



УКРАЇНА

(19) UA (11) 30934 (13) U  
(51) МПК (2006)  
G01N 33/483МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ  
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

## (54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ЕНДОКАРДИТУ СТАФІЛОКОКОВОЇ ЕТІОЛОГІЇ

1

2

(21) а200614013

(22) 28.12.2006

(24) 25.03.2008

(46) 30.12.1899, Бюл.№ , 1899 р.

(72) СЕНЧИЛО НАТАЛІЯ ВАСИЛІВНА, UA, ПОЗУР  
ВОЛОДИМИР КОСТЯНТИНОВИЧ, UA,  
ВОРОБІЙОВА АННА МИХАЙЛІВНА, UA, СКІВКА  
ЛАРИСА МИХАЙЛІВНА, UA, ГРИЦЕНКО  
ЛЮДМИЛА МИХАЙЛІВНА, UA(73) КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА, UA

(56)

(57) Спосіб діагностики ендокардиту  
стафілокової етіології, що включає дослідження  
сироватки крові хворого з використанням антигену  
стафілококів, який відрізняється тим, що як  
антиген використовують тейхоеву кислоту, яку

адсорбують на тверду фазу, блокують вільні місця зв'язування, відмивають систему тверда фаза - антиген від незв'язаного антигену, вносять досліджувані сироватки крові для виявлення гомологічних, первинних, специфічних антитіл, систему відмивають від молекул, що не зв'язалися, вносять антитіла проти імуноглобулінів людини, які мічені пероксидазою хрину для утворення імунного комплексу, відмивають від молекул, що не зв'язалися, вносять розчин хромоген-субстрату для проявлення реакції, зупиняють реакцію внесенням двомолярної сірчаної кислоти, вимірюють оптичну густину одержаного розчину, визначають титр специфічних антитіл, за значенням якого діагностують ендокардит стафілокової етіології.

Корисна модель відноситься до галузі медицини та імунології, а зокрема до імунохімічних методів діагностики і може бути використана для ранньої діагностики ендокардиту стафілокової етіології у хворих різних вікових груп.

В цій галузі прийнято використовувати такі терміни і скорочення:

БСА - бичачий сироватковий альбумін

ІФА - імуноферментний аналіз

ОФД - ортофенілєндіамін

ТФБ - твін-фосфатний буфер

ТК - тейхоева кислота

КС - клітинна стінка

Відомий спосіб діагностики інфекційного ендокардиту, який полягає в біологічному дослідженні крові хворих в поєднанні з мікроскопічним дослідженням відбитків хірургічне видалених клапанних структур серця в сукупності з клінічними ознаками [Микробная обсемененность ангиокардиальных структур больных врожденными пороками сердца /Л.А.Шмерлинг, Г.А. Цветовская, В.В. Литасова, Л.Н. Яснова, М.Ю. Фигурова, И.И. Семенов, В.А. Гросс. Септические эндокардиты в хирургической коррекции пороков сердца. - Новосибирск, 1989. - С. 139 -149].

Недоліком вказаного способу є довготривалий час проведення (4-5 днів), зумовлений використанням декількох методів дослідження: клінічного, мікробіологічного, хірургічного, та його низька чутливість, внаслідок того, що, отримати позитивну гемокультуру практично вдається лише в 45-50% хворих з гострою і у 15-20% з підгострою або в'ялопротікаючою формами інфекційного ендокардиту. А бактеріологічні методи не завжди дозволяють виявити присутність збудника в організмі хворих на інфекційний ендокардит, після попередньо отримуваної ними антибіотикотерапії, що призводить до низької їх чутливості до фарбників трифенілметанового ряду при фарбуванні за Грамом і низького потенційного росту на поживних середовищах. Що не завжди дозволяє обрати правильну тактику лікування і потребує пошуку нових високочутливих методів діагностики інфекційного ендокардиту у хворих.

Відомий спосіб діагностики інфекційного ендокардиту стафілокової етіології, який полягає у клінічному обстеженні з додатковим біологічним дослідженням крові і відбитків враженої тканини клапанних структур серця, з використанням антитіл мічених флюоресціюючими барвниками і антигеном стафілокока (*S. epidemidis* і *S. aureus*) після чого за отриманими результатами судять

(13) U

(11) 30934

(19) UA

про наявність стафілококової інфекції. [Г.М. Воробйова, А.В. Руденко, З.Т. Баланнік, Т.Ю. Шляхтиченко. Спосіб діагностики інфекційного ендокартиту стафілококової етіології. Патент № 97084277. 16.10.2000, Бюл. №5, 2000р.].

Недоліком вказаного способу є довготривалий час його підготовки і проведення, та невисока чутливість, яка становить 87,5-87,9%.

В основу корисної моделі поставлена задача створити спосіб діагностики ендокартиту стафілококової етіології, шляхом виявлення специфічних антитіл до тейхоевої кислоти *Staphylococcus aureus* Wood 46, який би забезпечив можливість експресної діагностики ендокартиту стафілококової етіології, за рахунок скорочення часу його проведення, і мав високу чутливість завдяки використанню імуноферментного аналізу та розробці на його основі тест-системи з оптимальними умовами проведення.

Поставлене завдання вирішується тим, що в способі діагностики ендокартиту стафілококової етіології, який полягає у дослідженні сироватки крові хворих з використанням антигена стафілокока, згідно з корисною моделлю, в якості антигена використовують тейхоеву кислоту, яку адсорбують на тверду фазу, для запобігання неспецифічній реакції, блокують вільні місця зв'язування, відмивають систему тверда-фаза - антиген від незв'язаного антигену, вносять досліджувані сироватки крові для виявлення гомологічних, первинних, специфічних антитіл, систему відмивають від молекул, що не зв'язалися, вносять антитіла проти імуноглобулінів людини, які мічені пероксидазою хрину для утворення імунного комплексу, відмивають від молекул, що незв'язалися, вносять розчин хромоген-субстрата для проявлення реакції, зупиняють реакцію внесенням двох молярної сірчаної кислоти, вимірюють оптичну густину розчину, визначають титр специфічних антитіл, за значенням якого діагностують ендокартит стафілококової етіології.

У здорових осіб, сироватки крові не містять специфічних антитіл, і які відповідно не зв'язали кон'югованих з пероксидазою імуноглобулінів, спостерігаються низькі значення показників оптичної густини, в зв'язку з тим, що відновлення хромоген субстрату відбувається на низькому рівні, тому значення титру специфічних антитіл буде низьким.

При стафілококовому ендокартиті найбільш часто виявляли антитіла до тейхоевої кислоти *Staphylococcus aureus*, яка складає близько 50% маси клітинної стінки і викликає в організмі імунну реакцію, про що свідчить високий рівень антитіл у сироватці крові хворих різних вікових груп, тому визначення антитіл до тейхоевої кислоти має діагностичне значення [Tenenbaum M.J., Gordon A. - South, med. J., 1980, v.73, p. 140-143].

Нами були проаналізовані сироватки хворих на наявність перехресне реагуючих антитіл не лише до тейхоевої кислоти *Staphylococcus aureus*, а й інших видів грампозитивних бактерій, зокрема таких як *Staphylococcus saprophyticus* та *Micrococcus luteus*.

Дослідження показали, що при застосуванні тест-системи на основі тейхоевої кислоти взагалі не виявляли перехресних реакцій до ТК таких бактерій, як *Staphylococcus saprophyticus* та *Micrococcus luteus* у групі хворих на ендокартит, тоді як специфічні антитіла до тейхоевої кислоти *Staphylococcus aureus* були виявлені у 99,0-99,7% обстежених. Тому тест-система є високочутливою, і забезпечує діагностику ендокартиту у 99,0-99,7% хворих.

Таким чином, в результаті отриманих даних щодо розробки та апробації тест-системи для діагностики стафілококового ендокартиту, було виявлено специфічні антитіла до тейхоевої кислоти *Staphylococcus aureus*, а також визначено їх середні та діагностичне значимі титри. Стафілококову етіологію захворювання встановлювали на основі клінічних спостережень, даних анамнезу і підтверджували виділенням *Staphylococcus aureus* з урахуванням його патогенних властивостей.

У даній сукупності ознак з використанням тейхоевої кислоти *Staphylococcus aureus* штаму Wood - 46 та сироватки крові хворого на ендокартит, встановлено, що тейхоева кислота виступає в ролі специфічного діагностикума. Спосіб, що пропонується є експресним і дозволяє проводити ідентифікацію протягом 2,5-3 годин, з моменту одержання сироватки крові хворого. [Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М. Теория и практика иммуноферментного анализа. - М.: Высш.шк., 1991.-288 с.].

Приклад конкретного використання:

У лунки планшета вносили тейхоеву кислоту та інкубували в термостаті протягом 30 хвилин, при температурі 37°C, додавали розчин бичачого сироваткового альбуміну, інкубували протягом 30 хвилин при температурі 37°C, після кожної інкубації планшети відмивали розчином твіну-20 при перемішуванні, вносили досліджувані сироватки крові, розведені у твін-фосфатному буфері, інкубували впродовж 30 хвилин при температурі 37°C, планшети відмивали в описаному вище режимі, вносили антитіла проти імуноглобулінів людини, мічені пероксидазою хрину у робочому розведенні 1:800 (в ТФБ), планшети інкубували протягом години при 37°C, відмивали чотири рази розчином твіну-20 в 3ФР (фізіологічний розчин NaCl забуферений фосфатами), для проявлення реакції в лунки планшета вносили розчин хромоген-субстрата, що містить ортофенілєндиамін і перекис водню, зупиняли реакцію внесенням двох молярної сірчаної кислоти в лунки планшета, вимірювали оптичну густину одержаного розчину, визначали титр специфічних антитіл, який порівнювали з контрольними показниками. Час проведення реакції становив 2,5-3 години.

Специфічні антитіла виявляли у 99,0-99,7% обстежених хворих, що вказує на високу чутливість способу. Стафілококова етіологія захворювання підтверджувалася клінічними спостереженнями, даними анамнезу та мікробіологічним дослідженням крові хворого.

Таким чином, запропонований спосіб діагностики є високочутливим і може бути використаний для експресної діагностики ендокардиту стафілококової етіології.