



УКРАЇНА

(19) UA (11) 16062 (13) U
(51) МПК (2006)
A61B 5/03МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ЕКСПРЕС-ДІАГНОСТИКИ ГНІЙНИХ БАКТЕРІАЛЬНИХ МЕНІНГІТІВ

1

2

(21) u200601691

(22) 17.02.2006

(24) 17.07.2006

(46) 17.07.2006, Бюл. № 7, 2006 р.

(72) Нартів Павло Вікторович, Малий Василь Пантелейович, Кульшин Володимир Євгенович, Якущенко Вікторія Анатоліївна

(73) ХАРКІВСЬКА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ ПІСЛЯ-ДИПЛОМНОЇ ОСВІТИ

(57) Спосіб експрес-діагностики гнійних бактеріальних менінгітів, що включає визначення наявності бактеріальних ендотоксинів у цереброспінальній рідині хворого, що включає проведення тест-реакції у буферному середовищі екзогенного суб-

страту 3,4-дигідроксифенілаланіну з додаванням розведеної цереброспінальної рідини хворого та компонентів крові личинок комах, проведення інкубації одержаної суміші при температурі 30°C та діагностування гнійного бактеріального менінгіту за наявністю темного забарвлення суміші, який відрізняється тим, що використовують гемолімфу личинок капустяної білянки (*Pieris brassicae*), цереброспінальну рідину хворого розводять фізіологічним розчином у співвідношенні 1:100, інкубацію суміші проводять протягом 60 хвилин, а кількісний вміст бактеріальних ендотоксинів у цереброспінальній рідині хворого визначають за ступенем забарвлення суміші.

Корисна модель відноситься до медицини, а саме до лабораторної експрес-діагностики гнійних бактеріальних менінгітів, зокрема з використанням колориметричних тест-реакцій.

Запалення оболонок мозку - менінгіт - найчастіше викликається бактеріями (як грампозитивними, так і грамнегативними) та вірусами. У ранні терміни захворювання не завжди можна диференціювати бактеріальну або вірусну етіологію менінгіту, внаслідок чого неможливо відразу призначити адекватну етіотропну терапію.

Актуальність проблеми бактеріальних, особливо гнійних, менінгітів визначається тяжкістю їх перебігу, можливістю розвитку небезпечних для життя ускладнень і високою летальністю, попередження якої значною мірою залежить від своєчасної діагностики. Діагностика гнійних бактеріальних менінгітів є складною і відповідальною внаслідок дуже швидкого розвитку хвороби, яка характеризується проявом неспецифічних ознак і симптомів.

Класичними способами лабораторної діагностики гнійного бактеріального менінгіту є бактеріологічні дослідження цереброспінальної рідини (ЦСР) хворого.

Проте такі дослідження тривають не менше доби і гальмують призначення адекватної терапії.

У випадках підозри на гнійний бактеріальний менінгіт використовують більш швидкі методи діагностики, зокрема забарвлення ЦСР по Граму, яке дає позитивний результат лише у 60-70% випадків бактеріального менінгіту. При одержанні негатив-

ного результату необхідно дослідити ЦСР за тестом латексної аглютинації на бактеріальні антигени. Проте негативний результат тестів ніколи не виключає діагнозу менінгіту, викликаного специфічним менінгіальним патогеном. Для виявлення ДНК бактерій у пацієнта з менінгококовим менінгітом використовують полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР).

Зазначені швидкі способи діагностики бактеріального менінгіту мають високу вартість, потребують дорогих реактивів та спеціального складного обладнання і практично недоступні для більшості лікувальних закладів.

Найбільш близьким та обраним за прототип є експрес-спосіб (тест) діагностики бактеріальних менінгітів з використанням плазми личинок тутового шовкопряда (*Bombyx mori*). [Katsuya Inada, Kiyomi Takahashi, Sadato Ichi-nohe, Hidetoshi Suda, Masakazu Tsuchiya, Junkichi Takahashi, Shuji Matsuura, Takeshi Kasai, Masao Yoshida, Shigeatsu Endo and Shigehiro Sato, M.2003.A Silkworm Larvae Plasma Test for Detecting Peptidoglycan in Cerebrospinal Fluid Is Useful for the Diagnosis of Bacterial Meningitis. Microbiol. Immunol., 47(10),701-707].

Спосіб полягає у наступному: ліофільний субстрат 3,4-дигідроксифенілаланін розчиняють буферним розчином, до якого додають розведену водою ЦСР у співвідношенні 1:8 та плазму личинок тутового шовкопряда. Одержану суміш інкубують при температурі 30°C протягом 120 хвилин.

(19) UA (11) 16062 (13) U

Бактеріальний менінгіт діагностують при темному забарвленні суміші. Тест чутливий до грампозитивних та грамнегативних бактерій.

Проте, зважаючи на стрімкий розвиток гнійних бактеріальних менінгітів, бажано скоротити час проведення тест-реакцій. Крім того, відомий спосіб передбачає використання плазми личинок тутового шовкопряда, що харчуються виключно листям шовковиці, ареал розповсюдження якої обмежений певними кліматичними зонами. Наприклад, шовковиця не є представником природної флори України, а існує лише у вигляді обмежених штучних насаджень і не може бути джерелом зеленого корму цілорічне при вирощуванні тутового шовкопряда у лабораторних умовах. Використання у відомому способі плазми личинок потребує проведення додаткової операції виділення плазми з гемолімфи шляхом відокремлення гемоцитів.

Завданням корисної моделі є удосконалення способу експрес-діагностики гнійних бактеріальних менінгітів шляхом використання гемолімфи капустяної білянки при проведенні колориметричних тест-реакцій за заявленими параметрами, що дозволяє вдвічі скоротити час діагностики, забезпечує чутливість способу до грампозитивних та грамнегативних бактерій, зокрема до специфічних менінгококів, які найскладніше виявити.

Поставлене завдання вирішується таким чином, що у способі експрес-діагностики бактеріальних менінгітів шляхом визначення наявності бактеріальних ендотоксинів у ЦСР хворого, що включає проведення тест-реакції у буферному середовищі екзогенного субстрату 3,4-дигідроксифенілаланіну з додаванням розведеної ЦСР хворого та компонентів крові личинок комах, проведення інкубації одержаної суміші при температурі 30°C та діагностування гнійного бактеріального менінгіту за наявністю темного забарвлення суміші, згідно з винаходом додатково передбачено, що використовують гемолімфу личинок капустяної білянки (*Pieris brassicae*), ЦСР хворого розводять фізіологічним розчином у співвідношенні 1:100, інкубацію суміші проводять протягом 60 хвилин, а кількісний вміст бактеріальних ендотоксинів у ЦСР хворого визначають за ступенем забарвлення суміші.

Тест-реакція, наведена у заявленому способі, обумовлена наступними причинами. У ЦСР хворого на гнійний бактеріальний менінгіт присутні пептидоглікани, які є компонентами клітинних стінок грампозитивних і грамнегативних бактерій. Гемолімфа личинок капустяної білянки містить природний фермент профенол-оксидазу, яка виступає каталізатором реакції взаємодії пептидогліканів з екзогенним субстратом 3,4-дигідроксифенілаланіном з утворенням меланіну, який при проведенні інкубації забарвлює реакційну суміш у темний колір. Активність ферменту, а отже і ступінь забарвлення, пропорційна концентрації бактеріальних ендотоксинів у ЦСР хворого. Реакція специфічна для грампозитивних і грамнегативних бактерій. Забарвлення суміші не відбувається при наявності в ЦСР хворого вірусних збудників, тим самим дозволяючи відрізнити гнійні бактеріальні менінгіти від вірусних і оперативно призначити необхідну етіотропну терапію.

Заявлений спосіб передбачає використання у тест-реакції гемолімфи личинок капустяної білянки, яка є звичайним сільськогосподарським шкідником і може бути розведена в Україні як у природних, так і у лабораторних умовах при цілорічній наявності корму (капусти).

За заявленим способом використовують розведення ЦСР хворого фізіологічним розчином у співвідношенні 1:100, усуваючи тим самим можливий вплив інгібіторів ферментативної реакції і мінімізуючи кількість ЦСР, необхідної для діагностики.

Авторами проведені експериментальні дослідження з використання заявленого способу для діагностики гнійних бактеріальних менінгітів, викликаних основними збудниками: *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*. Спосіб чутливий відносно всіх зазначених видів бактерій і на відміну від способу-прототипу дозволяє діагностувати менінгоковий менінгіт.

Заявлений спосіб здійснюють наступним чином. У хворих з підозрою на гнійний бактеріальний менінгіт забирають зразки ЦСР, які розводять фізіологічним розчином у співвідношенні 1:100. До одержаного розчину ЦСР додають буферний розчин екзогенного субстрату 3,4-дигідроксифенілаланіну та гемолімфу личинок капустяної білянки, яку відбирають у стерильних умовах мікропіпеткою з пластиковим наконечником. Завчасно відібрану гемолімфу до проведення експерименту зберігають під шаром мінеральної олії при 20°C. Одержану суміш інкубують при температурі 30°C протягом 60 хвилин. При наявності темного кольору суміші після інкубації діагностують гнійний бактеріальний менінгіт.

Для визначення концентрації бактеріальних ендотоксинів у ЦСР хворого за ступенем забарвлення реакційної суміші використовують завчасно побудовану калібрувальну криву. Для цього проводять серію тест-реакцій за заявленим способом, додаючи до реакційної суміші замість розчину ЦСР хворого відомі дрібні зростаючі порції промислового одержаного пептидоглікану і вимірюють будь-яким відомим способом оптичну щільність забарвленої суміші. Таким чином одержують калібрувальну криву, яка є функцією оптичної щільності суміші від концентрації пептидогліканів.

Корисна модель ілюструється прикладами.

Приклад 1

Було проведено діагностування трьох груп пацієнтів по 10 чоловік за допомогою заявленого способу. У першу групу були відібрані хворі з менінгоковим менінгітом, підтвердженим попередніми бактеріологічними та молекулярно-генетичними (ПЛР) дослідженнями. До другої групи увійшли хворі з вірусним серозним менінгітом, підтвердженим серологічне. До обох цих груп були відібрані хворі у віці від 18 до 43 років з тяжким і середньотяжким перебігом хвороби. Третю контрольну групу склали здорові особи з інтактною ЦСР.

У осіб всіх трьох груп відбирали зразки ЦСР у об'ємі 0,5мл при надходженні у стаціонар у межах звичайної діагностичної спинномозкової пункції з використанням одноразових пункційних голок і

стерильних апірогенних одноразових пробірок для попередження хибно-позитивних результатів. Зразки ЦСР розводили 0,9% розчином NaCl у співвідношенні 1:100.

До 100мкл кожного зразку розведеної ЦСР додавали 100мкл Good's буферу з 10мкл екзогенного субстрату 3,4-дигідроксифенілаланін (10мкг/мл) та 10мкл гемоліфи личинок капустиної білянки, відібраної у стерильних умовах. Одержану суміш інкубували при 30°C протягом 60 хвилин.

Додатково проводили два контрольних дослідів, коли замість розведеної ЦСР до реакційної суміші додавали 0,9% розчин NaCl без вмісту пептидоглікану (негативний контроль) та розчин готового пептидоглікану -10пг/мл (позитивний контроль).

Темне забарвлення сумішей спостерігалось у варіантах діагностування хворих на гнійних бактеріальний менингіт (менингококовий менингіт) та у позитивному контролі. У варіантах з хворими на вірусний менингіт, здоровими пацієнтами та негативним контролем вірогідного забарвлення сумішей не відбулося.

Оптичну щільність всіх одержаних сумішей після інкубації вимірювали при довжині хвилі 490нм. Дані дослідів наведені у таблиці 1.

Таблиця 1

Оптична щільність варіантів сумішей, одержаних у відповідності з заявленим способом

Кількість дослідів у кожному варіанті	Оптична щільність сумішей за варіантами (нм)				
	Хворі на менингококовий менингіт	Хворі на вірусний менингіт	Контроль-на група	Негативний контроль	Позитивний контроль
1	0,840	0,097	0,121	0,058	1,987
2	0,648	0,130	0,097	0,048	1,748
3	0,421	0,143	0,056	0,057	1,697
4	0,327	0,087	0,047	0,087	1,748
5	0,987	0,056	0,068	0,087	1,748
6	1,200	0,087	0,113	0,087	1,748
7	0,641	0,087	0,089	0,087	1,748
8	0,345	0,087	0,074	0,087	1,748
9	0,445	0,087	0,087	0,087	1,748
10	1,818	0,087	0,087	0,087	1,748

Аналіз даних таблиця 1 свідчить, що при діагностуванні гнійного бактеріального менингіту (у досліді - менингококовий менингіт) за заявленим способом оптична щільність одержаних реакційних сумішей вірогідно вище, ніж у варіантах з вірусним менингітом, контрольною групою та негативним контролем, і ближче до даних позитивного контролю. Таким чином, заявлений спосіб дозволяє проводити достовірну діагностику гнійних бактеріальних менингітів, відокремлюючи їх від вірусних менингітів.

Приклад 2

Для кількісного визначення концентрації бактеріальних ендотоксинів у ЦСР хворих скориста-

лися даними оптичної щільності реакційних сумішей у різних варіантах дослідів, наведених у прикладі 1. За даними табл. 1 оптична щільність реакційної суміші для кожного з 10-ти хворих на менингококовий менингіт варіює від 0,327нм до 1,818нм у залежності від концентрації ендотоксинів у ЦСР.

Концентрацію бактеріальних ендотоксинів (пептидогліканів) у ЦСР хворих визначали за калібрувальною кривою, попередньо одержаною при проведенні серії дослідів за заявленим способом при використанні замість ЦСР хворих готового пептидоглікану (Іммафарма, Росія) у концентраціях від 0 до 50пг/мл з встановленням однозначної відповідності між кожним конкретним значенням концентрації пептидоглікану і значенням оптичної щільності суміші, що містить цю кількість пептидоглікану.

Кількісний вміст бактеріальних ендотоксинів (пептидогліканів) визначений за калібрувальною кривою для значень оптичної щільності, одержану у прикладі 1, наведені у таблиці 2.

Таблиця 2

Концентрація бактеріальних ендотоксинів (пептидогліканів) у ЦСР хворих у відповідності з оптичною щільністю реакційних сумішей, одержаних за заявленим способом

Кількість дослідів у кожному варіанті	Концентрація пептидогліканів, пг/мл		
	Хворі на менингококовий менингіт	Хворі на вірусний менингіт	Контрольна група пацієнтів
1	22,6	0,8	1,5
2	17,1	1,8	0,8
3	10,3	2,2	0,0
4	7,7	0,5	0,0
5	26,9	0,0	0,1
6	32,9	0,7	1,1
7	16,8	0,8	0,5
8	8,3	0,5	0,1
9	11,1	0,2	0,5
10	50,4	0,0	0,1

Дані таблиці 2 підтверджують наявність пропорційної залежності між оптичною щільністю реакційної суміші (ступенем забарвлення) і концентрацією бактеріальних ендотоксинів у ЦСР хворого. Дані таблиці 2, одержані при діагностуванні хворих на менингококовий менингіт за заявленим способом, достовірно вищі за дані для хворих на вірусний менингіт та контрольної групи пацієнтів.

Таким чином, заявлено новий спосіб експрес-діагностики гнійних бактеріальних менингітів, який дозволяє достовірно відрізнити бактеріальні менингіти від вірусних і вдвічі скоротити час тест-реакції у порівнянні з прототипом. Заявлений спосіб передбачає використання без додаткової обробки гемоліфи личинок капустиної білянки, яку легко вирощувати у кліматичних умовах України, крім того спосіб дозволяє мінімізувати необхідну для діагностики кількість ЦСР хворого.