

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

It has been marked that only the complex diagnostical approach with taking into account anamnestic (antenatal and perinatal anamnesis), clinical and serological data of the child and mother makes possible the timely diagnostics of intrauterine

infection and high levels of anti-CMV IgG in patients' blood can't be used as the principle parameter of CMV infectioning.

Key words: cytomegalovirus, pregnancy, fetus, infants.

© Малий В.П., Нартов П.В., Кульшин В.Є., 2008
УДК 616.831.9-002.3-07:577.213.3

В.П. Малий, П.В. Нартов, В.Є. Кульшин

ВИЗНАЧЕННЯ БАКТЕРІЙНИХ ЕНДОТОКСИНІВ У ЛІКВОРИ ХВОРИХ НА МЕНІНГОКОКОВИЙ МЕНІНГІТ З ВИКОРИСТАННЯМ ПЛАЗМИ ЛИЧИНОК ТУТОВОГО ШОВКОПРЯДУ

Харківська медична академія післядипломної освіти

Експрес-діагностика менінгококового менінгіту ґрунтується на каскаді реакцій у плазмі личинок тутового шовкопряду (Bombyx mori), викликаних пептидогліканом. Основний фермент цього каскаду профенон-оксидаза каталізує реакцію перетворення екзогенного субстрату 3,4-дигідроксифенілаланін у меланін. Активність ферменту пропорційна концентрації пептидоглікану.

Ключові слова: клітинна стінка, гнійний бактерійний менінгіт, менінгококовий менінгіт, плазма личинок тутового шовкопряду, пептидоглікан.

Провідну роль у патогенезі гнійних бактерійних менінгітів (ГБМ) відіграє стимуляція клітин макроорганізму надмірною кількістю бактерій та фрагментів клітинної стінки (ендотоксинів), що надходять у кровоплин і цереброспінальну рідину (ЦСР) [1-3].

Клітинна стінка (КС), як уже добре відомо, є важливим і обов'язковим структурним елементом більшості прокариотних клітин. На частку клітинної стінки припадає від 5 до 50 % сухих речовин клітини. КС грампозитивних і грамотрибутивних бактерій різко відрізняються за хімічним складом. До складу КС бактерій входить 7 різних груп хімічних речовин, при цьому пептидоглікан (ПГ) присутній тільки в КС. У грампозитивних бактерій він становить основну масу речовини КС (від 40 до 90 %), у

грамнегативних – вміст ПГ значно менший (1-10 %) [4].

ПГ – специфічний гетерополімер, який побудований із залишків N-ацетилглюкозаміну і N-ацетилмурамової кислоти, сполучених між собою за допомогою β -1,4-глікозидних зв'язків, що чергуються. До N-ацетилмурамової кислоти приєднаний короткий пептидний хвіст, що складається з невеликого числа (зазвичай 4-5) амінокислот. В еубактерій (істинні бактерії) знайдено більше 100 різних хімічних типів ПГ. Більшість відмінностей належить до пептидної частини його молекули [4].

У грамотрибутивних еубактерій будова КС набагато складніша, ніж у грампозитивних (мал. 1). ПГ утворює тільки внутрішній шар КС, нещільно прилягаючи до цитоплазматичної мембрани. Хімічна структура ПГ грамотрибутивних еубактерій в основному схожа із структурою типового ПГ грампозитивних еубактерій.

На жаль, у даний час клінічна практика не має в своєму розпорядженні доступних методів лабораторної діагностики бактерійних ендотоксинів. Високочутлива реакція з лізатом крабів роду *Limulus* характеризується не тільки дорожнечою, але й недостатньою специфічністю (взаємодіє тільки з ліпополісахаридом) [5].

У світовій практиці відомий спосіб визначення бактерійних ендотоксинів в ЦСР у хворих на ГБМ

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

із використанням плазми личинок тутового шовкопряду (*Bombyx mori a.*), запропонований японськими вченими в 2003 р. [5]. Метод заснований на каскаді реакцій у гемолімфі *B. mori (silkworm larvae plasma – SLP)*, викликаним ПГ (мал. 2). SLP-реакція обумовлена наступними причинами. З урахуванням патогенезу ГБМ у ЦСР хворих є ПГ, який є компонентом КС грампозитивних і грамнегативних бактерій. Гемолімфа *B. mori* містить природний фермент профенол-оксидазу, що виступає каталізатором реакції взаємодії ПГ з екзогенним субстратом 3,4-дигідроксифенілаланіном з утворенням меланіну, який під час інкубації забарвлює реакційну суміш у темний колір. Активність ферменту, а отже й ступінь забарвлення, пропорційна концентрації ПГ у ЦСР хворого. Реакція специфічна для грампозитивних і грамнегативних бактерій.

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

Мета дослідження – оцінити чутливість нового способу експрес-діагностики ММ шляхом використання плазми личинок тутового шовкопряду.

Матеріали і методи

Матеріалом дослідження була ЦСР хворих на менінгококовий та герпетичний (HSV 1, 2) менінгіти, які перебували на стаціонарному лікуванні в обласній клінічній інфекційній лікарні м. Харкова, яка є клінічною базою кафедри інфекційних хвороб медичної академії післядипломної освіти. Пацієнти були розділені на три групи по 10 осіб. У першу групу входили хворі з менінгоковим менінгітом, у яких діагноз був підтверджений бактеріологічним дослідженням та полімеразною ланцюговою реакцією (ПЛР). До другої групи були відібрані хворі з герпетичним менінгітом (ГМ), підтвердженим серологічним методом та ПЛР. Третю групу склали особи з інтактною ЦСР (контрольна група). Вік хворих коливався в межах від 18 до 43 років. Зразки ЦСР відбирали в об'ємі 0,5 мл при проведенні діагностичної спинномозкової пункції з використанням одноразових пункційних голок і стерильних апірогенних одноразових пробірок для запобігання несправжньо-позитивних результатів.

Плазму *B. mori* забирали у стерильних умовах і до експерименту зберігали під шаром мінеральної олії при температурі -20 °С. Зразки ЦСР розводили 0,9 % розчином NaCl у співвідношенні 1:100. До 100 мкл кожного зразка розведеної ЦСР додавали 100 мкл Good's буферу з 10 мкл екзогенного субстрату 3,4-дигідрокси-

фенілаланін (10 мкг/мл) та 10 мкл гемолімфи личинок капустиної білянки. Одержану суміш інкубували при 30 °С протягом 60 хв. Оптичну щільність проб вимірювали при довжині хвилі 490 нм планшетним фотометром (*Tecan, Classic*). Додатково проводили два контрольних досліди, коли замість розведеної ЦСР до реакційної суміші додавали 0,9 % розчин хлориду натрію без вмісту ПГ (негативний контроль) та розчин стандартного ПГ (Імафарма, Росія) – 10 пг/мл (позитивний контроль). Для визначення концентрації ПГ у ЦСР хворого за ступенем забарвлення реакційної суміші використовували одночасно побудовану калібрувальну криву шляхом послідовного розведення стандартного ПГ з встановленням однозначної відповідності між кожним конкретним значенням концентрації ПГ і значенням оптичної щільності суміші.

Живий клональний матеріал був наданий завідувачем лабораторії зародкових і стовбурних клітин ХНУ ім. В.Н. Каразіна професором В. Клименком.

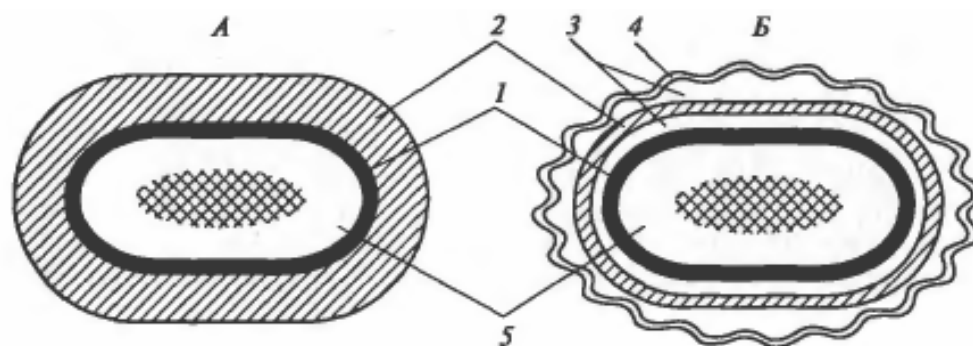
Результати досліджень та їх обговорення

При проведенні SLP-тесту в ЦСР хворих на ММ та в позитивному контролі відбувалось темне забарвлення досліджуваних сумішей. У варіантах з хворими на ГМ, пацієнтів з інтактним ліквором і негативним контролем суміші не забарвлювались. Візуальні зміни вказують на те, що у лікворі хворих першої групи циркулює ПГ, а у другій групі ПГ відсутній або його концентрація мінімальна.

Аналіз даних оптичної щільності реакційних сумішей (табл. 1) свідчить, що у хворих на ММ цей показник становив $(0,687 \pm 0,320)$ нм і був вірогідно ($P < 0,05$) вищим, ніж у варіантах з ГМ – $(0,091 \pm 0,020)$ нм, контрольною групою – $(0,083 \pm 0,023)$ нм, негативним контролем – $(0,077 \pm 0,02)$ нм та з тенденцією до даних позитивного контролю. Виявлені показники оптичної щільності у хворих на ММ варіювали від 0,327 до 1,218 нм і залежали від ПГ у ЦСР.

Концентрацію ПГ в ЦСР у хворих на ММ, ГМ та з інтактним ліквором визначали за калібрувальною кривою, скориставшись даними оптичної щільності у різних варіантах дослідів, наведених у таблиці 1. Кількісний вміст ПГ в ЦСР у хворих на ММ склав $(15,35 \pm 6,89)$ пг/мл, що вірогідно ($P < 0,05$) вище, ніж показники ПГ у пацієнтів з ГМ – $(0,92 \pm 0,52)$ пг/мл та із середніми показниками в контрольній групі – $(0,47 \pm 0,51)$ пг/мл (табл. 2). Отримані результати підтверджують наявність пропорційної залежності між оптичною щільністю реакційної суміші (ступенем забарвлення) і концентрацією ПГ у ЦСР хворого.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ



Мал. 1. Клітинна стінка грамполозитивних (А) і грамнегативних (Б) бактерій:
 1 – цитоплазматична мембрана; 2 – пептидоглікан; 3 – периплазматичний простір; 4 – зовнішня мембрана;
 5 - цитоплазма, в центрі якої знаходиться ДНК.



Мал. 2. Каскад реакцій SLP (K. Inada et al., 2003)

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Таблиця 1

Значення оптичної щільності досліджуваних проб

Кількість дослідів у кожному варіанті	Оптична щільність сумішей за варіантами (нм)				
	Хворі на ММ	Хворі на ГМ	Контрольна група	Негативний контроль	Позитивний контроль
1	0,740	0,095	0,121	0,058	1,987
2	0,648	0,123	0,097	0,048	1,748
3	0,421	0,143	0,056	0,057	1,697
4	0,327	0,085	0,047	0,087	1,748
5	0,987	0,066	0,068	0,087	1,748
6	1,100	0,064	0,113	0,087	1,748
7	0,641	0,077	0,089	0,087	1,748
8	0,345	0,085	0,074	0,087	1,748
9	0,445	0,074	0,087	0,087	1,748
10	1,218	0,093	0,087	0,087	1,748

Таблиця 2

Концентрація ПГ у ЦСР хворих на ММ та ГМ відповідно до оптичної щільності реакційних сумішей

Кількість дослідів у кожному варіанті	Концентрація ПГ, пг/мл		
	Хворі на ММ	Хворі на ГМ	Контрольна група пацієнтів
1	17,1	0,9	1,5
2	9,2	1,7	0,8
3	12,3	2,0	0,0
4	7,7	0,7	0,0
5	20,7	0,5	0,1
6	21,4	0,5	1,1
7	16,8	0,6	0,5
8	11,1	0,7	0,1
9	8,3	0,6	0,5
10	28,9	1,0	0,1

Таким чином, SLP-тест має суттєві переваги порівняно з іншими методами діагностики: відносна простота аналізу, невисока вартість, надійність і швидкість отримання результатів, специфічність і висока чутливість в ЦСР у хворих на ММ, де вміст ПГ незначний. Великі надії ми покладемо на можливість використання цього тесту в клінічній практиці для ранньої діагностики гострих менінгітів, коли принципово не стільки точне визначення збудника, скільки встановлення самого факту бактерійного існування.

Висновки

1. SLP-тест є швидким і надійним методом раннього виявлення ПГ у лікворі хворих на ММ.

2. SLP-тест може використовуватися для визначення кількості грампозитивних і грамнегативних бактерійних ендотоксинів (показник тяжкості) та диференційної діагностики з вірусними менінгітами.

3. SLP-тест може бути методом моніторингу ефективності антибактерійної терапії хворих на ГБМ.

Література

1. Сорокина М.Н., Иванова В.В., Скрипченко Н.В. Бактериальные менингиты у детей. – М.: Медицина, 2003. – 320 с.
2. Лобзин Ю.В., Пилипенко В.В., Громько Ю.Н. Менингиты и энцефалиты. – СПб: Фолиант, 2003. – 128 с.
3. Цинзерлинг В.А., Чухловина М.Л. Инфекционные поражения нервной системы: вопросы этиологии, патогенеза и

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

діагностики: Руководство для врачей многопрофильных стационаров. – СПб: «ЭЛБИ-СПб», 2005. – 448 с.

4. Гусев М.В., Минева Л.А. Микробиология. – Москва: Академия, 2003. – 464 с

5. 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. – V. 47, N 10. – P. 701-707.

DETECTING rF BACTERIAL ENKkTxXINS IN PATIENTS WITH MENINGkCkCCAL MENINGITIS WITH USING SILKWkRM LARVAE PLASMA

V.P. Maly, P.V. Nartov, V.Ye. Kulshyn

SUMMARY. Express-method of meningococcal meningitis diagnostics is based on plasma cascade

reactions in silkworm larvae (*Bombyx mori*) caused by peptidoglycan. The basic enzyme of this cascade prophenol oxidase activates the reaction of exogenous substrate 3,4-dihydroxyphenilalanine transformation into melanin. Activity of enzyme is proportional to concentration of peptidoglycan.

Key words: cellular wall, purulent bacterial meningitis, meningococcal meningitis, silkworm larvae plasma, peptidoglycan.

© Зінчук О.М., 2008
УДК 616.995.42-02-036.22-07-08

О.М. Зінчук

ВИЯВЛЕННЯ ЛАЙМ-БОРЕЛІОЗУ СЕРЕД ХВОРИХ НА РЕАКТИВНИЙ АРТРИТ: КЛІНІЧНІ ТА ДІАГНОСТИЧНІ АСПЕКТИ

Національний медичний університет ім. Данила Галицького, м. Львів

Метою дослідження було вивчення поширеності Лайм-бореліозу серед хворих ревматологічних стаціонарів. У 15,3 % хворих з діагнозом реактивний артрит виявлено діагностичний рівень антитіл класу IgG до борелій. Висвітлені питання клінічної диференційної діагностики Лайм-артриту і реактивного артриту. Рекомендовано виявляти протибореліозні антитіла в ІФА хворих з реактивним артритом, проявами суглобового синдрому нез'ясованого генезу, особливо за наявності відповідного епідеміологічного анамнезу.

Ключові слова: Лайм-бореліоз, кліщі, борелії, суглоби, реактивний артрит.

Ураження опорно-рухового апарату, зокрема суглобів, на початку III тисячоліття є серйозною медичною проблемою з огляду на широке поширення, часту причину тимчасової втрати праце-

здатності та інвалідності. Серед етіологічних факторів, що спричиняють ураження суглобів, часті мікробні агенти, які здатні безпосередньо уражати суглоби, а також індукувати імунопатологічні процеси.

Лайм-бореліоз (ЛБ) – ендемічна трансмісивна хвороба, збудником якої є *Borrelia burgdorferi*, а переносником – іксодові кліщі. Поряд з ураженням шкіри та нервової системи, ураження суглобів є одним з типових органних проявів ЛБ і може реєструватися як у ранній, так і в пізній період хвороби [1]. Лайм-артрит (ЛА) був першою клінічною формою, з якої почалось вивчення ЛБ як окремої нозологічної форми ще до відкриття збудника хвороби [2].

В Україні сформовані стійкі ендемічні ландшафтні зони бореліозу, у прилеглих до них на-