставные аспирации выполнялись хирургами-ортопедами в соответствии со стандартной асептической техникой в отделении неотложной помощи, амбулаторно-поликлиническом отделении и/или во время операции во время ревизии. Перед суставной аспирацией ни один пациент не получал противомикробное лечение.

Традиционные микробиологические тесты. Каждый образец синовиальной жидкости инокулировали аликвотами по 0,1 мл в триптический соевый агар с 5% овечьей крови, шоколадный агар, тиогликолятный бульон. Кроме того, каждый образец инокулировали в педиатрические бутылки для посева крови VersaTREK, TREK Diagnostic Systems, Кливленд, Огайо, США, в первом центре и с использованием VacTec PedsPlus/F, Beckton Dickinson and Co., Шеннон, графство Клэр, Ирландия, во втором центре. Все культуральные среды инкубировали при 35°C в течение 14 суток. Идентификацию и тестирование чувствительности выделенных микроорганизмов проводили с использованием автоматического бактериологического анализатора WalkAway 96 Plus, Beckman Coulter, Брея, Калифорния, США) в первом центре и с использованием автоматизированной системы VITEK 2 (bioMérieux, Марси-л'Этуаль, Франция) во втором центре.

Определение количества и формулы лейкоцитов в синовиальной жидкости. Для определения количества лейкоцитов и процента гранулоцитов 1 мл синовиальной жидкости переносили во флакон, содержащий этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТК). Свернувшиеся пробы обрабатывали 10 мкл гиалуронидазы (Sigma-Aldrich Chemie, Тауфкирхен, Германия) в течение 10 минут при комнатной температуре. Тест проводили с помощью проточной цитометрии с использованием автоматического гематологического анализатора (XE-2100, Sysmex, Нордсэтт, Германия).

Измерение D-лактата синовиальной жидкости. Объем образца 0,5-1 мл помещали в стерильный пластиковый необработанный флакон для определения концентрации D-лактата спектрофотометрическим способом с использованием коммерческого набора (диагностического набора D-Lactam, Sivital, Витебск, Республика Беларусь). Для каждого пациента анализировали реакционную смесь, содержащую 0,025 мл ранее обработанных образцов, 0,08 мл смеси субстратов и 0,045 мл смеси ферментов, и холодную пробу, содержащую только смесь образца и субстрата. Калибровочную кривую с растворами D-лактата (монокристаллической соли) в воде обрабатывали в каждой партии. Смесь инкубировали при 37°C в течение 30 минут и определяли оптическую плотность при 570 нм с помощью Microplate Absorbance Reader, DYNEX Technologies MRX, Шантильи, Вирджиния, США. Оптическая плотность каждого образца служила мерой концентрации D-лактата.

Статистический анализ. Уровень значимости во всех процедурах проверки гипотез предварительно определяли при  $p$  менее 0,05. Количественные данные представляли в виде медианы (диапазон) или среднего значения и стандартного отклонения (SD (от англ. - standard deviation)), в зависимости от ситуации. Для анализа количественных переменных применяли критерий Манна-Уитни и корреляцию Спирмена. Оптимальное значение отсечки рассчитывали путем максимизации чувствительности и специфичности. J-статистику Юдена использовали для определения оптимального значения отсечки D-лактата на кривой операционной характеристики приемника (ROC). Кривые ROC рассчитывали для определения параметров с наивысшим диагностическим потенциалом; оценивали площади под кривыми ROC. Все статистические анализы выполняли с использованием MedCalc 16.4.3. (MedCalc Software bvba, Остенде, Бельгия). Для графики использовали программу Prism (версия 7.03; GraphPad, Ла-Хойя, Калифорния, США).

Результаты примера 1.

Демографические данные пациента и характеристики инфекции. Из 224 включенных пациентов у

87 диагностировали РJI, а 137 с асептическим поражением протеза относили к контрольным группам. Демографические данные и пораженные суставы из протезированных суставов, разделенные на группу с асептическим поражением и группу с инфекцией, показаны в табл. 1. Бедрa были инфицированы чаще, чем колени.

Микробиология синовиальной жидкости. Из 87 пациентов с РJI у 61 (70%) в посевах синовиальной жидкости рос микроорганизм возбудителя (табл. 2). Из 137 пациентов с асептическим поражением у 9 пациентов с протезами (6,6%) посева синовиальной жидкости были положительными, что считали контаминациями из-за незначительного роста.

Количество и формула лейкоцитов в синовиальной жидкости. Абсолютное количество лейкоцитов в синовиальной жидкости показало чувствительность 87,5% и специфичность 95,7%. Процент гранулоцитов характеризовался чувствительностью 80,4% и специфичностью 99,2% (табл. 3).

D-лактат синовиальной жидкости. Оптимальное значение отсечки для D-лактата составляло 1,2 ммоль/л. Значительно более высокую среднюю (плюс/минус SD) концентрацию D-лактата обнаруживали в синовиальной жидкости пациентов с РJI по сравнению с пациентами с асептическим поражением (2,33 плюс/минус 0,63 ммоль/л по сравнению с 0,77 плюс/минус 0,56 ммоль/л),  $p$  менее 0,001, фиг. 1). Чувствительность в тесте с D-лактатом составляла 97,7%, а специфичность составляла 83,9% (табл. 3).

У пациентов с асептическим поражением концентрация D-лактата повышалась выше значения отсечки у 20 пациентов. В 8 ложноположительных образцах синовиальной жидкости от пациентов с асептическим поражением регистрировали контаминацию патогеном кожной флоры, поскольку количество лейкоцитов было нормальным (варьировало от 127/мкл до 1237/мкл).

У 2 пациентов с РJI концентрация D-лактата была ложноотрицательной. У одного пациента с РJI диагноз был основан на положительном посеве синовиальной жидкости (*Staphylococcus haemolyticus*) в сочетании с повышенным количеством лейкоцитов в синовиальной жидкости, у второго пациента с РJI - на наличии подтвержденной инфекции синусового тракта.

Концентрация D-лактата в синовиальной жидкости в зависимости от патогена. У высоковирулентных бактерий (*S. aureus* и *Streptococcus* spp.) средняя концентрация D-лактата была значительно выше, чем у коагулазонегативных стафилококков, типичных низковирулентных патогенов ( $p$  равно 0,019 и  $p$  равно 0,004, соответственно, см. фиг. 2). Не наблюдали значимых различий в концентрации D-лактата при сравнении концентрации D-лактата при инфекциях с отрицательным посевом и инфекциях, вызванных низковирулентными микроорганизмами (т.е. коагулазонегативными стафилококками) ( $p$  равно 0,531). У одного пациента с РJI, вызванным *Candida parapsilosis*, концентрация D-лактата была выше значения отсечки (2,7 ммоль/л).

Обсуждение примера 1.

Предыдущие сообщения продемонстрировали, что D-лактат в синовиальной жидкости был высокочувствительным и специфическим для диагностики септического артрита (11, 12), но этот биомаркер еще не исследовали при РJI. В исследовании авторов настоящего изобретения D-лактат синовиальной жидкости показал более высокую чувствительность, чем количество лейкоцитов в синовиальной жидкости и процент гранулоцитов, но более низкую специфичность для диагностики РJI. Gratacos et al. сообщали о высокой диагностической эффективности D-лактата в синовиальной жидкости (AUC 0,90), высокой чувствительности (86%), специфичности (96%) и высокой отрицательной прогностической ценности (97%) при использовании значения отсечки 0,05 ммоль/л (11). Kortekangas et al. показали, что средняя концентрация D-лактата была значительно выше в образцах синовиальной жидкости с положительным посевом по сравнению с образцами синовиальной жидкости с отрицательным посевом от пациентов с внесуставной инфекцией ( $p=0,006$ ) (12).

В исследовании авторов настоящего изобретения оптимальное значение отсечки D-лактата синовиальной жидкости для диагностики РJI составляло 1,2 ммоль/л. У высоковирулентных бактерий (таких как *S. aureus* и *Streptococcus* spp.) уровень D-лактата был статистически выше по сравнению с низковирулентными патогенами (такими как коагулазонегативные стафилококки), и никаких различий не наблюдали в последней группе с РJI и при инфекциях с отрицательным посевом. Концентрация D-лактата, вероятно, отражает вирулентность данного вида бактерий и его микробную нагрузку, что объясняет наблюдаемые различия.

Интересно отметить, что у одного пациента с РJI, вызванным *Candida parapsilosis*, наблюдали явно повышенную концентрацию D-лактата (2,7 ммоль/л). Это необычное наблюдение можно объяснить сочетанной инфекцией с неидентифицированной дополнительной бактерией. В качестве альтернативы, локальное ограничение кислорода может привести к спиртовому брожению дрожжей, в ходе которого вырабатываются глицерин, пируват и D-лактат в качестве основных продуктов брожения (23). Рост грибковых патогенов в средах с высоким содержанием глюкозы может привести к увеличению продуцирования D-лактата и общей более низкой эффективности использования глюкозы, как сообщалось для *Saccharomyces cerevisiae* (24).

Кроме того, важно распознавать необычные нарушения, которые вызывают D-лактат-ацидоз и повышают уровень D-лактата в крови и жидкостях организма, а именно при синдроме короткого кишечника и, в частности, при высокоуглеводной диете у детей. Сопутствующий тяжелый неконтролируемый

сахарный диабет с дефицитом инсулина также может вызывать повышение уровня D-лактата в плазме и моче (25). Дальнейшие исследования должны изучить основные условия, потенциально влияющие на концентрацию D-лактата, которые могут прояснить ограниченную специфичность теста.

D-лактат синовиальной жидкости показал хорошую диагностическую эффективность для диагностики РЛ, которая была сопоставима с эффективностью подсчета или формулой лейкоцитов в синовиальной жидкости. Преимущества теста на D-лактат заключаются в низком необходимом объеме синовиальной жидкости (50 мкл), коротком времени выполнения (45 минут) и невысокой стоимости. В частности, высокая чувствительность и быстрая доступность результатов делают тест особенно применимым в качестве инструмента скрининга РЛ. Для повышения специфичности подтверждающий диагностический тест синовиальной жидкости может быть включен в диагностический алгоритм РЛ.

Пример 2. Эффективность D-лактата синовиальной жидкости для диагностики перипротезной инфекции сустава: проспективное обсервационное исследование.

Материал, пациенты и способы примера 2.

Схема исследования и популяция. Проспективное диагностическое исследование когорт включало последовательно поступивших пациентов возрастом 18 лет или старше, которых оценивали на предмет болезненного протезного сустава бедра, колена и плеча и которых подвергали диагностической суставной аспирации перед ревизионной артропластикой для оценивания инфекции в период с мая 2016 года по март 2017 года. Брели только один (первый собранный) образец синовиальной жидкости на пациента.

Исключали пациентов с разбавленной синовиальной жидкостью после суставной инстилляции, недостаточным объемом синовиальной жидкости (менее 3 мл), или у которых анализ синовиальной жидкости был выполнен более чем через 48 часов после аспирации. Для сбора анамнеза пациента, демографических, клинических, радиологических, микробиологических, гистопатологических и лабораторных данных использовали стандартизованную индивидуальную регистрационную карту. Каждого пациента обследовала междисциплинарная команда, состоящая из хирургов-ортопедов, инфекционистов и терапевтов. Результаты теста D-лактата синовиальной жидкости не передавали лечащим хирургам-ортопедам. Исследование выполняли в соответствии с Хельсинкской декларацией.

Диагностика инфекции перипротезного сустава. РЛ определяли в соответствии с рабочими критериями Европейского общества инфекций костей и суставов (EJIS) (44), кратко изложенными в табл. 4. Острую инфекцию диагностировали, если инфекция происходила в течение 4 недель после хирургического вмешательства, или если пациент сообщал о возникновении новых симптомов, продолжающихся не более 4 недель. Инфекции, которые возникли более чем через 4 недели после последнего хирургического вмешательства и были симптоматическими более 4 недель, определяли как хронические инфекции. Кроме того, на основании интервала между последним ревизионным хирургическим вмешательством или первичной имплантацией и временем аспирации все инфекции классифицировали на ранние (т.е. менее 3 месяцев) и отсроченные или поздние (т.е. более 3 мес.) инфекции (45).

Получение и исследование синовиальной жидкости, перипротезной ткани и имплантатов. Синовиальную жидкость аспирировали в стерильных условиях перед хирургическим вмешательством в амбулаторном отделении или во время ревизионного хирургического вмешательства перед вскрытием суставной капсулы. Один мл синовиальной жидкости инокулировали в педиатрическую бутылку для посева крови (VacTec PedsPlus/F, Beckton Dickinson and Co), один мл вводили в необработанный флакон для аэробных и анаэробных культур (0,1 мл каждый), а оставшуюся жидкость инокулировали в тиогликолят-ный бульон для накопления. Педиатрическую бутылку с посевом крови инкубировали при 36 плюс/минус 1°C в течение 14 суток или до обнаружения роста. Аэробные культуры инкубировали при 37°C и проверяли ежедневно в течение 7 суток, а анаэробные культуры инкубировали в течение 14 суток. Идентифицировали морфологию колоний микроорганизмов с помощью стандартных микробиологических способов с использованием автоматизированной системы VITEK 2 (bioMerieux, Марси-л'Этуаль, Франция). Для обнаружения кристаллов урата и пирофосфата аликвоту объемом 1 мл отправляли патологу для исследования синовиальной жидкости с помощью поляризационной микроскопии.

Кроме того, 3-5 образцов перипротезной ткани собирали во время хирургического вмешательства на границе имплантат и кости или цемента и кости для микробиологического и гистопатологического анализа, если выполняли ревизионное хирургическое вмешательство. Посев перипротезной ткани считали положительным, если высоковирулентный организм рос в более или равной 1 пробе синовиальной жидкости, перипротезной ткани или обработанной ультразвуком (*Staphylococcus aureus*, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus spp.*, *Candida spp.*), или если средне- или низковирулентный организм рос в более или равной 2 пробах (коагулазонегативные стафилококки, энтерококки, виды *Cutibacterium* [ранее известные как *Propionibacterium*] и другие бактерии микробиома кожи).

Извлеченные протезные компоненты отправляли на обработку ультразвуком, как описано ранее (46). Обработку ультразвуком считали положительной, если в обработанной ультразвуком жидкости росло более или равное 1 КОЕ/мл высоковирулентного организма или более 50 КОЕ/мл низковирулентного организма (47).

Определение количества лейкоцитов в синовиальной жидкости и процент гранулоцитов. Один мл синовиальной жидкости переносили во флакон, содержащий этилендиаминтетрауксусную кислоту

(ЭДТК). Количество лейкоцитов определяли с помощью проточной цитометрии с использованием автоматического гематологического анализатора (XE-2100, Sysmex, Нордерштедт, Германия). Свернувшиеся пробы обрабатывали 10 мкл гиалуронидазы (Sigma-Aldrich Chemie, Тауфкирхен, Германия) в течение 10 минут при комнатной температуре.

Определение D-лактата синовиальной жидкости. D-лактат определяли спектрофотометрически по оптической плотности приготовленного образца. Одну аликвоту объемом 1 мл переносили в необработанный флакон для определения D-лактата с использованием коммерческого набора (D-lactam Kit; VL-Diagnostics, Лейпциг, Германия). Аликвоты для определения D-лактата хранили при 4°C плюс/минус 1°C и анализировали в течение 48 часов после аспирации. Тесты проводили в соответствии с инструкциями производителя. Определение основано на спектрофотометрическом способе со стандартным устройством считывания в микропланшетах поглощения при 570 нм, требующим 50 мкл синовиальной жидкости. В анализе D-лактатдегидрогеназа (D-LDH) катализирует окисление D-молочной кислоты до пирувата, наряду с сопутствующим восстановлением никотинамидадениндинуклеотида (НАД<sup>+</sup>) до НАДН. НАДН реагирует с флуоресцентным субстратом с получением окрашивания смеси (48).

Набор D-lactam для анализа содержит стандарт D-лактата лития для построения калибровочной кривой, которую обрабатывали для каждой партии. Реакционная смесь содержала 0,025 мл образца синовиальной жидкости, 0,08 мл смеси субстратов и 0,045 мл ферментативной смеси. Смесь для контроля мутности содержала 0,025 мл образца синовиальной жидкости, 0,08 мл смеси субстратов и 0,045 мл очищенной воды. Реагенты вносили в 96-луночный планшет с плоским дном, инкубировали при 37°C в течение 30 минут, а затем считывали при 570 нм с помощью Microplate Absorbance Reader (DYNEX Technologies MRX, Шантильи, Вирджиния, США).

Статистический анализ. J-статистику Юдена использовали для определения значения отсечки D-лактата на кривой ROC. Площадь под кривой ROC (AUC) использовали для оценки диагностической эффективности теста D-лактата, количества лейкоцитов и процента гранулоцитов. Для оценки статистической значимости средней концентрации D-лактата между группами применяли двусторонний t-критерий Стьюдента для независимой выборки. Расчет размера выборки был основан на предположении, что чувствительность D-лактата составляет 90% по сравнению с 80% для радиационных диагностических тестов, включая подсчет лейкоцитов, гистопатологию перипротезных тканей и культуру, т.е. различие в 10% (мощность 80%). Тест Делонга для двух коррелированных кривых ROC использовали для определения того, является ли различие между AUC статистически значимым. Для всех выполненных статистических тестов выбирали уровень значимости  $\alpha$  0,05. Доверительный интервал (CI (от англ. - confidence interval) 95% для AUC оценивали с помощью способа Делонга, и CI 95% для других показателей эффективности оценивали с использованием бутстраповской повторной выборки с 10000 повторов (табл. 6). Тест на две независимые медианы,  $\chi^2$ -критерий и точный критерий Фишера использовали для оценки р-значений в табл. 5. Для оценки р-значений между чувствительностями и на фиг. 3 выполняли бутстраповскую повторную выборку с 10000 повторов. Корреляцию между концентрацией эритроцитов и D-лактата оценивали с помощью коэффициента Пирсона ( $\rho$ ). Для всех статистических анализов использовали IBM SPSS 22.0 (Statistical package for the Social Sciences Corporation, Чикаго, Иллинойс, США). ROC и другие графики создавали с помощью вычислительной среды R (49).

Результаты примера 2.

Демографические данные пациента. В табл. 5 кратко описаны характеристики 148 пациентов, в том числе 103 (70%) с протезным суставом колена, 43 (29%) с протезным суставом бедра и 2 (1%) с протезным суставом плеча. У сорока четырех пациентов (30%) диагностировали РЛ, а у 104 (70%) - асептическое поражение протезного сустава. Большинство пациентов ( $n=102$ , 69%) подвергались ревизионному хирургическому вмешательству, 62 из них с асептическими поражениями и 40 с РЛ.

Эффективность традиционных тестов и микробиологического исследования. Результаты диагностических тестов показаны в табл. 6. Количество лейкоцитов в синовиальной жидкости показало чувствительность 80%. Однако у 12 пациентов абсолютное или относительное количество лейкоцитов было повышено из-за асептических состояний, в том числе ревматологического заболевания суставов ( $n$  равно 3), рецидивирующего вывиха ( $n$ =равно 2), раннего послеоперационного состояния ( $n$  равно 2), травмы ( $n$  равно 2)), кристаллической артропатии ( $n$  равно 1), перипротезного перелома ( $n$  равно 1) и металлоза с кристаллами ( $n$  равно 1). Отмечали 21 случай (48%) РЛ с отрицательным посевом. Значительный рост микробов регистрировали у 23 пациентов с РЛ (52%), тогда как формальную контаминацию (т.е. незначительный рост) обнаруживали в 8 случаях РЛ и в 19 случаях асептического поражения. В табл. 7 представлены возбудители РЛ. Всего 23 РЛ с положительным посевом были вызваны низковирулентными патогенами в 10 эпизодах (43%) и высоковирулентными патогенами в 13 эпизодах (57%).

Эффективность D-лактата синовиальной жидкости. Рассчитывали оптимальное значение отсечки для D-лактата 1,263 ммоль/л. Чувствительность и специфичность теста D-лактата составляли 86,4% и 81,7%, соответственно (табл. 6). В 19 случаях асептического поражения концентрация D-лактата была выше значения отсечки, включая 12 случаев асептического поражения с количеством и формулой лейкоцитов ниже порогового значения и 7 случаев с неинтерпретируемым количеством клеток из-за основного

воспалительного состояния. В 2 случаях ложноположительных образцов D-лактата регистрировали контаминацию патогеном кожной флоры. D-лактат показывал отрицательный результат у 6 пациентов с диагнозом РЛ в соответствии с применяемыми критериями определения. При этом в 2 случаях диагноз РЛ был основан только на одном имеющемся критерии (повышенное количество лейкоцитов в синовиальной жидкости или положительная гистопатология); в остальных 4 случаях диагноз РЛ был основан на нескольких выполненных критериях, включая один случай с синусовым трактом. Средняя концентрация D-лактата была значительно ниже при асептических поражениях, чем в случаях РЛ ( $p < 0,001$ ). Для коммерческого набора для тестирования D-лактата требовалось 50 мкл синовиальной жидкости. Время обработки в обоих тестах составляло 30-45 минут.

Сравнение D-лактата синовиальной жидкости и количества лейкоцитов. Не наблюдали значительных различий при любых попарных сравнениях AUC между исследованными биомаркерами синовиальной жидкости (AUC<sub>D-лактат</sub> против AUC<sub>WBC</sub> (от англ. - White Blood Cell - лейкоцит)  $p=0,8$ ; фиг. 3). Распределение D-лактата и количества лейкоцитов при РЛ и асептических поражениях показано на фиг. 4. В 12 случаях асептического поражения с недиагностическим повышением количества лейкоцитов из-за основных воспалительных состояний, в 7 случаях наблюдали положительный результат в отношении D-лактата, и в 5 случаях - отрицательный результат в отношении D-лактата. Из этих 12 пациентов 11 подвергались ревизионному хирургическому вмешательству, и в конечном итоге в 6 из 12 случаев выполняли полное диагностическое оценивание, подтверждающее асептическую патологию.

При остром РЛ чувствительность D-лактата и количества лейкоцитов составляла 100%, тогда как при хроническом РЛ чувствительность снижалась до 81% и 72%, соответственно ( $p=0,268$ ). Эффективность D-лактата и количества лейкоцитов при ранних и отсроченных/поздних инфекциях показаны на фиг. 5. В то время как D-лактат показал более высокую чувствительность по сравнению с количеством лейкоцитов, количество лейкоцитов было более специфичным для обеих групп. У пациентов, поступивших в ранний срок после хирургического вмешательства, тесты показывали аналогичную чувствительность (67% по сравнению с 58%;  $p$  равно 0,572), тогда как в отсроченных/поздних ситуациях D-лактат был более чувствительным (94% по сравнению с 84%;  $p$  равно 0,027).

Концентрация D-лактата синовиальной жидкости и микробиологическое исследование. При РЛ с отрицательным посевом средняя концентрация D-лактата была значительно ниже, чем при РЛ с положительным посевом (0,915 ммоль/л по сравнению с 2,421 ммоль/л;  $p$  равно 0,004). Средняя концентрация D-лактата при РЛ с отрицательным посевом была значительно выше, чем в случаях с асептической контаминацией (0,915 ммоль/л по сравнению с 1,40 ммоль/л;  $p$  менее 0,001). Не наблюдали значимого различия в концентрации D-лактата при сравнении РЛ, вызванного низковирулентными и высоковирулентными микроорганизмами (2,047 ммоль/л по сравнению с 2,586 ммоль/л;  $p$  равно 0,074) или ранними и отсроченными, или поздними инфекциями (1,459 ммоль/л по сравнению с 1,217 ммоль/л);  $p$  равно 0,196).

Корреляция между эритроцитами в синовиальной жидкости и концентрацией D-лактата. Наблюдали положительную корреляцию между эритроцитами и D-лактатом в целом ( $p$  равно 0,185,  $p$  равно 0,02), а также в подгруппе с асептическими поражениями ( $p$  равно 0,339,  $p$  менее 0,01). В подгруппе с РЛ обнаруживали отрицательную корреляцию, однако она не достигла значимости ( $p$  равно -0,199,  $p$  равно 0,195) (фиг. 6). Различия между подгруппами с асептическим поражением и РЛ было значимым ( $p$  менее 0,01).

#### Обсуждение примера 2.

В последние годы исследовали несколько биомаркеров в качестве диагностического теста для РЛ (34, 35, 50). Однако ни один из них не оценивали исключительно на предмет их способности обнаруживать инфекции низкой степени и ранние послеоперационные инфекции, которые сложно отличить от асептических состояний. Эффективность диагностических тестов сильно зависит от применяемых критериев определения инфекции. В большинстве исследований использовали критерии определения MSIS (от англ. - Musculoskeletal Infection Society - Общество костно-мышечных инфекционных заболеваний) (51), которые пропускали несколько случаев инфекции низкой степени из-за высокого порога подтверждения инфекции (44). В этом исследовании авторы настоящего изобретения использовали критерии с более низким порогом для диагностики РЛ с обнаружением также РЛ низкой степени (44, 52). В отличие от критериев MSIS С-реактивный белок СРБ и скорость оседания эритроцитов СОЭ не считали диагностическими критериями РЛ, поскольку они малоэффективны при инфекциях низкой степени и не специфичны для РЛ (33). Кроме того, эстеразу лейкоцитов не включали, поскольку она дает надежные результаты только в образцах, не контаминированных кровью (50).

Известно, что отсроченные инфекции вызывают лишь слабовыраженные клинические признаки и симптомы, скорее всего, из-за низкой микробной нагрузки. При том, что метаболизм бактерий снижается по мере созревания биопленки, продуцируется все еще определяемое количество D-лактата. Наблюдали статистически значимое различие в концентрации D-лактата при РЛ с отрицательным посевом и в случаях асептического поражения, что подтверждает септическую этиологию в образцах с отрицательным посевом. Кроме того, концентрация D-лактата, по-видимому, зависит от количества бактерий, поскольку концентрация D-лактата была выше при РЛ с положительным посевом, чем с отрицательным посевом.

В исследовании авторов настоящего изобретения у 6 пациентов с хроническим РЛ наблюдали ложноположительный тест на D-лактат синовиальной жидкости, у двух из которых был положительный ре-

зультат (1 полимикробная инфекция с синусовым трактом и коагулазонегативные стафилококки в синовиальной жидкости). У четырех из них количество лейкоцитов в синовиальной жидкости также было нормальным, а у 3 из них инфекция была подтверждена только положительным результатом гистопатологического исследования перипротезной ткани. Остается неясным, являются ли эти случаи действительно РJI, или они представляют собой гипердиагностированные случаи РJI. В одном случае присутствовал синусовый тракт, который, как было описано ранее, изменял диагностические маркеры в синовиальной жидкости из-за постоянного дренирования воспаления. В то время как продуцирование D-лактата описывали для нескольких видов бактерий, включая *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* и *Bacteroides fragilis*, а также для *Lactobacillales* и микробиоты кишечника (40, 42, 53), данные о продуцировании D-лактата другими бактериями в жидкостях организма ограничены. Влияние вирулентности бактерий на концентрацию D-лактата невозможно оценить по данным в соответствии с настоящим изобретением и данным литературы (41).

Концентрация D-лактата была выше значения отсечки у 19 пациентов с асептическим поражением. На основании положительной корреляции между эритроцитами и D-лактатом в группе с асептическим поражением, авторы настоящего изобретения предположили, что гемоглобин может вызывать ложноположительный результат теста на D-лактат из-за подобных длин волн поглощения, т.е. 540 нм для гемоглобина и 570 нм для D-лактата (54). У пациентов с РJI слегка отрицательная корреляция может быть объяснена значительным источником D-лактата из метаболизма бактерий, при этом другие факторы не могут влиять на концентрацию. Авторы настоящего изобретения не оценивали, может ли центрифугирование образца синовиальной жидкости потенциально улучшить специфичность теста на D-лактат.

В заключение, D-лактат синовиальной жидкости является точным диагностическим тестом для диагностики РJI, сравнимым с количеством лейкоцитов в синовиальной жидкости. Для него требуется всего 50 мкл синовиальной жидкости, он характеризуется коротким временем обработки и является недорогим. Модификации теста могут потенциально улучшить его специфичность или могут быть объединены с подтверждающим тестом с более высокой специфичностью.

Пример 3. Измерение D-лактат с использованием потенциометрического электрохимического сенсора.

Материал и способы примера 3.

Изготовление биосенсора. Использовали потенциометрическую электрохимическую сенсорную систему. Систему конструировали с тремя электродами: рабочий/электрод определения (золотой электрод, приобретенный у GeneFluidic (Калифорния, США) с сенсором 0 2,5 мм), платиновая проволока в качестве противозэлектрода и Ag/AgCl электрод (BASi) в качестве электрода сравнения.

Подготовку чувствительных слоев рабочих электродов выполняли, как раскрывалось ранее (A polyaniline based ultrasensitive potentiometric immunosensor for cardiac troponin complex detection. Qi Zhang a, n, Alok Prabhu a, Avdar San a, Jafar F. Al-Sharab b, Kalle Levon, Biosensors and Bioelectronics 72 (2015) 100-106). Рабочие электроды покрывали 20 мкл 1,5 мас.% PANI (от англ. - polyaniline -полианилин)/DNNSA (от англ. - dinonylnaphthalene sulfonic acid динонилнафталинсульфоновая кислота), растворенных в хлороформе, и сушили в печи при 60°C в течение 2 часов. Покрывать PANI/DNNSA электроды погружали в буфер СР с 2,5 мас.% глутаральдегида (GA (от англ. - glutaraldehyde)) в качестве реагента сшивания (Sigma-Aldrich, Миссури, США) при комнатной температуре на 1,5 часа с последующей тщательной промывкой деионизированной водой.

Иммобилизация фермента. Использовали коммерчески доступный набор для определения D-молочной кислоты. Реагент 1 (16 мл) содержит D-лактатдегидрогеназу более или равно 60 кЕ/л плюс буфер, рН 9,0, а реагент 2 (4,5 мл) содержит НАД<sup>+</sup> более или равно 20 ммоль/л. 50 мкл смеси реагентов помещали на рабочий электрод, предварительно обработанный, как раскрывалось ранее, в течение ночи при 4°C для иммобилизации фермента.

Приготовление калибровочных образцов D-лактата. Лиофилизированный D-лактат лития (Sigma-Aldrich, Миссури, США) разбавляли деионизированной водой до различных концентраций (0, 25, 50, 75 и 100%).

Электрохимические измерения. Помещали 100 мкл образцов, содержащих различные концентрации D-лактата, на поверхность рабочего электрода и измеряли напряжение, соответствующее определенной концентрации D-лактата в калиброванном образце, при комнатной температуре. Потенциометрию разомкнутой цепи (ОСР (от англ. - open circuit potentiometry)) выполняли с использованием электрохимической рабочей станции СН1 660d (СН Instruments).

Результаты примера 3.

Измеренные концентрации и соответствующие напряжения в двух независимых экспериментах показаны на фиг. 7 и в табл. 8. При использовании D-лактата с концентрацией ниже 1,2 мМ напряжение было ниже 85 мВ (интерпретировали как отрицательный результат), тогда как концентрации выше этого значения отсечки, что было определено спектрофотометрическими измерениями, стабильно показывали измерения напряжения выше 85 мВ.

Обсуждение примера 3.

Эффект зависимости от ответа от дозы способа на основе потенциометрического электрохимического

сенсора демонстрирует доказательство концепции независимого от спектрофотометрии измерения, которое не зависит от других компонентов биологических образцов (например, синовиальной жидкости), таких как эритроциты, которые могут давать ложноположительные результаты спектрофотометрических способов из-за того, что длина волны поглощения подобна длине волны гемоглобина. Следовательно, специфичность способа на основе потенциометрического электрохимического сенсора в соответствии с настоящим изобретением будет выше, чем специфичность других доступных на данный момент способов. Этот признак нового теста важен, поскольку ложноположительные результаты могут привести к избыточному противомикробному и хирургическому лечению с негативными последствиями для пациента.

Пример 4. Измерение D-лактата с использованием амперометрического электрохимического сенсора.

Материал и способы примера 4.

Авторы настоящего изобретения выполняли исследование с использованием амперометрического электрохимического сенсора, который содержит тест-полоску (чип) с рабочим электродом, противозлектродом и электродами сравнения на поверхности для электрохимического обнаружения и электрохимический потенциостат для измерения электрического сигнала. Тест-полоску можно комбинировать с небольшими портативными электронными устройствами для электрохимического обнаружения.

Приготовление калибровочных образцов D-лактата. Коммерчески доступный лиофилизированный D-лактат натрия (Sigma-Aldrich, Миссури, США) восстанавливали из лиофилизата путем добавления необходимого количества деионизированной воды для достижения конечной концентрации 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1,0, 3,0, 10,0 и 30,0 мМ.

Приготовление ферментной смеси. Коммерчески доступную лиофилизированную D-лактатдегидрогеназу из *Staphylococcus epidermidis* (Sigma-Aldrich, Миссури, США) разбавляли фосфатным буфером до достижения конечной концентрации 100 Е/мл. Коммерчески доступную лиофилизированную не содержащую НАД кислоту (Sigma-Aldrich, Миссури, США) разбавляли до конечной концентрации 20 ммоль/л. Реагенты растворяли в фосфатном буфере с двумя различными концентрациями pH (pH 6,5 и pH 8,5).

Электрохимические измерения. Выполняли два эксперимента с использованием фосфатного буфера с различным pH (pH 6,5 и pH 8,5). На поверхность чипа помещали 100 мкл смеси, содержащей фосфатный буфер (pH 6,5 или pH 8,5), 10 единиц D-LDH, 20 ммоль/л НАД и различные концентрации D-лактата. Измерение силы тока, соответствующего определенной концентрации D-лактата в калиброванном образце, проводили при комнатной температуре с использованием хроноамперометрии со стандартным потенциостатом (CompactStat.h-Standard, Ivium Technologies, Эйндховен, Нидерланды).

Результаты примера 4.

Измеренные концентрации D-лактата в фосфатном буфере с pH 6,5 и соответствующий ток показаны на фиг. 8 и в табл. 9. Измеренные концентрации D-лактата в фосфатном буфере с pH 8,5 и соответствующий ток показаны на рисунке 9 и в табл. 10. При использовании D-лактата с концентрацией ниже 1,2 мМ ток был ниже 422 нА (интерпретировали как отрицательный результат), тогда как концентрации выше этого значения отсечки, которое определяли спектрофотометрическими измерениями, всякий раз демонстрировали измерения тока выше 422 нА.

Обсуждение примера 4.

Амперометрический электрохимический сенсор показывал эффект зависимости ответа от дозы при измерении различных концентраций D-лактата независимо от pH используемого буфера, что демонстрирует доказательство концепции независимого от спектрофотометрии измерения D-лактата. Более того, с использованием фосфатного буфера с pH 8,5 авторы настоящего изобретения смогли определить концентрацию D-лактата с более высоким током, что обеспечивает лучшую чувствительность биосенсора для определения концентрации D-лактата в неизвестных образцах.

Пример 5. Измерение D-лактата в образцах синовиальной жидкости с использованием электрохимического сенсора.

Материал и способы примера 5.

Авторы настоящего изобретения выполняли исследование с использованием амперометрического электрохимического сенсора (биосенсора), включающего тест-полоску (чип) с рабочим электродом, противозлектродом и электродами сравнения на поверхности для электрохимического обнаружения и электрохимический потенциостат для измерения электрического сигнала.

Образцы синовиальной жидкости. В данном исследовании авторы настоящего изобретения использовали образцы синовиальной жидкости из примера 2. В когорте в соответствии с настоящим изобретением 10 пациентов имели инфекцию протезного сустава (PJI). У 30 пациентов диагностировали асептическое поражение (AF) протезного сустава, у 20 из которых тестировали ложноположительный результат в предыдущем исследовании с использованием спектрофотометрических способов.

Приготовление ферментной смеси. Коммерчески доступную лиофилизированную D-лактатдегидрогеназу из *Staphylococcus epidermidis* (Sigma-Aldrich, Миссури, США) разбавляли фосфатным буфером (pH 8,5) до достижения конечной концентрации 100 Е/мл. Коммерчески доступную лио-

филизированную не содержащую НАД кислоту (Sigma-Aldrich, Миссури, США) разбавляли фосфатным буфером (рН 8,5) до конечной концентрации 20 ммоль/л.

Электрохимические измерения. На поверхность чипа помещали 90 мкл смеси, содержащей фосфатный буфер (рН 8,5), 10 единиц D-LDH, 20 ммоль/л НАД и 10 мкл образцов синовиальной жидкости. Измерение тока проводили при комнатной температуре с использованием хроноамперометрии со стандартным потенциостатом (CompactStat.h-Standard, Ivium Technologies, Эйнховен, Нидерланды).

Результаты примера 5.

Используя электрохимическое измерение D-лактата, как раскрывается в настоящем документе, можно было идентифицировать всех пациентов с АФ и отличить их от пациентов с РJI. Для всех пациентов с АФ наблюдали более низкие измерения тока, чем для пациентов с РJI. Следовательно, можно применять подходящее значение отсечки (тока), что обеспечивает идентификацию РJI с очень высокой специфичностью и чувствительностью.

Обсуждение примера 5.

Амперометрический электрохимический сенсор демонстрирует превосходную чувствительность и специфичность в диагностике РJI, что обеспечивает доказательство концепции независимого от спектрофотометрии измерения. Этот способ не зависит от компонентов биологических образцов (например, синовиальной жидкости), таких как эритроциты, которые могут давать ложноположительные результаты при спектрофотометрических способах из-за длин волн поглощения, подобных таковым у гемоглобина. Следовательно, специфичность электрохимического способа в соответствии с настоящим изобретением будет выше, чем у других доступных на данный момент способов. Этот признак нового теста важен, поскольку ложноположительные результаты могут привести к избыточному противомикробному и хирургическому лечению с негативными последствиями для пациента.

Согласно запланированным вариантам осуществления обнаружение электрического сигнала будет осуществляться с использованием питающегося от батареи переносного компактного устройства считывания, подобного глюкометру (Freestyle Precision Pro, Abbott, Норт-Чикаго, Иллинойс, США), который используется для получения количественной информации об анализе.

Таблицы.

Таблицы примера 1.

Таблица 1

Демографические данные и характеристики 224 пациентов с перипротезными суставами, стратифицированных по асептической и инфекционной патологии

Характеристики	РJI	АФ	p-значение
Протезы суставов (n = 224), (%)	137 (61)	87 (39)	
Возраст, медиана (диапазон), годы	67 (33-94)	64 (30-89)	0,578
Пол, число мужчин (%)	51 (37)	49 (63)	0,356
Тип пораженного сустава, число (%)			
Колено	83 (61)	41 (47)	0,054
Бедро	54 (39)	47 (54)	
Время от первичной имплантации протеза до аспирации, медиана (диапазон), месяцы	67 (6-240)	34 (0,2-180)	0,001

РJI - перипротезная инфекция сустава, АФ - асептическое поражение.

Таблица 2

Микробиологическое исследование инфекции протезных суставов

Патоген	Инфекция протезного сустава (n = 87) <sup>2</sup>
<i>S. aureus</i>	16 (18)
Коагулазонегативные стафилококки	27 (31)
<i>Streptococcus spp.</i>	6 (6)
<i>Enterococcus spp.</i>	4 (5)
Анаэробы	4 (5)
Грамотрицательные бактерии	3 (3)
Другие <sup>1</sup>	2 (2)
Отрицательный посев	26 (30)

<sup>1</sup> *Candida parapsilosis* (n=1), *Corynebacterium spp.* (n=1).

<sup>2</sup> Один пациент с РJI имел смешанную инфекцию *S. aureus* и *S. pyogenes*.

Таблица 3

Аналитическая эффективность тестов синовиальной жидкости								
Тесты	Отсечка	PJI	AF	AUC	Чувствительность, %	Специфичность, %	PPV, %	NPV, %
				(95% CI)				
D-лактат, ммоль/л	> 1,2	76/78	20/137	(95% CI)	97,7 (91,9-99,7)	83,9 (76,7-89,7)	79,4 (70,5-86,6)	98,3 (93,9-99,3)
Лейкоциты, × 10 <sup>3</sup> /мкл	> 2	70/78	5/137	0,96 (0,93-0,98)	87,5 (78,7-93,6)	95,7 (91,0-98,4)	92,8 (84,9-97,3)	92,5 (86,9-96,2)
Процент гранулоцитов, %	> 70	63/78	2/137	0,96 (0,93-0,98)	80,4 (70,6-88,2)	99,2 (96,1-99,9)	98,6 (92,4-99,8)	89,2 (83,2-93,6)
Положительный посев	-	61/78	9/137	-	78,2 (67,4-86,8)	93,4 (87,9-97,0)	87,1 (78,1-92,8)	88,3 (83,2-92,0)

PJI - перипротезная инфекция сустава, AF - асептическое поражение, AUC - площадь под кривой, PPV (от англ. - positive predictive value) - прогностическая ценность положительного результата, NPV (от англ. - negative predictive value) - прогностическая ценность отрицательного результата, CI - доверительный интервал.

Таблицы примера 2.

Таблица 4

В соответствии с рабочими критериями Европейского общества инфекций костей и суставов (EBJIS) перипротезную инфекцию сустава определяют при выполнении критерия более или равного 1

Тест	Критерии
Клинические признаки	Синусовый тракт (фистула) или видимые гнойные выделения вокруг протеза
Гистология	Острое воспаление в перипротезной ткани <sup>1</sup>
Количество клеток в суставном аспирате <sup>2</sup>	более 2000/мкг лейкоцитов <u>или</u> более 70% гранулоцитов
Микробиологическое исследование	Рост микробов в <ul style="list-style-type: none"> <li>• синовиальной жидкости, <u>или</u></li> <li>• более или равен 2 образцам ткани<sup>3</sup>, <u>или</u></li> <li>• обработанной ультразвуком жидкости (более или равен 50 КОЕ/мл)<sup>4</sup></li> </ul>

<sup>1</sup> Острое воспаление определяют как более или равное 23 гранулоцитам на поле при большом увеличении, что соответствует типу II или III по Кренну и Моравицу (56).

<sup>2</sup> Значения отсечки лейкоцитов не считают диагностическими в пределах 6 недель после хирургического вмешательства, при активном ревматическом заболевании суставов, перипротезном переломе, травме сустава или вывихе.

<sup>3</sup> Посев перипротезной ткани считали положительным, если высоковирулентный организм вырос в более или равном 1 образце (*Staphylococcus aureus*, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* spp., *Candida* spp.), или низковирулентный организм вырос в более или равном 2 образцах (коагулазонегативные стафилококки, энтерококки, *Cutibacterium* [ранее известная как *Propionibacterium*] spp. и другие бактерии микробиома кожи).

<sup>4</sup> Обработку ультразвуком считали положительной, если в обработанной ультразвуком жидкости выросло более или равное 1 КОЕ/мл высоковирулентного организма или более 50 КОЕ/мл низковирулентного организма (47).

Таблица 5

Характеристики пациентов				
	Все пациенты (n = 148)	Пациенты с PJI (n = 44)	Пациенты с асептическим поражением (n = 104)	p-значение
Медиана (диапазон) возраста пациентов (годы)	69,5 (29-93)	69,0 (41-89)	69,5 (29-93)	0,857
Пол, число (%)				0,032
мужчин	81 (55)	30 (68)	51 (49)	
Сустав, число (%)				0,006
Колена	103 (70)	24 (55)	79 (76)	
Бедра	43 (29)	18 (41)	25 (24)	
Плеча	2 (1)	2 (4)	0 (0)	
Пациенты, подвергшиеся ревизионному хирургическому вмешательству, число (%)	102 (69)	40 (91)	62 (60)	<0,001
Срок проведения суставной аспирации после первичного хирургического вмешательства, число (%)				0,765
Ранний (менее 3 месяцев)	19/138 (14)	7/43 (16)	12/95 (13)	
Отсроченный (3-24 месяца)	55/138 (40)	16/43 (37)	39/95 (41)	
Поздний (более 24 месяцев)	64/138 (46)	20/43 (47)	44/95 (46)	

Таблица 6

Показатели немикробиологических и микробиологических тестов в соответствии с предложенными критериями ЕРЛС

Положительные результаты	Асептическое поражение (n = 104)	PJI* (n = 44)	AUC (%) (95% CI)	Чувствительность (%) (95% CI)	Специфичность (%) (95% CI)	PPV (%) (95% CI)	NPV (%) (95% CI)	Точность (%) (95% CI)
Немикробиологические тесты								
Клинические признаки <sup>1</sup>	0	19	-	43,2 (29,5-56,8)	100	100	80,6 (77,0-84,6)	83,1 (79,1-87,2)
D-лактат синовиальной жидкости более 1,263 ммоль/л	19	38	90,3 (85,7-95,0)	86,4 (75,0-95,5)	81,7 (74,0-88,5)	66,7 (57,8-76,6)	93,5 (88,7-97,5)	83,1 (77,0-89,1)
Количество лейкоцитов в синовиальной жидкости более 2000/мкл <sup>2</sup>	9	35	91,0 (85,1-96,8)	79,5 (68,2-90,9)	91,3 (85,6-96,2)	80,0 (69,4-90,2)	91,4 (86,8-96,0)	87,8 (82,4-92,6)
Процент гранулоцитов в синовиальной жидкости более 70% <sup>2</sup>	8	25	86,1 (79,4-92,9)	56,8 (40,9-70,5)	92,3 (86,5-97,1)	75,9 (62,9-88,9)	83,5 (78,8-88,3)	81,8 (75,7-87,2)
Количество лейкоцитов или процент гранулоцитов <sup>3</sup>	9	35	-	79,5 (68,2-90,9)	89,4 (83,7-95,2)	76,2 (66,0-87,2)	91,3 (86,5-95,9)	86,5 (81,1-91,9)
Гистопатология перипротезной ткани	0/43	25/34	-	73,5 (58,8-88,2)	100	100	82,7 (75,4-91,5)	88,3 (81,8-94,8)
Микробиологические тесты								
Посев синовиальной жидкости	8	20	-	45,5 (31,8-61,4)	100	100	81,2 (77,6-86,0)	83,8 (79,7-85,5)
Посев перипротезной ткани <sup>4</sup>	7/63	17/41	-	41,5 (26,8-56,1)	100	100	72,4 (68,8-77,8)	76,9 (71,2-82,7)
Посев обработанной ультразвуком жидкости <sup>4</sup>	5/49	17/39	-	43,6 (28,2-59,0)	100	100	69,0 (63,6-75,4)	75,0 (68,2-81,8)
Образец любого посева	19	23	-	52,3 (38,6-65,9)	100	100	83,2 (79,4-87,4)	85,8 (81,8-89,9)

Примечание. Если показан знаменатель, тест проводили не у всех пациентов. \* РЛ подтверждали, когда присутствовал по меньшей мере один из следующих критериев: клинические признаки (т.е. макроскопический гной в синовиальной жидкости или в окружении протеза, или наличие синусового тракта, повышенное количество лейкоцитов в синовиальной жидкости (более 2000 лейкоцитов/мкл или более 70% гранулоцитов)), гистопатологическое свидетельство воспаления в перипротезной ткани при положительном в значительной степени микробиологическом исследовании. <sup>1</sup> У одиннадцати пациентов имелся видимый гной в синовиальной жидкости, у 1 пациента имелся синусовый тракт, а у 7 пациентов наблюдали и то, и другое. <sup>2</sup> У 12 из 148 пациентов количество лейкоцитов (n равно 9) или процент гранулоцитов (n равно 8) были повышены, но не были диагностическими для РЛ из-за сопутствующей кристаллической артропатии (n равно 1), рецидивирующего вывиха (n равно 2), ревматологического заболевания суставов (n равно 3), раннего послеоперационного состояния (n равно 2), травмы (n равно 2), перипротезного перелома (n равно 1) или металлоза с кристаллами (n равно 1). <sup>3</sup> Ложноположительные результаты интерпретировали как положительные для оценивания эффективности. В 3 случаях количество лейкоцитов и процент гранулоцитов не превышали значение отсечки, хотя определялись как не интерпретируемые. <sup>4</sup> Роста низковирулентного микроорганизма только в одном образце было недостаточно для диагностики РЛ.

Таблица 7

Выделенные микроорганизмы у 23 пациентов с РЛ с положительным посевом

Патоген	Количество (%)
Коагулазонегативные стафилококки <sup>1</sup>	11 (48)
<i>Staphylococcus aureus</i>	5 (22)
<i>Streptococcus spp.</i> <sup>2</sup>	3 (13)
Грамотрицательные палочки <sup>3</sup>	3 (13)
<i>Enterococcus spp.</i>	1 (4)
<i>Bacteroides fragilis</i>	1 (4)

Таблица примера 3.

Таблица 8

Концентрация D-лактата	Соответствующий D-лактат (мМ)	Контроль	Пример 1	Пример 2	Среднее напряжение (мВ)	Интерпретация*
0%	0,0	0	0	0	0	Отрицательный
25%	0,9	0	41	71	56	Отрицательный
30%	1,2	0	-	-	85	Положительный (значение отсечки)
50%	1,8	0	273	155	214	Положительный
75%	2,7	0	217	141	179	Положительный
100%	3,7	0	276	159	218	Положительный

Среднее напряжение (сВ) вычисляли из 2 экспериментов. \* На основании значения отсечки, определенного с помощью спектрофотометрии.

Таблицы примера 4.

Таблица 9

## Амперометрическое измерение при pH 6,5

Соответствующий D-лактат (мМ)	Контроль	Пример 1	Пример 2	Средний ток (нА)	Интерпретация*
0,0	0	0	0	0	Отрицательный
0,01	0	7	5	6	Отрицательный
0,03	0	11	11	11	Отрицательный
0,1	0	35	25	30	Отрицательный
0,3	0	42	65	53,5	Отрицательный
1,2	0	108	114	111	Положительный (значение отсечки)
3,0	0	156	161	158,5	Положительный
10,0	0	288	270	279	Положительный
30,0	0	490	510	500	Положительный

Средний ток (нА) вычисляли из 2 экспериментов.

\* На основании значения отсечки, определенного с помощью спектрофотометрии.

Таблица 10

## Амперометрическое измерение при pH 8,5

Соответствующий D-лактат (мМ)	Контроль	Пример 1	Пример 2	Средний ток (нА)	Интерпретация*
0,0	0	0	0	0	Отрицательный
0,01	0	16	20	18	Отрицательный
0,03	0	44	50	47	Отрицательный
0,1	0	90	106	98	Отрицательный
0,3	0	184	223	204	Отрицательный
1,2	0	439	405	422	Положительный (значение отсечки)
3,0	0	740	843	792	Положительный
10,0	0	1386	1803	1595	Положительный
30,0	0	2455	2600	2528	Положительный

Средний ток (нА) вычисляли из 2 экспериментов.

\* На основании значения отсечки, определенного с помощью спектрофотометрии.

Ссылки.

1. Kaandorp CJ, Dinant HJ, van de Laar MA, Moens HJ, Prins AP, Dijkmans BA. Incidence and sources of native and prosthetic joint infection: a community based prospective survey. *Annals of the rheumatic diseases*. 1997;56(8):470-5.
2. Geirsson AJ, Statkevicius S, Víkingsson A. Septic arthritis in Iceland 1990-2002: increasing incidence due to iatrogenic infections. *Annals of the rheumatic diseases*. 2008;67(5):638-43.
3. Corvec S, Portillo ME, Pasticci BM, Borens O, Trampuz A. Epidemiology and new developments in the diagnosis of prosthetic joint infection. *Int J Artif Organs*. 2012;35(10):923-34.
4. Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. *The New England journal of medicine*. 2004;351(16):1645-54.

5. Morgenstern C, Cabric S, Perka C, Trampuz A, Renz N. Synovial fluid multiplex PCR is superior to culture for detection of low-virulent pathogens causing periprosthetic joint infection. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2018;90(2):115-9.
6. Trampuz A, Hanssen AD, Osmon DR, Mandrekar J, Steckelberg JM, Patel R. Synovial fluid leukocyte count and differential for the diagnosis of prosthetic knee infection. *The American journal of medicine*. 2004;117(8):556-62.
7. Renz N, Yermak K., Perka C., Trampuz A. Alpha defensin lateral flow test for diagnosis of periprosthetic joint infection. Not a screening but a confirmatory test. *J Bone Joint Surg Am*. 2018(100(9)):742-50.
8. Wouthuyzen-Bakker M, Ploegmakers JJW, Ottink K, Kampinga GA, Wagenmakers-Huizenga L, Jutte PC, et al. Synovial Calprotectin: An Inexpensive Biomarker to Exclude a Chronic Prosthetic Joint Infection. *J Arthroplasty*. 2018;33(4):1149-53.
9. Shafafy R, McClatchie W, Chettiar K, Gill K, Hargrove R, Sturridge S, et al. Use of leucocyte esterase reagent strips in the diagnosis or exclusion of prosthetic joint infection. *The bone & joint journal*. 2015;97-b(9):1232-6.
10. Marcos MA, Vila J, Gratacos J, Brancos MA, Jimenez de Anta MT. Determination of D-lactate concentration for rapid diagnosis of bacterial infections of body fluids. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1991;10(11):966-9.
11. Gratacos J, Vila J, Moya F, Marcos MA, Collado A, Sanmarti R, et al. D-lactic acid in synovial fluid. A rapid diagnostic test for bacterial synovitis. *The Journal of rheumatology*. 1995;22(8):1504-8.
12. Kortekangas P, Peltola O, Toivanen A, Aro HT. Synovial-fluid D-lactic acid in bacterial and other acute joint effusions. *Scandinavian journal of rheumatology*. 1994;23(4):203-5.
13. Uribarri J, Oh MS, Carroll HJ. D-lactic acidosis. A review of clinical presentation, biochemical features, and pathophysiologic mechanisms. *Medicine (Baltimore)*. 1998;77(2):73-82.
14. Ewaschuk JB, Naylor JM, Zello GA. D-lactate in human and ruminant metabolism. *The Journal of nutrition*. 2005;135(7):1619-25.
15. Karbysheva S, Grigorieva L, Golnik V, Popov S, Renz N, Trampuz A. Influence of retrieved hip- and knee-prosthesis biomaterials on microbial detection by sonication. *European cells & materials*. 2019;37:16-22.
16. Akgun D, Perka C, Trampuz A, Renz N. Outcome of hip and knee periprosthetic joint infections caused by pathogens resistant to biofilm-active

antibiotics: results from a prospective cohort study. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*. 2018;138(5):635-42.

17. Akgun D, Trampuz A, Perka C, Renz N. High failure rates in treatment of streptococcal periprosthetic joint infection: results from a seven-year retrospective cohort study. *The bone & joint journal*. 2017;99-b(5):653-9.

18. Renz N, Feihl S, Cabric S, Trampuz A. Performance of automated multiplex PCR using sonication fluid for diagnosis of periprosthetic joint infection: a prospective cohort. *Infection*. 2017;45(6):877-84.

19. Renz N, Mudrovic S, Perka C, Trampuz A. Orthopedic implant-associated infections caused by *Cutibacterium* spp. - A remaining diagnostic challenge. *PloS one*. 2018;13(8):e0202639.

20. Sigmund IK, Yermak K, Perka C, Trampuz A, Renz N. Is the Enzyme-linked Immunosorbent Assay More Accurate Than the Lateral Flow Alpha Defensin Test for Diagnosing Periprosthetic Joint Infection? *Clinical orthopaedics and related research*. 2018;476(8):1645-54.

21. Krenn V, Morawietz L, Perino G, Kienapfel H, Ascherl R, Hassenpflug GJ, et al. Revised histopathological consensus classification of joint implant related pathology. *Pathology, research and practice*. 2014;210(12):779-86.

22. Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ, Hanssen AD, Unni KK, Osmon DR, et al. Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *The New England journal of medicine*. 2007;357(7):654-63.

23. Kaliterna J, Weusthuis RA, Castrillo JI, Van Dijken JP, Pronk JT. Transient responses of *Candida utilis* to oxygen limitation: regulation of the Kluver effect for maltose. *Yeast (Chichester, England)*. 1995;11(4):317-25.

24. Stewart BJ, Navid A, Kulp KS, Knaack JL, Bench G. D-Lactate production as a function of glucose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)*. 2013;30(2):81-91.

25. Scheijen JL, Hanssen NM, van de Waarenburg MP, Jonkers DM, Stehouwer CD, Schalkwijk CG. L(+) and D(-) lactate are increased in plasma and urine samples of type 2 diabetes as measured by a simultaneous quantification of L(+) and D(-) lactate by reversed-phase liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Exp Diabetes Res*. 2012;2012:234812.

26. Kapadia BH, Berg RA, Daley JA, Fritz J, Bhave A, Mont MA. Periprosthetic joint infection. *The Lancet*. 2016;387(10016):386-94.

27. Smith G, Chetter I. Infection in prosthetic material. *Surgery (Oxford)*. 2015;33(11):559-64.

28. Corvec S, Portillo ME, Pasticci BM, Borens O, Trampuz A. Epidemiology and new developments in the diagnosis of prosthetic joint infection. *Int J Artif Organs*. 2012;35(10):923-34.
29. Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. *The New England journal of medicine*. 2004;351(16):1645-54.
30. Morgenstern C, Cabric S, Perka C, Trampuz A, Renz N. Synovial fluid multiplex PCR is superior to culture for detection of low-virulent pathogens causing periprosthetic joint infection. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2017;(in press).
31. Del Pozo JL, Patel R. Infection associated with prosthetic joints. *New England Journal of Medicine*. 2009;361(8):787-94.
32. Piper KE, Fernandez-Sampedro M, Steckelberg KE, Mandrekar JN, Karau MJ, Steckelberg JM, et al. C-reactive protein, erythrocyte sedimentation rate and orthopedic implant infection. *PloS one*. 2010;5(2):e9358.
33. Pérez-Prieto D, Portillo ME, Puig-Verdié L, Alier A, Martínez S, Sorlí L, et al. C-reactive protein may misdiagnose prosthetic joint infections, particularly chronic and low-grade infections. *International orthopaedics*. 2017;41(7):1315-9.
34. Sousa R, Serrano P, Dias JG, Oliveira J, Oliveira A. Improving the accuracy of synovial fluid analysis in the diagnosis of prosthetic joint infection with simple and inexpensive biomarkers. *Bone Joint J*. 2017;99(3):351-7.
35. Bottner F, Wegner A, Winkelmann W, Becker K, Erren M, Götze C. Interleukin-6, procalcitonin and TNF- $\alpha$ : markers of peri-prosthetic infection following total joint replacement. *The Journal of bone and joint surgery British volume*. 2007;89(1):94-9.
36. Deirmengian C, Hallab N, Tarabishy A, Della Valle C, Jacobs JJ, Lonner J, et al. Synovial fluid biomarkers for periprosthetic infection. *Clinical Orthopaedics and Related Research*®. 2010;468(8):2017-23.
37. Ewaschuk JB, Naylor JM, Zello GA. D-lactate in human and ruminant metabolism. *The Journal of nutrition*. 2005;135(7):1619-25.
38. Ewaschuk JB, Zello GA, Naylor JM, Brocks DR. Metabolic acidosis: separation methods and biological relevance of organic acids and lactic acid enantiomers. *Journal of Chromatography B*. 2002;781(1-2):39-56.
39. Maessen DE, Stehouwer CD, Schalkwijk CG. The role of methylglyoxal and the glyoxalase system in diabetes and other age-related diseases. *Clinical science*. 2015;128(12):839-61.
40. Smith S, Eng R, Campos J, Chmel H. D-lactic acid measurements in the diagnosis of bacterial infections. *Journal of clinical microbiology*. 1989;27(3):385-8.

41. Marcos M, Vila J, Gratacos J, Brancos M, De Anta MJ. Determination of D-lactate concentration for rapid diagnosis of bacterial infections of body fluids. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 1991;10(11):966-9.
42. Kortekangas P, Peltola O, Toivanen A, Aro H. Synovial-fluid D-lactic acid in bacterial and other acute joint effusions. *Scandinavian journal of rheumatology*. 1994;23(4):203-5.
43. Chen Z, Wang Y, Zeng A, Chen L, Wu R, Chen B, et al. The clinical diagnostic significance of cerebrospinal fluid d-lactate for bacterial meningitis. *Clinica chimica acta*. 2012;413(19):1512-5.
44. Renz N, Yermak K, Perka C, Trampuz A. Alpha defensin lateral flow test for diagnosis of periprosthetic joint infection: a screening or confirmatory test? (in press). *JBJs*. 2018.
45. Tande AJ, Patel R. Prosthetic joint infection. *Clinical microbiology reviews*. 2014;27(2):302-45.
46. Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ, Hanssen AD, Unni KK, Osmon DR, et al. Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *New England Journal of Medicine*. 2007;357(7):654-63.
47. Portillo ME, Salvado M, Trampuz A, Plasencia V, Rodriguez-Villasante M, Sorli L, et al. Sonication versus vortexing of implants for diagnosis of prosthetic joint infection. *J Clin Microbiol*. 2013;51(2):591-4.
48. McLellan A, Phillips S, Thornalley P. Fluorimetric assay of D-lactate. *Analytical biochemistry*. 1992;206(1):12-6.
49. Team R. A language and environment for statistical computing. 2017. 2017.
50. Deirmengian C, Kardos K, Kilmartin P, Cameron A, Schiller K, Booth RE, et al. The alpha-defensin test for periprosthetic joint infection outperforms the leukocyte esterase test strip. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2015;473(1):198-203.
51. Parvizi J, Gehrke T. International Consensus Group on Periprosthetic Joint I (2014) Definition of periprosthetic joint infection. *J Arthroplasty*. 29(7):1331.
52. Karbysheva S, Grigoricheva L, Golnik V, Popov S, Renz N, Trampuz A. Influence of retrieved hip-and knee-prosthesis biomaterials on microbial detection by sonication. *European cells & materials*. 2019;37:16-22.
53. Mayeur C, Gratadoux J-J, Bridonneau C, Chegdani F, Larroque B, Kapel N, et al. Faecal D/L lactate ratio is a metabolic signature of microbiota imbalance in patients with short bowel syndrome. *PLoS One*. 2013;8(1):e54335.
54. Prestes AdS, dos Santos MM, Ecker A, Zanini D, Schetinger MRC, Rosemberg DB, et al. Evaluation of methylglyoxal toxicity in human erythrocytes, leukocytes and platelets. *Toxicology mechanisms and methods*. 2017;27(4):307-17.
55. Morawietz L, Tiddens O, Mueller M, Tohtz S, Gansukh T, Schroeder JH, et al. Twenty-three neutrophil granulocytes in 10 high-power fields is the best histopathological threshold to differentiate between aseptic and septic endoprosthesis loosening. *Histopathology*. 2009;54(7):847-53.
56. Matti Kaisti, Zhanna Boeva, Juho Koskinen, Sami Nieminen, Johan Bobacka, and Kalle Levon. Hand-Held Transistor Based Electrical and Multiplexed Chemical Sensing System. *ACS Sens*. 2016, 1, 1423–1431. DOI: 10.1021/acssensors.6b00520.
57. Janata, J. *Principles of Chemical Sensors*, 2nd ed.; Springer Publishing Company, Incorporated, 2009.
58. Ronkainen, N. J.; Halsall, H. B.; Heineman, W. R. Electro-chemical biosensors. *Chem. Soc. Rev*. 2010, 39, 1747–1763.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. In vitro способ диагностики, прогнозирования, оценки риска, мониторинга, терапевтического ведения и/или терапевтического контроля инфекционного заболевания, включающий:
  - a) обеспечение образца субъекта, проявляющего клинические симптомы и/или подозреваемого на наличие инфекции,
  - b) определение уровня D-лактата в указанном образце,
  - c) при этом уровень D-лактата указывает на наличие инфекционного заболевания, отличающийся тем, что
  - d) уровень D-лактата в указанном образце определяют с помощью электрохимической сенсорной системы (биосенсора).
2. In vitro способ по п.1, где электрохимическая сенсорная система содержит потенциометрический сенсор, предпочтительно потенциометрический сенсор на основе транзистора.
3. In vitro способ по п.1 или 2, где электрохимическая сенсорная система содержит ионно-чувствительный полевой транзистор (ISFET).
4. In vitro способ по любому из пп.1-3, где электрохимическая сенсорная система содержит амперометрический сенсор.
5. In vitro способ по любому из пп.1-4, где электрохимическая сенсорная система содержит связывающую D-лактат молекулу, предпочтительно D-лактатдегидрогеназу (D-LDH).
6. In vitro способ по любому из пп.1-5, где электрохимическая сенсорная система содержит электрод определения (рабочий), предпочтительно включающий поверхность из углерода или золота.
7. In vitro способ по п.5, где связывающая D-лактат молекула иммобилизована на электроде определения.
8. In vitro способ по любому из пп.1-7, где электрохимическая сенсорная система содержит предпочтительно одноразовую тест-полоску (чип) для электрохимического определения уровня D-лактата, при этом тест-полоска содержит электрод определения с иммобилизованной связывающей D-лактат молекулой и предпочтительно также противозлектрод и/или электрод сравнения.
9. In vitro способ по любому из пп.1-8, где используется одноразовая тест-полоска, которая помещается в предпочтительно питающееся от батареи переносное компактное устройство считывания для осуществления измерения D-лактата.
10. In vitro способ по любому из пп.1-9, где иммобилизация связывающей D-лактат молекулы, представляющей собой D-LDH, на поверхности электрода определения биосенсора достигается с помощью любого из адсорбции, ковалентного связывания, захвата, инкапсуляции, сшивания или взаимодействия тиол-золото, предпочтительно сшивания или взаимодействия тиол-золото.
11. In vitro способ по любому из пп.1-10, где система дает возможность параллельного определения уровней D-лактата в более чем одном образце.
12. In vitro способ по любому из пп.1-11, где инфекционное заболевание представляет собой микробную бактериальную и/или грибковую инфекцию, предпочтительно вызванную по меньшей мере одним инфекционным возбудителем, выбранным из группы, включающей *Staphylococcus aureus*, коагулазонегативные стафилококки, *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., анаэробы, грамотрицательные бактерии и *Candida* spp.
13. In vitro способ по любому из пп.1-12, где инфекционное заболевание представляет собой инфекцию сустава, инфекцию протезного сустава (ПИ), менингит, перитонит, инфекцию плевральной полости, инфекцию перикардального пространства и/или инфекцию кровотока.
14. In vitro способ по любому из пп.1-13, где повышенный уровень D-лактата, определяемый с помощью электрохимической сенсорной системы в указанном образце по сравнению с соответствующим контролем, таким как образец от здорового субъекта, указывает на наличие инфекционного заболевания.
15. In vitro способ по любому из пп.1-14, где измерение тока или напряжения с помощью электрохимической сенсорной системы, соответствующее уровню D-лактата в указанном образце, равному или превышающему 1,2 ммоль/л, указывает на наличие инфекционного заболевания и/или указывает на необходимость начала или изменения лечения антибиотиком.
16. In vitro способ по любому из пп.1-15, где электрохимическую сенсорную систему калибруют с использованием одного или нескольких калибровочных образцов с определенной концентрацией D-лактата перед определением уровня D-лактата в указанном образце.
17. In vitro способ по любому из пп.1-16, где уровень D-лактата, определенный посредством электрохимической сенсорной системы, не зависит от количества эритроцитов и/или гемоглобина, присутствующих в указанном образце.
18. In vitro способ по любому из пп.1-17, где образец выбран из группы, включающей образец физиологической жидкости, образец гомогенизированной ткани, образец крови, образец сыворотки крови, образец плазмы, образец мочи, суставной аспират, образец синовиальной жидкости, образец асцита, образец перитонеальной жидкости, образец плевральной жидкости, образец перикардальной жидкости и/или образец спинномозговой жидкости.

19. Набор для выполнения способа по любому из предыдущих пунктов, включающий: электрохимическую сенсорную систему (биосенсор) для определения уровня D-лактата в образце, где электрохимическая сенсорная система содержит:

i. тест-полоску (чип) для электрохимического определения уровня D-лактата, при этом тест-полоска содержит электрод определения с иммобилизованной связывающей D-лактат молекулой, эталонные данные, такие как эталонный уровень D-лактата.

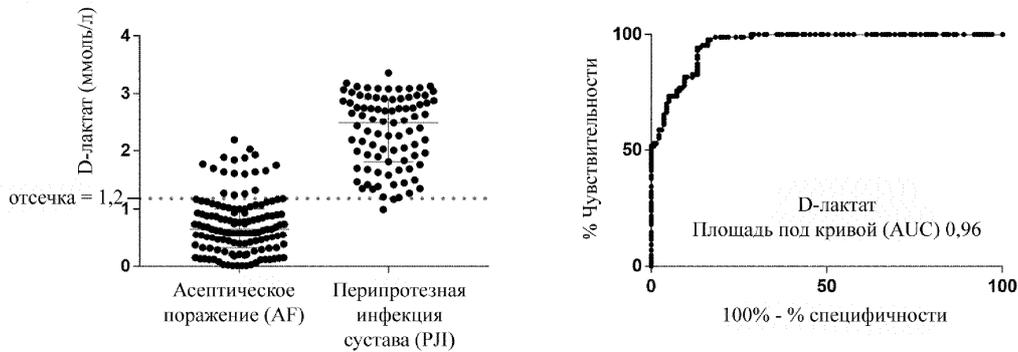
20. Набор по п.19, где указанная тест-полоска также содержит противэлектрод и/или электрод сравнения.

21. Набор по п.19 или 20, где указанная электрохимическая сенсорная система дополнительно содержит (ii) переносное компактное устройство считывания для вставки тест-полоски и выполнения измерения D-лактата.

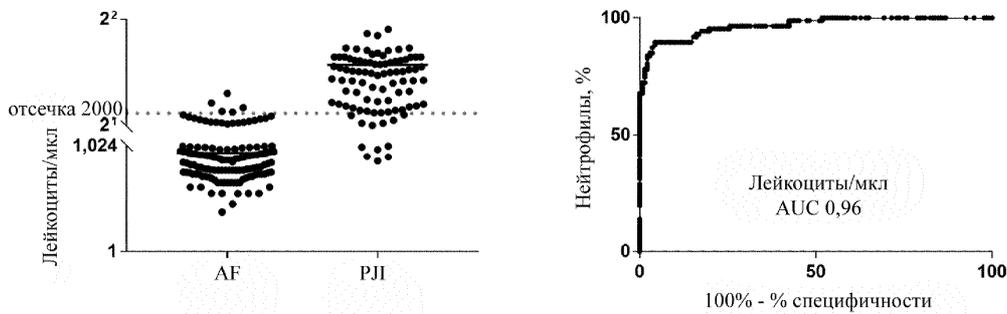
22. Набор по любому из пп.19-21, где указанный эталонный уровень D-лактата соответствует уровню D-лактата в указанном образце, равному или превышающему 1,2 ммоль/л.

23. Набор по любому из пп.19-22, где указанные эталонные данные хранятся на машиночитаемом носителе и/или используются в форме исполняемого компьютером кода, сконфигурированного для сравнения определенных уровней D-лактата с указанными эталонными данными.

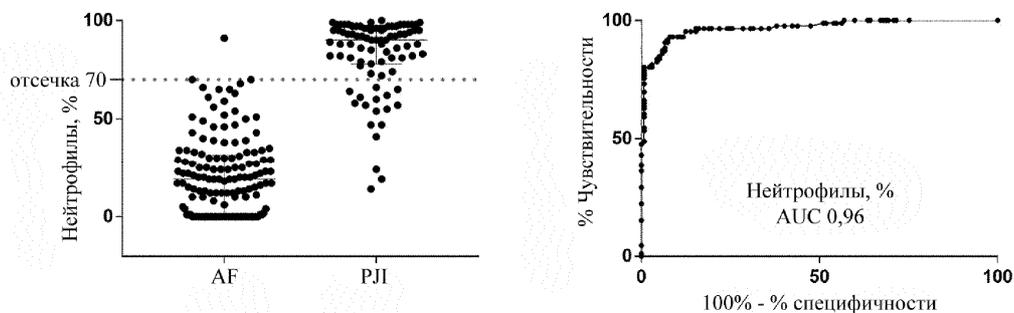
24. Набор по любому из пп.19-23, дополнительно включающий реагенты для калибровки электрохимической сенсорной системы.



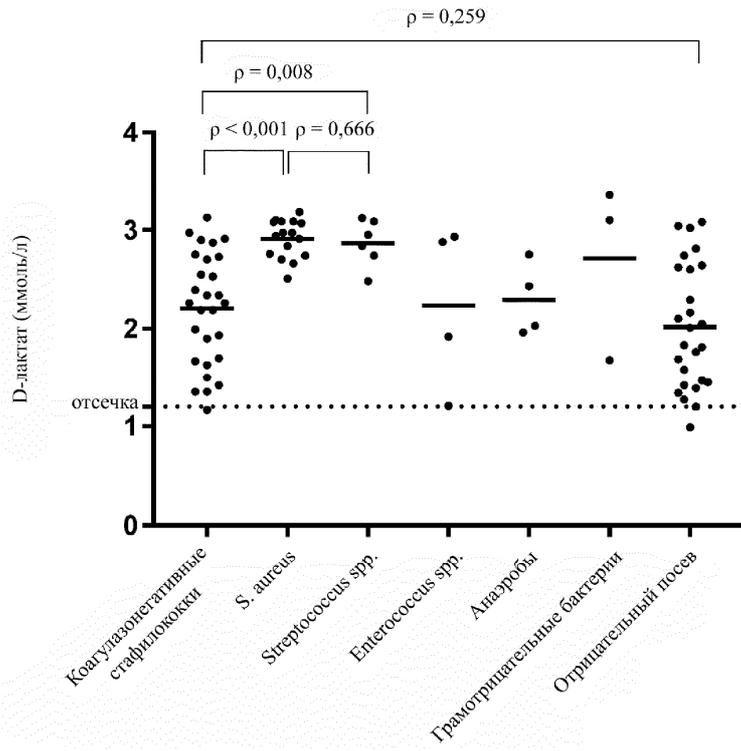
Фиг. 1А



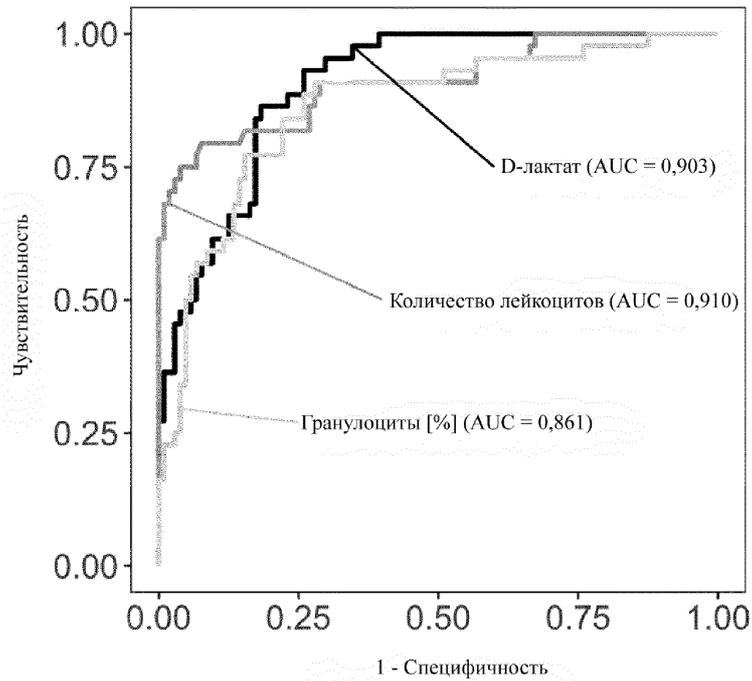
Фиг. 1В



Фиг. 1С

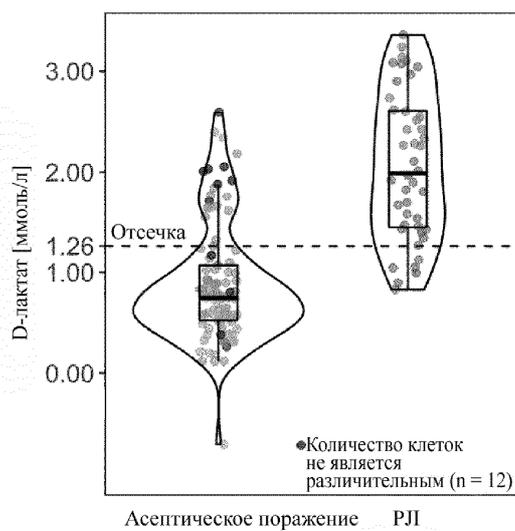


Фиг. 2

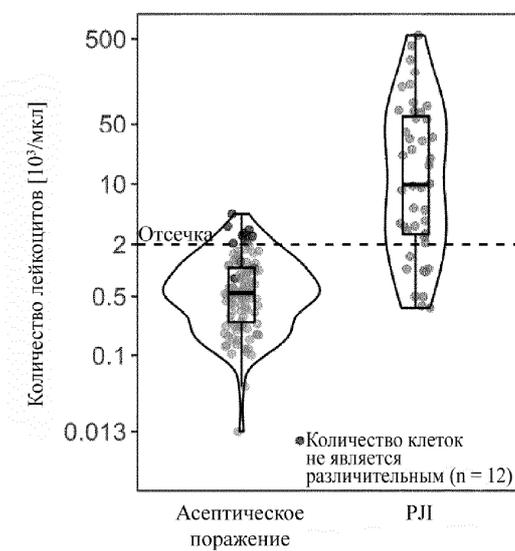


Фиг. 3

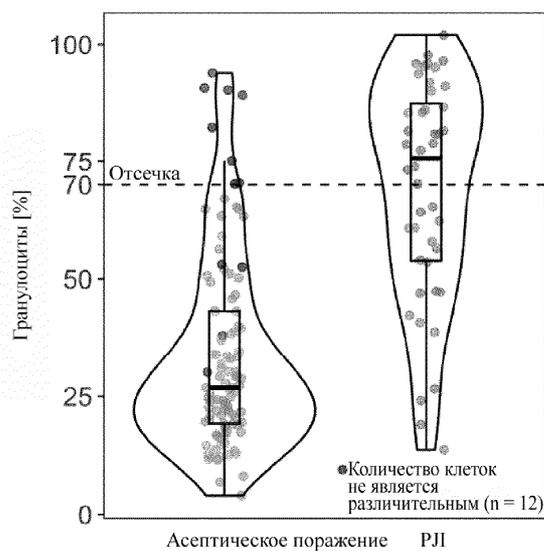
А



В

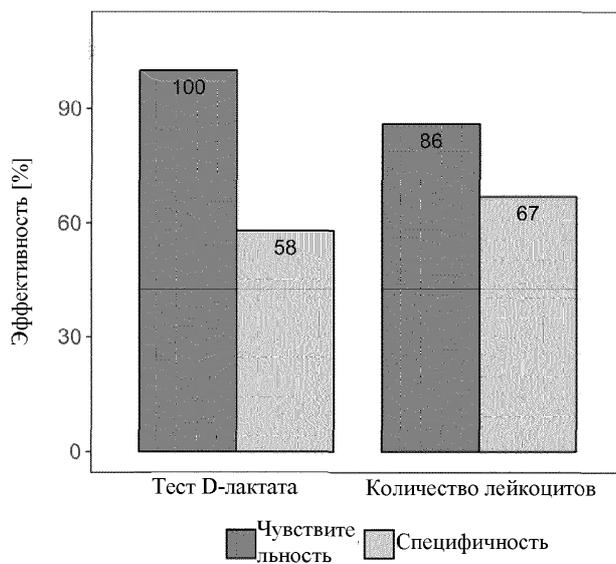


С

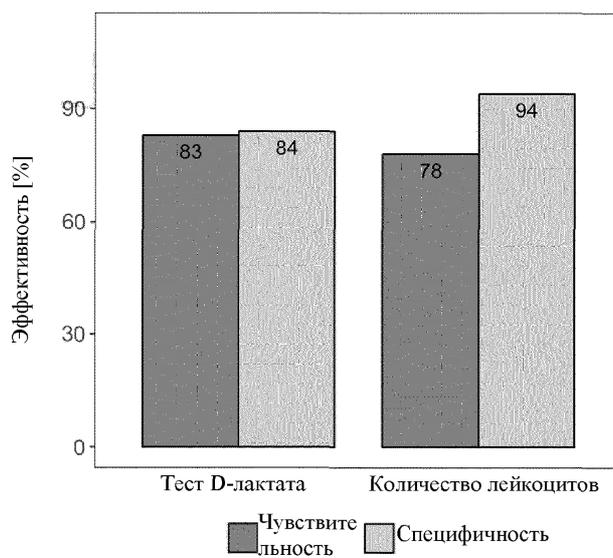


Фиг. 4

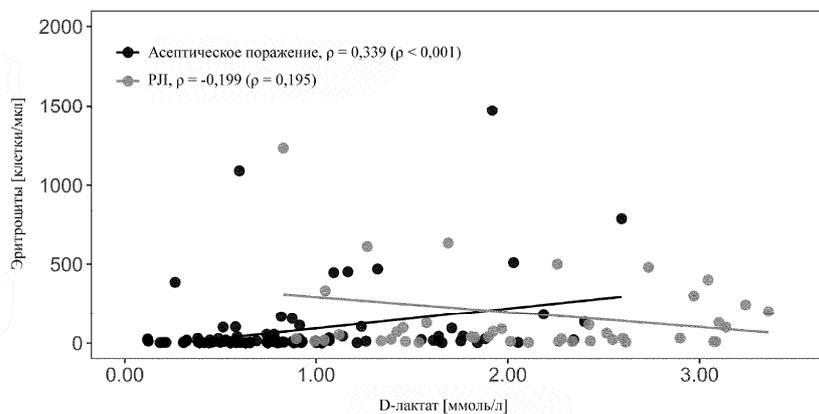
А) Ранний (менее 3 месяцев) (n=19)



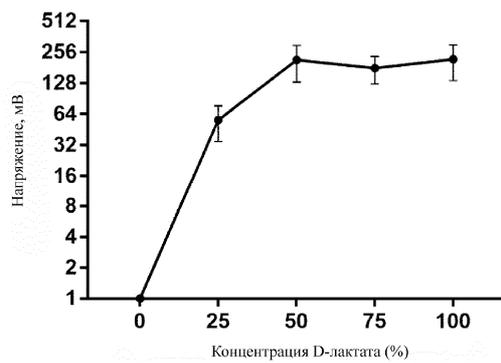
В) Отсроченный/поздний (3-24 месяца) (n=119)



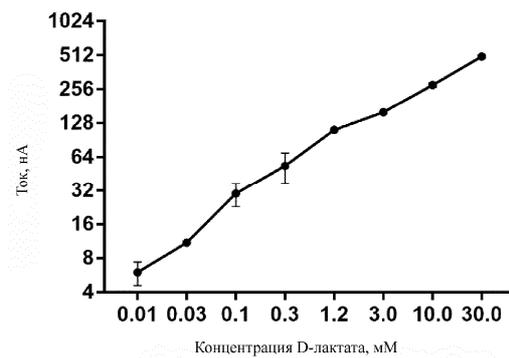
Фиг. 5



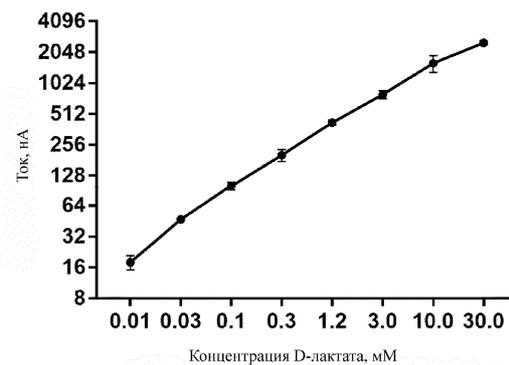
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9

