УДК 616.831.9–002.3–07

ЯКІСНЕ І КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ПЕПТИДОГЛІКАНУ У ХВОРИХ НА ГНІЙНІ БАКТЕРІАЛЬНІ МЕНІНГІТИ ЗА ДОПОМОГОЮ ПЛАЗМИ ЛИЧИНОК ТУТОВОГО ШОВКОПРЯДУ

Д-р мед. наук П. В. НАРТОВ

Харківська медична академія післядипломної освіти, Україна

Виявлено візуальні зміни та встановлено кількісні показники пептидоглікану у цереброспінальній рідині хворих на гострі менінгіти за допомогою реакції із застосуванням плазми личинок тутового шовкопряду. Якісне і кількісне визначення пептидоглікану в цереброспінальній рідині є перспективним для ранньої та диференціальної діагностики гострих менінгітів різної етіології.

Ключові слова: пептидоглікан, плазма личинок тутового шовкопряду, цереброспінальна рідина, гострий бактеріальний менінгіт.

www.imj.kh.ua

Актуальність проблеми гнійних бактеріальних менінгітів (ГБМ) обумовлена високою частотою тяжких форм, значною летальністю, незадовільними віддаленими наслідками. Етіологічними чинниками ГБМ можуть бути практично будь-які мікроорганізми, що потрапили через гематоенцефалічний бар'єр у цереброспінальну рідину (ЦСР), але до 85–90 % від загального числа підтверджених випадків захворювання спричинені трьома збудниками: *Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae* і *Haemophilus influenzae* типу b. Якщо клінічна діагностика ГБМ майже не викликає труднощів, то визначення збудника захворювання майже в 46 % випадках залишається неідентифікованим, а своєчасне встановлення бактеріальної природи гострого менінгіту (ГМ) є необхідною умовою для вибору етіотропної терапії [1–3].

Механізм патогенезу ГБМ досить складний, а за даними останніх досліджень в його формуванні провідну роль відіграє стимуляція клітин макроорганізму надмірною кількістю бактерій та фрагментів клітинної стінки, що призводить до змін інтратекального гомеостазу [4, 5].

Клітинна стінка (КС) грампозитивних (Гр «+») та грамнегативних (Гр «–») бактерій становить від 5 до 50 % сухого залишку клітини, включає до свого складу пептидоглікан (ПГ), який у Гр «+» бактерій акумулює основну масу КС (від 40 до 90 %), а у Гр «–» вміст ПГ значно менший (1–10 %) [6, 7].

У світовій практиці відомий спосіб визначення ПГ у ЦСР хворих на ГБМ із використанням плазми личинок тутового шовкопряду (*Bombix mori* α.), запропонований японськими вченими в 2003 р. [8]. Метод заснований на каскаді реакцій в гемолімфі *B. mori* (silkworm larvae plasma – SLP), викликаних ПГ. SLP-реакція обумовлена наступними причинами. Гемолімфа *B. mori* містить природний фермент профенолоксидазу, що виступає каталізатором реакції взаємодії ПГ з екзогенним субстратом 3,4-дигідроксифенілаланіном з утворенням меланіну (рис. 1), який при проведенні інкубації забарвлює реакційну суміш (РС) 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, а також у дослідженні не було пацієнтів на менінгококовий менінгіт (ММ), збудники якого є основним етіологічним агентом ГБМ.

Метою роботи є створення біологічного методу для якісного та кількісного визначення ПГ у хворих на ГБМ із використанням гемолімфи *B. mori*.

Рис. 1. Якісний варіант SLP-тесту

© П. В. НАРТОВ, 2015

У дослідженні брали участь 48 хворих на ГМ різної етіології. Пацієнти були розділені на чотири групи: до першої входили 15 хворих на пневмококовий менінгіт (ПМ), до другої — 13 хворих на ММ, до третьої — 10 хворих на гострий вірусний менінгіт (ГВМ). Четверту групу становили 10 осіб із синдромом «менінгізм», у яких ЦСР була інтактною (контрольна група). Діагноз захворювання був верифікований на підставі клініко-ліквородогічних, бактеріологічних, серологічних і молекулярно-генетичних досліджень.

Забір плазми личинок тутового шовкопряду відбувався у стерильних умовах. До проведення експерименту плазму личинок зберігали під шаром мінеральної олії при температурі –20 °С. Зразки ЦСР розводили 0,9 %-вим 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-дигідроксифенілаланіну (10 мкг/мл) та 10 мкл гемолімфи личинок тутового шовкопряду. 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 РС додавали 0,9 %-вий розчин NaCl без вмісту ПГ (негативний контроль) та розчин стандартного ПГ (Імафарма, Росія) — 10 пг/мл (позитивний контроль). У негативному контролі суміш була безбарвною, а у позитивному контролі відбувалось темне забарвлення. Для визначення концентрації ендотоксину у ЦСР за ступенем забарвлення РС використовували завчасно побудовану калібрувальну криву шляхом послідовного розведення стандартного ПГ із встановленням однозначної відповідності між кожним конкретним значенням концентрації ПГ і оптичної щільності суміші [7]. Жива клональна «популяція» з елітних *B. mori* була надана лабораторією зародкових та стовбурних клітин Харківського національного університету ім. В. Н. Каразіна.

При проведенні SLP-тесту з ЦСР хворих на ПМ та ММ відбувалося темне забарвлення досліджених сумішей, а у пацієнтів із ГВМ та контрольної групи забарвлення сумішей не відбулося (рис. 2).

Як свідчать результати SJP-тесту (рис. 2), візуальні зміни вказують на те, що у ЦСР хворих першої та другої груп був присутній ПГ (відрізнити

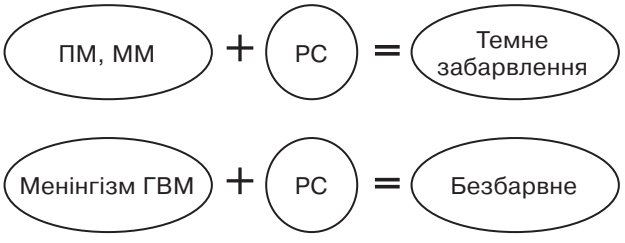

Рис. 2. Якісний результат SLP-тесту у хворих на гострий менінгіт

Концентрація пептидогліканів у цереброспінальній рідині хворих на гнійний бактеріальний менінгіт у динаміці захворювання (M±m)

Група	Кількість хворих	Вміст ПГ у ЦСР, пг/мл	
		гострий період	період одужання
Перша	15	691,1±58,61*[1]	131,3±28,97*[1]
Друга	13	133,5±14,18*[1]	44,77±5,69[1]
Контроль	10	0,47±0,51	

* Різниця з контрольною групою достовірна ($p < 0,05$);
[1] різниця достовірна між першою і другою групами ($p < 0,05$).

за інтенсивністю забарвлення ПМ від ММ було неможливо), а в третій та четвертій групах ендотоксин був відсутній або його концентрація була мінімальною.

Кількісний вміст ПГ (таблиця) у ЦСР хворих на ПМ при госпіталізації в інфекційний стаціонар становив 691,1±58,61 пг/мл, а в групі з ММ — 133,5±14,18 пг/мл. Ці показники достовірно відрізнялись від результатів контрольної групи — 0,47±0,51 пг/мл ($p < 0,05$). Концентрація ПГ у ЦСР пацієнтів із ПМ була в 5,2 разу вищою, ніж у хворих на ММ.

Рівень ПГ у ЦСР хворих першої групи в період одужання становив 131,3±28,97 пг/мл, а середній показник ендотоксину у другій групі — 44,77±5,69 пг/мл, що достовірно вище контрольних показників ($p < 0,05$). Отримані результати підтверджують більшу кількість ПГ у хворих на ПМ (Гр «+»), ніж на ММ (Гр «–»), що не суперечить літературним даним [4]. При порівнянні середніх значень ПГ у гострому періоді хвороби та реконвалесценції було виявлено, що під впливом терапії зазначено достовірне зниження ПГ: у хворих на ПМ у 5,3 разу, а пацієнтів із ММ — у 2,9 разу. Однак, незважаючи на позитивну динаміку, повної елімінації ендотоксину не відзначено. Ці дані можуть свідчити про те, що однією із причин підвищеного цитозу, що зберігається після закінчення антибактеріальної терапії у хворих на ГБМ, є наявність ПГ у ЦСР.

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 у ЦСР хворих на ММ, де вміст ПГ незначний. На користь впровадження в клінічну практику інноваційної ідеї свідчить наявність в Україні Інституту шовківництва Української академії аграрних наук, де вирощують тутового шовкопряда, тобто спрощується питання отримання сировини.

Якісний та кількісний SLP-тест можна використовувати для ранньої діагностики та диференціальної діагностики ГМ різної етіології для моніторингу ефективності антибактеріальної терапії у хворих на ГБМ.

www.imj.kh.ua

Список літератури

1. *Венгеров Ю. Я.* Актуальные проблемы диагностики и лечения бактериальных менингитов / Ю. Я. Венгеров, М. В. Нагибина, Т. Э. Мигманов // Лечащий врач.— 2007.— № 9.— С. 31–35.
2. Results of a multicenter survey of diagnosis and treatment for bacterial meningitis in Japan / H. Sakata, Y. Sato, M. Nonoyama [et al.] // J. Infect. Chemother.— 2010.— Vol. 16, № 6.— P. 396–406.
3. *Schut E. S.* Community-acquired bacterial meningitis in adults / E. S. Schut, J. de Gans, D. van de Beek // Pract. Neurol.— 2008.— № 1.— P. 8–23.
4. Менингиты и энцефалиты / Ю. В. Лобзин, К. В. Жданов, В. М. Волжанин, Д. А. Гусев.— СПб.: Фолиант, 2006.— 128 с.
5. *Brouwer M. C.* Epidemiology, diagnosis, and antimicrobial treatment of acute bacterial meningitis / M. C. Brouwer, A. R. Tunkel. D. van de Beek // Clin. Microbiol. Rev.— 2010.— Vol. 23, № 3.— P. 467–492.
6. *Варбанец Л. Д.* Методы исследования эндотоксинов / Л. Д. Варбанец, Г. М. Здоровенко, Ю. А. Книрель; под ред. В. С. Подгорского.— К.: Наукова думка, 2006.— 250 с.
7. *Малий В. П.* Визначення бактерійних ендотоксинів у лікворі хворих на менінгококовий менінгіт з використанням плазми личинок тутового шовкопряду / В. П. Малий, П. В. Нартов, В. Є. Кульшин // Інфекційні хвороби.— 2008.— № 2.— С. 24–28.
8. A silkworm larvae plasma test for detecting peptidoglycan in cerebrospinal fluid is useful for the diagnosis of bacterial meningitis / K. Inada, K. Takahashi, S. Ichinohe [et al.] // Microbiol. Immunol.— 2003.— Vol. 47, № 10.— P. 701–707.

КАЧЕСТВЕННОЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕПТИДОГЛИКАНА У БОЛЬНЫХ ГНОЙНЫМИ БАКТЕРИАЛЬНЫМИ МЕНИНГИТАМИ С ПОМОЩЬЮ ПЛАЗМЫ ЛИЧИНОК ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА

П. В. НАРТОВ

Выявлены визуальные изменения и установлены количественные показатели пептидогликана в цереброспинальной жидкости больных острыми менингитами с помощью реакции с использованием плазмы личинок тутового шелкопряда. Качественное и количественное определение пептидогликана в цереброспинальной жидкости перспективно для ранней и дифференциальной диагностики острых менингитов различной этиологии.

Ключевые слова: пептидогликан, плазма личинок тутового шелкопряда, цереброспинальная жидкость, острый бактериальный менингит.

www.imj.kh.ua

QUALITATIVE AND QUANTITATIVE DETERMINING OF PEPTIDOGLYCAN IN PATIENTS WITH PURULENT BACTERIAL MENINGITIS BY PLASMA OF SILKWORM LARVAE

V. P. NARTOV

Visual changes and quantitative indicators of peptidoglycan in the cerebrospinal fluid of patients with acute meningitis were revealed by reaction with plasma of silkworm larvae. Qualitative and quantitative determining of peptidoglycan in the cerebrospinal fluid is promising for early diagnosis and differential diagnosis of acute meningitis of different etiologies.

Key words: peptidoglycan, plasma of silkworm larvae, cerebrospinal fluid, acute bacterial meningitis.

Надійшла 26.05.2015