

*Семенов В.М., Зенькова С.К., Васильева М.А., Кубраков К.М.,
Скворцова В.В., Дмитраченко Т.И., Веремей И.С., Жильцов И.В.,
Семенов С.В.*

НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ В ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ПОРАЖЕНИЙ ЦНС ИНФЕКЦИОННОЙ ЭТИОЛОГИИ

УО «Витебский государственный медицинский университет»,
Витебск, Республика Беларусь

Актуальность. Продукция D-лактата, существующего в организме человека в виде двух оптических изомеров из-за его ассиметричного C₂ атома: D (правовращающего) и L (левовращающего), находится на очень низком уровне [2,5]. Значительное повышение его концентрации в стерильных жидкостях организма говорит об общей или локальной бактериальной инфекции [4]. Ряд исследователей полагают, что определение концентрации D-лактата в асцитической, плевральной, цереброспинальной и синовиальной жидкости может служить высокоспецифичным и чувствительным методом для ранней диагностики бактериальной инфекции [1, 2, 3].

Для определения концентрации D-лактата в биологических жидкостях чаще всего используют энзиматический метод в формате конечной точки. Подробно описаны варианты определения с депротеинизацией биоматериала и без таковой. Основной принцип основан на ферментативном превращении D-лактата в пируват с помощью D-лактатдегидрогеназы и спектрофотометрическом определении стехиометрически выделившегося NADH. Поскольку реакция обратима, пируват выводят из системы реакцией переаминирования с помощью GPT. Данная химико-аналитическая стратегия реализована в коммерческих наборах таких крупных мировых корпораций, как Roche и др. Однако данный метод имеет ряд существенных ограничений. Молярный показатель поглощения аналитической мишени невысокий (6300), что в значительной степени сказывается на чувствительности методики и, соответственно, снижает вариабельность пробоподготовки. Определение проводится в ближней ультрафиолетовой области (при 340 нм), что затрудняет перевод методики на планшетный ридер, поскольку пластик полистирольного иммунологического планшета тоже поглощает в этом диапазоне. Более того, далеко не каждый иммуноферментный анализатор имеет светофильтр 340 нм. Спектры поглощения NADH и NAD перекрываются, что, в свою очередь, вносит значительный элемент неопределенности в методику. Поэтому производители наборов, в

основе которых использован данный метод, трактуют предел обнаружения как концентрацию D-лактата при изменении оптической плотности на 0,005 или 0,010 единиц (Magazyme), или же указывают его только в конечном анализируемом объеме [2]. Кроме того, практически никто не рассматривает влияние матрицы, хотя всем хорошо известно, что биологические жидкости достаточно интенсивно поглощают при 340 нм. Таким образом, метод применим при определении высоких концентрации D-лактата в образце (более 0,5-0,8 ммоль/л) и требует значительного объема пробы (более 1 мл).

Цель исследования – оптимизировать разработанную ранее методику определения уровня D-лактата в биологических жидкостях и провести клиническую апробацию.

Материалы и методы. Для количественного определения D-лактата в ликворе использовали ферментативный метод, основанный на его превращении в пируват и удалении последнего из аналитической системы реакцией переаминирования. Оптимизацию состава аналитической системы осуществляли полнофакторной моделью. Стехиометрически выделившийся NADH с помощью электрон-переносящего реагента переводили в интенсивно окрашенные восстановленные формы солей тетразолия (формазаы), которые фотометрировали в видимом оптическом диапазоне (490 нм). Клиническая апробация осуществлена на 183 пациентах с диагнозом бактериальный менингит в возрасте от 2 мес. до 76 лет, из числа которых менингококковая этиология была установлена у 66, пневмококковая – у 28, гемофильная – у трех пациентов. У 86 пациентов этиологию заболевания установить не удалось. Группу контроля составили 52 пациента с вирусным менингитом. D-лактат в ликворе определяли при поступлении и в динамике заболевания.

Результаты. Нами было обнаружено, что в течение всего периода инкубации статистически значимое ($p < 0,05$) влияние на экспериментальную модель оказывает фактор D-LDH, что подчеркивает адекватность построения как самой модели, так и выбор модальностей. Динамика Р-значения отразила увеличение показателя для D-лактатдегидрогеназы и снижение последнего для GPT. Этот факт несложно объяснить, исходя из кинетических закономерностей протекающих сопряженных реакций. В стартовый период происходит интенсивная конверсия D-лактата в пируват. В эту фазу доминирующее влияние оказывает D-LDH. По мере накопления пирувата «включается» вторая ферментативная система, которая переаминирует последний в аланин. Линейность разработанного метода составила 0,9991, количественный диапазон – 12,17 мкМ (нижняя граница) и 0,505 мМ (верхняя граница). Предел количественного определения, рассчитанный по 3- σ критерию, составил 12,17 мкМ в пробе или 73,0 мкМ в образце.

Воспроизводимость разработанного метода определения D-лактата составила менее 10%. Расчет суммарной неопределенности показал удовлетворительный разброс значений относительно математического ожидания, который не превысил 15%.

Проведенные исследования показали, что при бактериальных менингитах уровень D-лактата в СМЖ в начале заболевания достоверно выше, чем у пациентов группы контроля ($p < 0,00001$). Так, при бактериальных менингитах медиана концентрации D-лактата в СМЖ на 1–4 сутки от начала заболевания составила 10,5 мг/л (25%-75%: 7,24–13,18 мг/л). При вирусных менингитах медиана концентрации D-лактата в СМЖ составила 1,58 мг/л (25%-75%: 0,31–3,88 мг/л) и была сопоставима с уровнем D-лактата в СМЖ у пациентов с острыми респираторными вирусными инфекциями с симптомами менингизма (Me – 1,67 мг/л; 25%-75%: 0,73–2,78 мг/л).

Проведенный ROC-анализ диагностической ценности определения концентрации D-лактата в СМЖ позволил установить точку диагностического разделения бактериальной и вирусной этиологии менингита – 6,265 мг/л (Se – 83,33%, Sp – 93,48%, $p = 0,0001$). Площадь поля под кривой ROC-анализа равна 0,932, что позволяет считать определение концентрации D-лактата в СМЖ достоверным методом диагностики бактериальной этиологии заболевания. Достоверных различий в уровне D-лактата в СМЖ при разной этиологии бактериального менингита выявлено не было ($p = 0,83$). Достоверной корреляции между уровнем цитоза в СМЖ, содержанием глюкозы в СМЖ и концентрацией D-лактата в СМЖ также не установлено. Более высокие уровни D-лактата в спинномозговой жидкости в первые дни заболевания достоверно чаще регистрировались у пациентов с гнойными менингоэнцефалитами ($p = 0,04$).

В процессе лечения пациентов с бактериальным менингитом при наличии положительного эффекта от проводимой антибактериальной терапии концентрация D-лактата в СМЖ у всех пациентов в течение 2–4 дней снижалась в 1,3–4,2 раза, а при отрицательной динамике повышалась в 4,6–9,2 раза, что может служить хорошим критерием эффективности проводимой антибактериальной терапии. При этом к концу лечения достигается снижение концентрации D-лактата в СМЖ до уровня менее 3,5 мг/л.

Заключение. Таким образом, нами разработан новый метод определения концентрации D-лактата в биологических жидкостях, который полностью удовлетворяет всем критериям валидации. Проведенные исследования показали, что дифференциально-диагностическим значением является концентрация D-лактата ликвора, превышающая 6,26 мг/л, чувствительность и специфичность метода составляют 83,33% и 93,48%, соответственно ($p = 0,0001$). В процессе

лечения пациентов с бактериальным менингитом при наличии положительного эффекта от проводимой антибактериальной терапии концентрация D-лактата в спинномозговой жидкости в течение 2-4 дней снижается в 1,3-4,2 раза, что может применяться в качестве критерия эффективности антибактериальной терапии и необходимости ее коррекции.

Литературные ссылки

1. D(-)Lactate measurement in cerebrospinal fluid for rapid diagnosis of bacterial meningitis / N. Eynard [et al] // *Biologie prospective. Comptes rendus du 8e Colloque de pont-a-Mousson* – 1993:139-42.
2. Determination of D-lactate by enzymatic methods in biological fluids: study of interferences / M. Ramon [et al.] // *Clinical Chemistry*. – 1997. №43. – P. 1010-1015.
3. D-Lactic acid in synovial fluid. A rapid diagnostic test for bacterial synovitis / J. Gratacós [et al] // *J Rheumatol* – 1995;22:1504-1508.
4. D-Lactic acid measurements in the diagnosis of bacterial infections / S.M. Smith [et al.] // *J Clin Microbiol* – 1989;27:385-388.
5. Ewaschuk, J.B. D-Lactate in Human and Ruminant Metabolism / J.B. Ewaschuk, J.M. Naylor, G.A. Zello // *Journal of Nutritional*. – 2005. – №3. – P. 1619-1625.

Сергиенко Е.Н., Германенко И.Г.

КЛИНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ ГРИППА А (H₁N₁-2009) У ДЕТЕЙ В РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУППАХ

УО «Белорусский государственный медицинский университет»,
Минск, Республика Беларусь

Актуальность. Грипп представляет собой важную медицинскую, социальную и экономическую проблему здравоохранения во всем мире [1]. В зависимости от эпидемиологической обстановки его доля в структуре острых респираторных вирусных инфекций составляет до 20-40% [2,3]. Вирусы гриппа могут вызывать как спорадические случаи, так эпидемии и пандемии. Как известно, пандемии гриппа в мире были связаны с появлением нового антигенно измененного (реассортированного) вируса гриппа А, для которого характерна неоднородность поверхностных антигенов (гемагглютинина и нейраминидазы). Так, появление нового штамма вируса гриппа А –