

Изобретение относится к медицине, а именно к инфекционным болезням.

Известен биологический способ определения токсигенности возбудителя дифтерии, основанный на изучении реакции организма морских свинок или кроликов на внутри кожное введение вирулентной культуры *Corinebacterium diphtheriae*. На 2 - 3 день после введения вирулентной культуры наблюдают воспалительный инфильтрат с последующим некрозом кожи. У животных, защищенных антитоксической сывороткой, указанные явления отсутствуют (Крылова М.Д. Дифтерийная инфекция. - М., 1976).

Недостатками указанного способа являются длительность его выполнения (не менее 4 суток), а также возможность получения ложных отрицательных результатов из-за гибели клеток *C.diphtheriae* в коже в результате фагоцитоза.

Известен также способ-прототип определения токсигенности возбудителей дифтерии на чашках *in vitro*, в основе которого лежит взаимодействие между токсином и антитоксином, которое происходит в плотных питательных средах в местах оптимальных количественных соотношений токсина, продуцируемого коринебактериями, диффундирующего в агар, и антитоксина, содержащегося в антитоксической противодифтерийной сыворотке. В тех участках, где токсин встречается с антитоксином, выпадает преципитат в виде белых линий, "стрел" или "усов" (Методические рекомендации к Приказу №45 МЗ СССР от 02.04.86г.; Дифтерийная инфекция / Т.Г. Философова, П.С. Мощич, М.Н. Мельник, С.А. Богатырева. - К., 1984).

Определение токсигенности возбудителей дифтерии указанным методом производится следующим образом.

1. Забор материала от пациента производится сухим стерильным ватным тампоном отдельно со слизистой зева и миндалин и из носа.

2. Производится посев материала на одну из рекомендуемых питательных сред, например, на кровяно-теллуритовый агар.

3. Через 24 часа производится учет результатов посева. При наличии подозрительных колоний проводится посев одной половины каждой колонии на чашку для определения токсигенности (см. операцию 4) и на среду Пизу (тест на цистиназу), а другой половины - на скошенный сывороточный агар для выделения чистой культуры. Чашки с первичным посевом помещаются в термостат и выдерживаются еще сутки для дальнейшего выявления роста подозрительных колоний.

4. Для определения токсигенности на чашку со средой симметрично помещают 4 диска, пропитанных дифтерийным антитоксином. Посев испытуемых культур, и контрольных штаммов производится бляшками. Вокруг каждого диска засеваются 5 бляшек диаметром 6 - 7мм на расстоянии от диска 6 - 7мм: 2 контрольные из токсигенного контрольного штамма 24 - 48 часового роста и 3 испытуемые. Чашки с посевами помещаются в термостат.

5. Учет результатов определения токсигенности производится через 24 часа. Культура считается токсигенной, если отчетливо видны белесоватые линии преципитации, сливающиеся под углом с линиями преципитации контрольных штаммов. Если все исследуемые культуры токсигенны, то сливающиеся линии преципитации образуют правильный пятиугольник. Культура считается нетоксигенной, если у испытуемой культуры отсутствуют линии преципитации при их наличии у контрольного штамма.

Недостатками указанного способа являются:

1. Невысокая точность определения токсигенности, связанная с плохим ростом и недостаточно массивным засевом исследуемых штаммов, отклонений в составе питательных сред, подсыхания поверхности агара, применения поливалентных сывороток, обуславливающих образование ложных линий преципитации, появлением атипических штаммов (Турьянов М.Х. Особенности клиники и эпидемиологии дифтерии на современном этапе // Сов. медицина. - 1991. - №1. - С.75 - 77; Шестакова И.В., Мазепа Ю.А. Случай тяжелого течения дифтерии // Врачебное дело. - 1994. - №1. - С.112 - 114).

2. Длительность определения токсигенности - до 48 и более часов от момента получения материала от пациента.

В основу изобретения поставлена задача усовершенствования способа диагностики токсигенности возбудителя дифтерии, в котором за счет применения полимеразной цепной реакции возможно повышение точности и специфичности определения токсигенности, что позволит значительно сократить затраты времени и труда, устранить вредные факторы и повысить качество диагностики и терапии дифтерии.

Поставленная задача решается тем, что в способе экспресс-диагностики токсигенности возбудителя дифтерии путем забора ротоглоточного смыва пациента, согласно изобретению, в пробу добавляют этиловый спирт с дальнейшим лизированием пробы, осаждением бактериальной ДНК и амплификацией фрагмента ДНК методом геноспецифической полимеразной цепной реакции с применением прямого и обратного праймеров и термостабильной ДНК-полимеразы *Tth*, после чего осуществляется электрофорез продуктов амплификации в агарозном геле.

Заявляемый способ экспресс-диагностики токсигенности возбудителя дифтерии основан на применении полимеразной цепной реакции с парой специфических праймеров, фланкирующих участок гена токсигенности *C.diphtheriae* длиной 260 пар нуклеотидов, что позволяет с большой точностью определить токсигенность возбудителя дифтерии при сокращении затрат времени и труда и устранить вредные факторы.

Сущность изобретения заключается в следующем.

Забор материала от пациента производится сухим стерильным ватным тампоном со слизистой зева и миндалин. Материал с тампона смывают стерильной водой в стерильную пробирку и добавляют этиловый спирт до концентрации 50%.

Пробирки с материалом центрифугируют в течение 15мин при 8000об/мин, после чего сливают супернатант, а осадок суспендируют в 200мкл стерильной воды. Производят щелочной лизис пробы, добавляя в пробирку 2,8мкл 16,5М раствора NaOH, после чего нейтрализуют раствор добавлением 40мкл 2М раствора трис-HCl pH = 8,0. После этого центрифугируют пробирки в течение 3мин при 8000об/мин, отбирают супернатант и производят депротеинизацию пробы добавлением равного объема фенола. Центрифугируют пробирку, отбирают верхнюю фазу и добавляют к ней равный объем хлороформа. Повторно центрифугируют пробирку, отбирают верхнюю фазу и осаждают выделенную ДНК двумя объемами холодного этилового спирта, после чего пробирку выдерживают при температуре +4 в течение 2 - 4 часов.

ДНК осаждают центрифугированием в течение 30мин при 8000об/мин, растворяют осадок в 20мкл буфера ТЕ (трис-ЕДТА) и производят амплификацию с применением прямого и обратного олигонуклеотидов (праймеров), термостабильной полимеразы в течение 35 циклов.

Продукты амплификации исследуют путем электрофореза в 1,8% агарозном геле. Наличие фрагмента ДНК

длиной 260п.н. свидетельствует о наличии гена токсигенности в исследуемом штамме и позволяет сделать вывод о токсигенности данного возбудителя.

Таким образом, за счет введения добавления к пробе этилового спирта мы определяем возможность безопасной работы с образцами, а за счет применения щелочного лизиса пробы, выделения и осаждения бактериальной ДНК с последующим применением амплификации (полимеразной цепной реакции) с парой специфических праймеров и электрофореза продуктов амплификации добиваемся большей быстроты точности и специфичности определения токсигенности.

Результаты исследований по способу-прототипу и заявляемому способу занесены в табл.1 и 2 соответственно.

Приводим пример конкретного выполнения способа.

Больная К., 32 лет, поступила в инф. больницу с жалобами на общую слабость, высокую температуру, головокружение, боль в горле на 2 - й день заболевания. Состояние при поступлении тяжелое, отек и гиперемия слизистой ротоглотки, миндалины резко отечны, на них налеты серого цвета, снять которые не удалось. Отек шеи до 1 - й шейной складки. Учитывая клинику дифтерии, больной было введено 120тыс. ПДС, назначен курс дезинтоксикационной терапии. После проведенной терапии состояние больной значительно улучшилось.

Результаты лабораторно-инструментальных исследований.

ЭКГ - умеренные изменения миокарда, нарушения проводимости ножек пучка Гиса.

РПГА - 1 : 40.

Бактериологическое исследование мазков на токсигенность по способу-прототипу дало отрицательный результат.

Параллельно с традиционными методами лабораторной диагностики у больной при поступлении был взят смыв из ротоглотки для проведения исследования методом ПЦР по заявляемому способу. Геноспецифическая ПЦР-диагностика дала положительный результат, в смыве был обнаружен токсический штамм *C.diphtheriae*.

Учитывая клинику заболевания и результаты исследования, больной был поставлен клинический диагноз: токсическая дифтерия ротоглотки 1 степени.

Т а б л и ц а 1

Результаты исследования проб на токсигенность на чашках по способу-прототипу

Клиническая картина	Дифтерия (N=78)	
Результаты исследования	Положительно	Отрицательно
Количество	40	38
Результаты в %	51,3	48,7

Т а б л и ц а 2

Результаты исследования проб на токсигенность методом геноспецифической амплификации (полимеразной цепной реакции)

Клиническая картина	Дифтерия (N=78)	
Результаты исследования	Положительно	Отрицательно
Количество	69	9
Результаты в %	88,4	11,6