



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **71362** (13) **U**
(51) МПК
G01N 33/68 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2012 00028	(72) Винахідник(и): Нартов Павло Вікторович (UA), Малий Василь Пантелейович (UA), Якущенко Вікторія Анатоліївна (UA), Кульшин Володимир Євгенович (UA)
(22) Дата подання заявки: 03.01.2012	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.07.2012	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.07.2012, Бюл.№ 13	(73) Власник(и): ХАРКІВСЬКА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ ПІСЛЯДИПЛОМНОЇ ОСВІТИ, вул. Корчагінців, 58, м. Харків, 61176, Україна (UA)

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ГНІЙНИХ БАКТЕРІАЛЬНИХ МЕНІНГІТІВ

(57) Реферат:

Спосіб діагностики гнійних бактеріальних менінгітів з використанням гемолімфи личинок тутового шовкопряду, при якому використовують SLP-реакцію з живим клональним матеріалом личинок тутового шовкопряду та визначають кількісний вміст пептидоглікана ПГ в лікворі хворих на пневмококовий та менінгококовий менінгіт за ступенем забарвлення реакційної суміші, для чого використовують завчасно побудовану калібрувальну криву шляхом послідовного розведення стандартного пептидоглікана з встановленням однозначної відповідності між кожним конкретним значенням концентрації пептидоглікана і значенням оптичної щільності суміші.

UA 71362 U

Корисна модель належить до медицини, а саме до лабораторної діагностики гнійних бактеріальних менінгітів (ГБМ), зокрема з використанням гемолімфи личинок тутового шовкопряду.

Менінгіт - тяжке захворювання, що спричиняє значну кількість залишкових явищ, ускладнень і навіть летальних випадків. Негативний прогноз захворювання корелює із пізньою діагностикою. Цим визначається особлива актуальність ранньої діагностики та госпіталізації хворих менінгітом (1. Венгеров Ю.Я., Нагибина М.В., Мигманов Т.Э. Актуальные проблемы диагностики и лечения бактериальных менингитов // Лечащий врач.-2007. - №9. - С. 31-35. 2. Карпов И.А., Иванов А.С., Юркевич И.В., Кишкурно Е.П., Качанко Е.Ф. Обзор практических рекомендаций по ведению пациентов с бактериальным менингитом Американского общества инфекционных болезней // Клиническая микробиология антимикробная химиотерапия.-2006. - Т.8, №3. - С. 217-242).

За даними ВООЗ, щорічно в світі реєструється 1 млн. випадків гнійних бактеріальних менінгітів, з яких 200 тис. закінчується летально. Показники летальності при гнійних бактеріальних менінгітах в залежності від віку, клінічних форм хвороби і від етіологічного агента в розвинених країнах становлять у середньому 3-19 %, а в країнах, що розвиваються - від 37 до 69 %. Етіологічними агентами гнійних бактеріальних менінгітів можуть бути практично будь-які мікроорганізми, що потрапили через оболонки головного мозку в цереброспинальну рідину, але провідна роль належить трьом мікроорганізмам (*N. meningitidis*, *S. pneumoniae* і *H. influenzae*). Основними збудниками ГБМ в Україні ї є *N. meningitidis* (30 %), *S. pneumoniae* (6 %) і *H. influenzae* (2 %) та 16 % - інші бактерії. Близько 46 % захворювань залишаються не розшифрованими ("Методичні вказівки з мікробіологічної діагностики менінгококової інфекції та гнійних бактеріальних менінгітів", затверджені Наказом МОЗ України №170 від 15.04.2005 р. - Київ, 2005 - 42 а).

Традиційно для лабораторної діагностики використовують метод культивування мікроорганізмів із зразків цереброспинальної рідини (ЦСР) або крові хворого. Залишаючись "золотим стандартом" діагностики, цей метод має серйозні обмеження, обумовлені застосуванням антибактеріальної терапії на догоспітальному етапі. Згідно з даними Центрального Науково-дослідного інституту епідеміології (Росія), в групі хворих, які отримували антибіотики на догоспітальному етапі, бактерії висівалися з ЦСР в 30 % випадків, навпроти, в групі хворих, які не отримали антибіотики, бактерії висівалися як мінімум в 60 % випадків. Крім того, бактеріологічна діагностика займає не менше 48 годин (Платонов А.Е., Шипулина Г.А., Тютюнник Е.М., Платонов О.В. Генодиагностика бактериальных менингитов и генотипирование их возбудителей: Пособие для врачей. - Минздрав России, ЦНИИ эпидемиологии МЗ РФ. - Москва, 2001. - 37 с).

Таким чином, ситуація потребує розробки і застосування "некультуральних" методів діагностики ГБМ.

Провідну роль в патогенезі ГБМ відіграє стимуляція клітин макроорганізму надмірною кількістю бактерій та фрагментів клітинної стінки (ендотоксинів), що надходять в кровоток та ЦСР (Шілов А.С. Гнойный менингит как синдром, клинический маркер генерализации бактериальных инфекций и показатель их тяжести. // Журнал неврологии и психиатрии.-2009 - №5. - С. 92-96).

Клітинна стінка (КС), як уже добре відомо, важливий і обов'язковий структурний елемент переважної більшості клітин. До складу КС бактерій входить пептидоглікан (ПГ), який у грампозитивних бактерій складає основну масу КС (від 40 до 90 %), у грамнегативних - ПГ значно менше (1-10 %).

На жаль, в даний час клінічна практика не має в своєму розпорядженні доступних методів лабораторної діагностики бактеріальних ендотоксинів.

Високочутлива реакція з лізатом крабів роду *Limulus* характеризується не тільки дорожнечою, але і недостатньою специфічністю (взаємодіє тільки з ліпополісахаридом) (Карпов И.А., Иванов А.С., Юркевич И.В., Кишкурно Е.П., Качанко Е.Ф. Обзор практических рекомендаций по ведению пациентов с бактериальным менингитом Американского общества инфекционных болезней // Клиническая микробиология антимикробная химиотерапия.-2006. - Т.8, №3. - С. 217-242).

В світовій практиці відомий спосіб визначення бактеріальних ендотоксинів в ЦСР у хворих на ГБМ із використанням плазми личинок тутового шовкопряду (*Bombix mori* a.), запропонований японськими вченими в 2003 році (Inada K, Takahashi K, Ichinohe S. A silkworm larvae plasma test for detecting peptidoglycan in cerebrospinal fluid is useful for the diagnosis of bacterial meningitis // Microbiol. Immunol.-2003. - № 10, - P. 701-707).

Метод заснований на каскаді реакцій в гемолімфі *B. mori* (silkworm larvae plasma - SLP), викликаним ПГ. SLP - реакція обумовлена наступними причинами. З урахуванням патогенезу

ГБМ у ЦСР хворих присутній пептидоглікан (ПГ), який є компонентом КС грампозитивних і грамнегативних бактерій. Гемолімфа В. торі містить природний фермент профенол-оксидазу, що виступає каталізатором реакції взаємодії ПГ 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 ПГ у ЦСР хворого.

Запропонований авторами SLP-тест був апробований на малій кількості хворих, в дослідженні не було хворих на менінгококовий менінгіт (ММ), збудники якого є основним етіологічним агентом в структурі ГБМ.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалення способу діагностики гнійних бактеріальних менінгітів з використанням гемолімфи личинок тутового шовкопряду, в якому за рахунок зміни клонального матеріалу та проведення SLP-реакції досягається визначення кількісного вмісту ПГ в лікворі хворих на пневмококовий менінгіт та менінгококовий менінгіт. SLP-реакція дозволяє скоротити час діагностики, забезпечує чутливість способу до грампозитивних та грамнегативних мікроорганізмів.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі діагностики гнійних бактеріальних менінгітів з використанням гемолімфи личинок тутового шовкопряду, згідно з корисною моделлю, використовують SLP-реакцію з живим клональним матеріалом личинок тутового шовкопряду та визначають кількісний вміст пептидоглікана ПГ в лікворі хворих на пневмококовий та менінгококовий менінгіт за ступенем забарвлення реакційної суміші, для чого використовують завчасно побудовану калібрувальну криву шляхом послідовного розведення стандартного пептидоглікана з встановленням однозначної відповідності між кожним конкретним значенням концентрації пептидоглікана і значенням оптичної щільності суміші.

Заявлений спосіб передбачає використання клональної популяції В. торі, що мінімізує хибно позитивні результати.

Візуальні зміни забарвлення реакційної суміші вказують на те, що у лікворі хворих циркулює ПГ, який у хворих на ММ, де вміст ПГ незначний, - SLP-тест має високу чутливість. SLP-тест може використовуватися для визначення кількості ПГ у хворих на ГБМ та проведення диференціальної діагностики між грампозитивними та грамнегативними менінгітами.

Заявлений спосіб передбачає використання у тест-реакції плазми личинок тутового шовкопряду (*Bombix mori* a.). Живий клональний матеріал був наданий лабораторією зародкових та стовбурних клітин ХНУ ім. В.Н. Каразіна.

Матеріалом дослідження була ЦСР хворих на пневмококовий та менінгококовий менінгіти, які знаходилися на стаціонарному лікуванні в Обласній клінічній інфекційній лікарні м. Харкова, яка є клінічною базою кафедри інфекційних хвороб медичної академії післядипломної освіти. Хворі були розділені на три групи. У першу групу (15 осіб) входили хворі з ПМ, у яких діагноз був підтверджений бактеріологічним дослідженням та полімеразною ланцюговою реакцією (ПЛР). До другої групи (13 осіб) були відібрані хворі з ММ підтвердженим бактеріологічним та ПЛР дослідженням.

Третю групу склали особи з інтактною ЦСР (контрольна група). Вік хворих коливався в межах від 18 до 43 років. Зразки ЦСР відбирали у об'ємі 0,5 мл при проведенні діагностичної спинномозкової пункції з використанням одноразових пункційних голок і стерильних апірогенних одноразових пробірок для попередження хибно-позитивних результатів.

Забір плазми В. торі проводили у стерильних умовах і до проведення експерименту зберігали під шаром мінерального масла при температурі -20 °С. Зразки ЦСР розводили 0,9 % розчином NaCl у співвідношенні 1:100. До 100 мкл кожного зразку розведеної ЦСР додавали 100 мкл Good's буферу з 10 мкл екзогенного субстрату 3,4-дигідроксифенілаланін (10 мкг/мл) та 10 мкл гемолімфи личинок капусти білянки. Одержану суміш інкубували при +30 °С протягом 60 хвилин. Оптичну щільність проб вимірювали при довжині хвилі 490 нм плашетним фотометром (Tecn, Classic). Для визначення концентрації ПГ у ЦСР хворого за ступенем забарвлення реакційної суміші використовували завчасно побудовану калібрувальну криву шляхом послідовного розведення стандартного ПГ з встановленням однозначної відповідності між кожним конкретним значенням концентрації ПГ і значенням оптичної щільності суміші [Малий В.П., Нартів П.В., Кульшин В.С. Визначення бактеріальних ендотоксинів у лікворі хворих на менінгококовий менінгіт з використанням плазми личинок тутового шовкопряду // Інфекційні хвороби.-2008. - № 2. - С. 24-28].

При проведенні SLP-тесту в ЦСР хворих на ПМ та ММ відбувалось темне забарвлення досліджуваних сумішей, у хворих з інтактним ліквором (контрольна група) забарвлення суміші не відбулося. Візуальні зміни вказують на те, що у лікворі хворих першої та другої групи циркулює ПГ, а в третій групі ПГ відсутній або його концентрація мінімальна.

При госпіталізації в інфекційний стаціонар кількісний вміст ПГ в ЦСР у хворих на ПМ становив $691,1 \pm 58,61$ пг/мл, а в групі з ММ - $133,5 \pm 14,18$ пг/мл, що вірогідно вище показників контрольної групи - $0,47 \pm 0,51$ пг/мл (таблиця).

Таблиця

Концентрація ПГ в лікворі хворих ГБМ в динаміці захворювань ($M \pm m$)

Групи хворих	Кількість хворих	Вміст ПГ в лікворі, пг/мл	
		Гострий період	Період одужання
Пневмококовий менінгіт	15	$691,1 \pm 58,61^{*1}$	$131,3 \pm 28,97^{*1}$
Менінгококовий менінгіт	13	$133,5 \pm 14,18^{*1}$	$44,77 \pm 5,69^1$
Контроль	10	$0,47 \pm 0,51$	

Примітка: 1. * - $p < 0,05$ вірогідність відмінностей з контролем;

2. ¹ - $p < 0,05$ вірогідність відмінностей в порівняльних групах.

5

Згідно з даними табл., вміст ПГ в лікворі хворих ПМ у період одужання склав $131,3 \pm 28,97$ пг/мл, а середній показник ПГ у групі ММ був на рівні $44,77 \pm 5,69$ пг/мл, що перевищило ($p < 0,05$) контрольні величини. У гострий період та період одужання, а також у динаміці захворювання концентрація досліджуваного ендотоксину в ЦСЖ хворих ПМ була статистично вище, ніж у групі ММ. Таким чином, в ЦСР у хворих на ММ, де вміст ПГ незначний, - SLP-тест має високу чутливість. SLP-тест може використовуватися для визначення кількості ПГ у хворих на ГБМ та проведення диференціальної діагностики між грампозитивними та грамнегативними ГБМ, методом моніторингу ефективності антибактеріальної терапії.

Корисна модель ілюструється прикладами.

15

Приклад 1. Хворий М., 24 р., знаходився на лікуванні в клініці інфекційних хвороб Харківської медичної академії післядипломної освіти з діагнозом: гострий гнійний пневмококовий менінгіт (із ЦСР виділений *Streptococcus pneumoniae*).

10

Був прийнятий до стаціонару на 2-й день хвороби зі скаргами на головний біль у лобній ділянці, світлобоязнь, загальну слабкість, повторну блювоту, підвищення температури тіла до 39°C . В анамнезі черепно-мозкова травма.

20

При об'єктивному дослідженні стан хворого середньої тяжкості. Свідомість ясна. Хворий трохи в'ялий, адинамічний. Аускультативно в легенях вислуховується жорстке дихання, хрипів немає. Тони серця звучні, ритмічні. АУТ $125/85$ мм рт. ст., пульс 80 ударів/хв., ритмічний, задовільної якості. Менінгеальні знаки: визначається ригідність м'язів потилиці, позитивні симптом Керніга та верхній симптом Брудзинського.

25

Додаткові дослідження:

Аналіз ЦСР: мутний, з зеленуватим відтінком, білок - $0,8$ г/л, цитоз - $558 \cdot 10^6$ /л: нейтрофіли - 98% ; цукор - $3,1$ ммоль/л, хлориди - $125,0$ ммоль/л.

30

Аналіз крові клінічний: еритроцити $4,0 \cdot 10^{12}$ /л, гемоглобін - 130 г/л, КР - $0,9$; лейкоцити - $11,0 \cdot 10^9$ %, пал. - 7% , сегм. - 70% , лімф. - 20% , мон. - 3% , ШОЕ - 20 мм/ч.

Бактеріоскопія товстої краплі крові - збудник не знайдено.

Бактеріоскопія ЦСР - збудник не знайдено.

SLP-тест ЦСР - позитивний (темне забарвлення, вміст ПГ $837,2$ пг/мл).

35

Бактеріологічне дослідження ліквору - виділений *Streptococcus pneumoniae*. (на четвертий день госпіталізації).

Приклад 2. Хвора Ю., 47 р., знаходилась на лікуванні в клініці інфекційних хвороб Харківської медичної академії післядипломної освіти з діагнозом: гострий гнійний менінгококовий менінгіт (із ЦСР та крові - виділена *Neisseria meningitidis*).

40

Була прийнята до стаціонару на 4-й день хвороби зі скаргами на головний біль у лобно-скроневій ділянці, загальну слабкість, нудоту, повторну блювоту, підвищення температури тіла до 39°C .

Епідеміологічний анамнез: мав місце контакт з хворим на гостре респіраторне захворювання.

45

При об'єктивному дослідженні стан хворої середньої тяжкості. Свідомість ясна. Аускультативно в легенях вислуховується везикулярне дихання, хрипів немає. Тони серця приглушені, ритмічні. А/Т $140/90$ мм рт. ст., пульс 90 ударів/хв., ритмічний, задовільної якості. Менінгеальні знаки: визначається ригідність м'язів потилиці, позитивний симптом Керніга.

Додаткові дослідження:

Аналіз ЦСР: мутний, білуватий, білок - 0,6 г/л, цитоз – $1080 \cdot 10^6$ /л: нейтрофіли - 90 %; цукор - 2,8 ммоль/л, хлориди - 133,0 ммоль/л.

5 Аналіз крові клінічний: еритроцити $3,5 \cdot 10^{12}$ /л, гемоглобін - 120 г/л, КП - 0,9; лейкоцити - $13,0 \cdot 10^9$ /л, пал. - 6 %, сегм. - 76 %, лімф. - 16 %, мон. - 2 %, ШОЕ - 25мм/ч.

Бактеріоскопія товстої краплі крові - збудник не знайдено.

Бактеріоскопія ЦСР - виявлена кокова флора.

SLP-тест ЦСР - позитивний (темне забарвлення, вміст ПГ 98,7 пг/мл).

10 Бактеріологічне дослідження крові - виявлено *Neisseria meningitidis* (четвертий день госпіталізації).

Бактеріологічне дослідження ЦСР - виявлено *Neisseria meningitidis* (п'ятий день госпіталізації).

Таким чином, заявлено новий спосіб діагностики ГБМ, який дозволяє достовірно діагностувати не тільки ПМ (грампозитивний), а також ММ (грамнегативний).

15

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб діагностики гнійних бактеріальних менінгітів з використанням гемолімфи личинок тутового шовкопряда, який **відрізняється** тим, що використовують SLP-реакцію з живим клональним матеріалом личинок тутового шовкопряда та визначають кількісний вміст пептидоглікана ПГ в лікворі хворих на пневмококовий та менінгококовий менінгіт за ступенем забарвлення реакційної суміші, для чого використовують завчасно побудовану калібрувальну криву шляхом послідовного розведення стандартного пептидоглікана з встановленням однозначної відповідності між кожним конкретним значенням концентрації пептидоглікана і значенням оптичної щільності суміші.

20

25

Комп'ютерна верстка М. Ломалова

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601