

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Р.А. Часнойть

17 сентября 2009 г.

Регистрационный № 034-0409

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ D-ЛАКТАТА ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ
ДИАГНОСТИКИ ГНОЙНЫХ И СЕРОЗНЫХ МЕНИНГИТОВ
И КОРРЕКЦИИ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: УО «Витебский государственный
медицинский университет»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. В.М. Семенов, канд. мед. наук, доц.
И.В. Жильцов, ст. науч. сотр. И.С. Веремей, С.К. Зенькова

Витебск 2009

Менингиты и менингоэнцефалиты различной этиологии продолжают оставаться самыми распространенными формами поражения нервной системы. Заболеваемость гнойными менингитами в последние годы находится на спорадическом уровне и составляет в среднем 3,7 на 100 тыс. населения (Rossi P.G., 2009). Летальность же при гнойных менингитах остается высокой и колеблется в зависимости от региона в пределах 2–42,3% (van de Beek D., 2004; Feigin R.D., 2004; Saez-Llorens X., 2003; Theodoridou M.N., 2007; Rossi P.G., 2009; Tang L.M., 1999; Ayaz C., 2004; Chinchankar N., 2002). При этом у 10–20% перенесших менингит бактериальной этиологии формируются остаточные органические изменения центральной нервной системы, приводящие к нарушениям трудоспособности и инвалидизации (Baraff L.J., 1993; Grandgirard D., 2006).

Анализ развития и течения менингитов различной этиологии показал зависимость между ранней диагностикой, адекватной стартовой терапией и исходом заболевания. В связи с наметившимся в последнее время сглаживанием лабораторных показателей при бактериальных и вирусных менингитах наибольшую актуальность на современном этапе представляет разработка новых методов дифференциальной диагностики менингитов различной этиологии (Семенов В.М., 2008; Зенькова С.К., 2008).

D-лактат — правовращающий изомер молочной кислоты. Продукция D-лактата в организме человека находится на очень низком уровне, его концентрация в сыворотке крови измеряется мкмоль/л, в то время как концентрация левовращающего изомера (L-лактата) — ммоль/л (Ramon M., 1997). Физические упражнения и кетоацидоз приводят лишь к небольшому повышению уровня D-лактата в крови. Значительное увеличение концентрации D-лактата в стерильных жидкостях организма может говорить об общей или локальной бактериальной инфекции или об абсорбции из мест, контаминированных большим количеством бактериальных патогенов (Smith S.M., 1989). Ряд исследователей полагает, что определение концентрации D-лактата в асцитической, плевральной, цереброспинальной и синовиальной жидкостях может служить высокоспецифичным и чувствительным методом для ранней диагностики бактериальной инфекции, особенно по сравнению с бактериоскопическим и культуральным методами исследования (Eynard N., 1993; Gratacós J., 1995; Ohmori S., 1991; Ramon M., 1997). В настоящее время имеется большое количество статей о возможности использования D-лактата при хирургической патологии, причем большинство из них основано на определении его концентрации в сыворотке крови (Surg Br.J., 1998; Yao Y., 1998; Sun X.Q., 2001; Szalay L., 2003; Bongaerts Ger, 1995; Zhang D.L., 2003). Исследования же касательно возможности использования концентрации D-лактата в спинномозговой жидкости (СМЖ) малочисленны и противоречивы (A. Wellmer, 2001; F. Salord, 1994; S.M. Smith, 1989).

В УО ВГМУ разработана простая и доступная спектрофотометрическая методика количественной оценки концентрации D-лактата, основанная на ферментативной конверсии.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Биохимический анализатор ScreenMaster или аналогичный.
2. Весы аналитические с дискретностью взвешивания 0,0002 г.
3. Весы лабораторные электронные с дискретностью взвешивания 0,02 г.
4. Термостат (25 °С).
5. Иономер И-160 или аналогичный, укомплектованный стеклянным электродом и электродом сравнения.
6. Колбы стеклянные мерные.
7. Стаканы химические для приготовления буферного раствора.
8. Дозаторы пипеточные переменного объема 10–100 и 100–1000 мкл.
9. Пробирки пластиковые типа Эппендорф.
10. Кюветы фотометрические пластиковые одноразовые с длиной оптического пути 1 см.
11. Лития D-лактат (Sigma)
12. Глицин (Sigma).
13. Гидразин (Sigma).
14. D-лактатдегидрогеназа (Sigma).
15. НАД⁺ (Sigma).
16. Перхлорная кислота (х.ч.).
17. Калия гидроксид (х.ч.).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Метод не может быть использован при уровне D-лактата менее 1,05 мг/л.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПОСОБА

Метод основан на ферментативной конверсии D-лактата в пировиноградную кислоту с образованием НАДН⁺(восстановленного), имеющего максимум поглощения в ближней ультрафиолетовой области (фильтр 340 нм).

Приготовление исходных растворов реагентов

Глицин-гидразиновый буфер: в мерную колбу на 500 мл внести 8,78 г глицина, 8,77 мл гидразина, добавить 300 мл дистиллированной воды и довести рН до 9,5; довести до 500 мл дистиллированной водой. Хранить в холодильнике не более 3 мес.

Маточный раствор лития D-лактата: 0,0200 г лития D-лактата (точная навеска) поместить в мерную колбу на 100 мл и довести дистиллированной водой до метки. Хранить в холодильнике; срок хранения — 1 неделя.

Рабочий раствор НАД⁺: к 20 мг НАД⁺ добавить 10 мл буфера и 20 мл дистиллированной воды. Раствор готовить в день определения.

Раствор D-лактатдегидрогеназы: 7 мг D-лактатдегидрогеназы растворить в 1 мл дистиллированной воды. Раствор готовить в день определения.

Построение калибровочной кривой

В 6 мерных колб (на 25 мл) внести 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 маточного раствора, довести дистиллированной водой до метки.

К 1 мл каждого раствора добавить 3 мл буфера, содержащего НАД⁺.

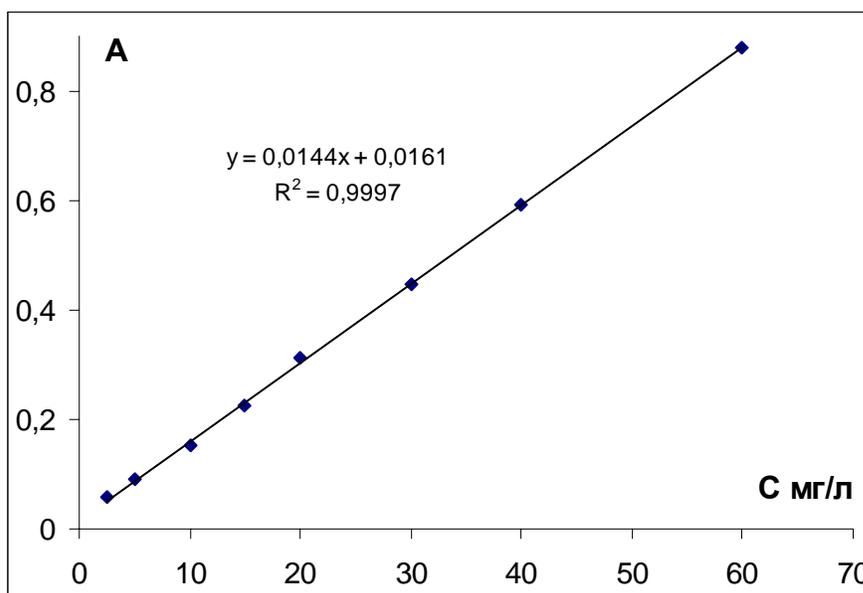
В контрольную пробирку внести 1 мл дистиллированной воды и добавить 3 мл рабочего раствора НАД⁺ (реагентный бланк).

К 1 мл из каждого полученного раствора добавить 50 мкл раствора D-лактатдегидрогеназы.

Выдержать при 25 °С в течение 90 мин в темном месте.

Измерить оптическую плотность при $\lambda=340$ нм против реагентного бланка.

Используя алгоритм линейной регрессии построить график зависимости концентрации D-лактата от оптической плотности.



Проведение основного опыта

К 1 мл СМЖ прибавить 0,1 мл 5,8 М раствора перхлорной кислоты, перемешать на вортексе и выдержать на ледяной бане 15 мин.

Центрифугировать при 3000 g 15 мин.

К 0,7 мл супернатанта прибавить 60 мкл 5,8 М раствора гидроксида калия, перемешать и выдержать на ледяной бане 15 мин.

Центрифугировать при 3000 g 15 мин.

К 0,5 мл супернатанта каждого раствора добавить 1,5 мл буфера, содержащего НАД⁺.

В контрольную пробирку внести 0,5 мл дистиллированной воды и добавить 1,5 мл буфера, содержащего НАД⁺.

К 1 мл из каждого полученного раствора добавить 50 мкл раствора D-лактатдегидрогеназы.

Выдержать при 25 °С в течение 90 мин в темном месте.

Измерить оптическую плотность при $\lambda=340$ нм против контроля.

Расчет

Расчет концентрации D-лактата в испытуемых образцах следует провести по калибровочному графику с учетом разведения при депротеинизации раствора.

Оценка результатов

При концентрации D-лактата в СМЖ на уровне и более 10 мг/л менингит следует отнести к бактериальному и начать адекватную антибактериальную терапию, а при повышении концентрации D-лактата в динамике следует поставить вопрос о смене антибактериальной терапии.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

1. Рабочий раствор НАД⁺ и раствор D-лактатдегидрогеназы необходимо готовить в день проведения испытания (они хранению не подлежат!).

2. При концентрации D-лактата выше 250 мг/л испытуемую спинномозговую жидкость рекомендуется разбавить в 2 раза с последующей корректировкой конечного результата.