

Л. Т. Бойко

**СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ СЕРОЗНЫХ МЕНИНГИТОВ**

Л. Т. Бойко

**СУЧАСНІ МЕТОДИ ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ СЕРОЗНИХ МЕНІНГІТІВ**

L. T. Boyko

**MODERN METHODS OF LABORATORY DIAGNOSTIC ASEPTIC MENINGITISES**

Целью статьи было ознакомление клиницистов с современными методами диагностики серозных менингитов и новым тестом дифференциации гнойных и серозных менингитов. Проведена сравнительная характеристика причинных факторов серозных менингитов. Представлено сравнение традиционных и современных методов лабораторной диагностики серозных менингитов. Дано описание последних представленных методов, таких как метод выделения вируса из культуры клеток, метод прямого определения антигена (полимеразная цепная реакция), метод иммуноблоттинга. Для дифференциации гнойного и серозного менингитов предложен тест определения лактозы. Рассмотрена характеристика показателей диагностической информативности тестов. Описанные современные методы обладают явными преимуществами перед традиционными в плане скорости получения результатов, чувствительности и достоверности.

**Ключевые слова:** менингиты, спинномозговая жидкость, причины серозных менингитов, серологическая диагностика, бактериологическая диагностика, полимеразная цепная реакция, иммуноблоттинг, лактоза.

Метою статті було ознайомлення клініцистів із сучасними методами діагностики серозних менингітів та новим тестом диференціювання гнойних та серозних менингітів. Проведено порівняльну характеристику причинних факторів серозних менингітів. Надано порівняння традиційних та сучасних методів лабораторної діагностики серозних менингітів. Надано опис останніх представлених методів, таких як метод виділення вірусу із культури клітин, метод прямого визначення антигену (полімеразна ланцюгова реакція), метод імуноблотингу. Для диференціювання гнойного та серозного менингітів запропоновано тест визначення лактози. Розглянуто характеристику показників діагностичної інформативності тестів. Описані сучасні методи мають наявні переваги у порівнянні із традиційними у плані швидкого отримання результатів, чутливості та достовірності.

**Ключові слова:** менингіти, спинномозкова рідина, причини серозних менингітів, серологічна діагностика, бактеріологічна діагностика, полімеразна ланцюгова реакція, імуноблотинг, лактоза.

The purpose of the article was to become acquainted clinicians with modern methods of diagnostic aseptic meningitises and with new test for differential diagnostic septic with aseptic meningitises. The comparative characteristic of cause factors aseptic meningitises was conducted. Comparing of traditional and modern methods laboratory diagnostic of aseptic meningitises was presented. The description of the last presenting methods such as: apportionment virus from cells culture, method of direct determining antigene (polymerase chaine reaction), immunoblotting was presented. Test determining lactose for differentiation septic and aseptic meningitis was proposed. The characteristic of indicators diagnostic importance of the tests was considered. Described modern methods possess evident advantage over traditional methods as quick receiving of results, high sensitivity and trust worthiness.

**Keywords:** meningitises, cerebrospinal fluid, causes of aseptic meningitises, serologic diagnostic, bacterial diagnostic, polymerase chaine reaction, immunoblotting, lactase.

Серозные менингиты (СМ) являются распространенными формами поражения центральной нервной системы (ЦНС), частота которых в структуре нейроинфекций достигает 25—30 % [1].

Заболееваемость менингитами регистрируется во всех странах мира. Особенно высокий ее уровень в некоторых странах Африки (Чад, Нигер, Нигерия, Судан) — в 40—50 раз выше, чем в странах Европы. В западных странах бактериальный менингит (БМ) встречается приблизительно у трех человек на 100 тыс. жителей. Вирусный менингит является более распространенным, он встречается 10,9 раз на 100 тыс. жителей. В Бразилии показатель заболеваемости БМ выше (до 500 случаев на 100 тыс. жителей).

Заболееваемость менингококковой инфекцией в странах Евросоюза составляет 1—2 случая на 100 тыс. населения и существенно не менялась в течение 30 лет, летальность же значительно колеблется — от 6,3 до 14 %. В государствах СНГ заболееваемость несколько выше — 2—4 случая на 100 тыс. человек. Вспышки менингококковой инфекции за последние годы зарегистрированы в странах Юго-Восточной Азии, Ближнего Востока, Северной Африки, в Саудовской Аравии среди паломников. Особым регионом считается Центральная Африка, т. н. «менингитный пояс», включающий более десяти стран. Заболееваемость там стабильно высокая, исчисляется сотнями случаев на 100 тыс. населения.

© Бойко Л. Т., 2014

По информации областной СЭС, в 2012 году в Харьковке и области зарегистрировано 180 случаев СМ, 152 из них — за июль-сентябрь месяцы. В основном, это — дети 7—14 лет.

В 2011 году энтеровирусный менингит регистрировался в Одесской, Донецкой, Кировоградской областях и г. Севастополе (соответственно 383, 273, 234 и 49 случаев). В 2013 году на 01.08. поступили сообщения из 12 областей и г. Севастополя о 464 случаях СМ [2].

Согласно информации Главного Управления Госсанэпидслужбы во Львовской области, с начала августа по состоянию на 23 августа 2013 года в разных районах и населенных пунктах региона было зарегистрировано 88 больных, в т. ч. 49 детей в возрасте до 17 лет с клинически установленным диагнозом «СМ» либо с подозрением на СМ.

По состоянию на 23 августа 2013 года на стационарном лечении находились 19 человек, из них — 10 детей. Наивысший уровень заболеваемости имеет место во Львове, где с начала августа зарегистрировано 34 случая заболеваний с клинически установленным диагнозом «СМ»; в Бугском районе с начала августа зарегистрировано 27 случаев СМ [2].

СМ составляют большую часть нейроинфекций, характеризующихся острым развитием гипертензионно-гидроцефального и менингеального синдромов с серозными воспалительными процессами в оболочках мозга.

Течение их, как правило, благоприятное. Отличаются полиэтиологичностью, чаще всего обусловлены вирусами, реже спирохетами, бактериями, грибами. Первичные СМ вызываются энтеровирусами Коксаки, ЕСНО, вирусами лимфоцитарного хориоменингита Армстронга. Вторичные развиваются при кори, гриппе, герпесе, эндемическом паротите, полиомиелите и других вирусных инфекциях. В последние годы наблюдается рост заболеваемости СМ, в этиологии которых имеют значение не только вирусы, но и бактерии, такие как туберкулезные

палочки, лептоспиры, грибы рода кандиды, боррелии и эрлихии [3].

Многообразие форм СМ, повсеместная распространенность и широкий спектр осложнений требуют быстрой и информативной диагностики. Одним из ведущих методов диагностики является спинномозговая пункция с последующим лабораторным дифференциальным диагнозом менингита и определением в спинномозговой жидкости (СМЖ) вида возбудителя либо поиска другой причины, вызвавшей заболевание (см. таблицу).

Причины острых серозных менингитов

Причинные факторы	Часто встречающиеся	Нечасто встречающиеся	Редкие	
Инфекционные причины	1. Бактериальные	Болезнь Лайма Лептоспироз Туберкулез Подострый бактериальный эндокардит Параменингеальная инфекция (эпидуральный субдуральный абсцесс, синусная или глазная инфекция) Частично леченный бактериальный менингит	Бледная трепонема Микоплазменная пневмония Пятнистая лихорадка Скалистых Гор Бруцеллез Эшерихиоз	Боррелиоз Спириллез Нокардиоз Актиномикоз
	2. Вирусные	ЕСНО вирусы Коксавирусы Эпидемический паротит Энцефалит Сент-Луиса Восточный лошадиный энцефалит Западный энцефалит Калифорнийский энцефалит Простой вирус 1 типа Простой вирус 2 типа Н IV инфекция Лимфатический хориоменингит Полиомиелит	Эпштейна — Барр вирус Аденовирусы Цитомегаловирус Ветряная оспа Корь Краснуха	Парагриппы А и Б Ротавирусы Коровья оспа Инфекция Западного Нила Человеческий герпес 6 типа Японский энцефалит Б Энцефалит долины Лиуррея
	3. Грибы		Криптококкоз Кокцидиоидомикоз Гистоплазмоз	Кандидоз Бластомикоз Аспергилез Споротрихоз
	4. Паразитарные		Ангиостронгилёз Токсоплазмоз	Цистицеркоз Трихинеллёз
Неинфекционные причины	1. Неопластические заболевания	Внутричерепные опухоли Лимфомы Лейкозы Метастазы опухолей		
	2. Системные заболевания	Нейросаркоидоз Болезнь Бехчета Системная красная волчанка		Синдром Фогт Коянаги Харада Синдром Шегрена Ревматоидный артрит
	3. Нейрохирургические вмешательства	Нейрохирургия (синдром задней черепной ямки) Внутриоболочечные агенты		
	4. Лекарственные средства	Ибупрофен	NSA ID (нестероидное противовоспалительное средство) Триметоприм Гентамицин Сульфаметоксазол Ламотриджин	Ig (в/в) Моноклональные антитела ОКТ-3

Целью статьи является ознакомление с современными методами диагностики СМ и с методом дифференциации между СМ и БМ.

Классические методы диагностики СМ — это серологические, микробиологические, микроскопия осадка СМЖ и мазков крови. Серологическая диагностика располагает следующими методами: реакцией нейтрализации (РН), реакцией связывания комплемента (РСК); анализами на титр противовирусных антител в реакции гемадсорбции (Ргад), в реакции гемагглютинации (РГА) и в методе непрямой иммунофлуоресценции (РИФ).

Однако перечисленные методы позволяют выявить нарастание титра антител только через 1—3 недели от начала заболевания.

Твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА, ELISA) является более информативным, чувствительным и менее трудоемким, чем описанные методы. К сожалению, анализ позволяет определить иммунный ответ организма на возбудителя, а не сам возбудитель [4, 5].

Традиционная дифференциальная диагностика СМ и БМ базируется исключительно на микробиологических и серологических методах исследования, равно как

и выделение возбудителя [4]. Однако, идентифицировать возбудителя удается лишь в 20 % случаев вирусных менингитов и в 30 % случаев энцефалитов [5]. По этой причине внимание исследователей привлекает такой диагностический маркер как лактоза. Определяется в СМЖ заболевших. При БМ наблюдается повышенный уровень лактозы в СМЖ больных по сравнению с лицами, болеющими СМ [6—8]. Данный маркер оказывается лучшим для дифференциации БМ от СМ по сравнению с другими показателями, включая белок, глюкозу и общее количество лейкоцитов в СМЖ.

Из современных лабораторных методов подтверждения диагноза СМ наиболее доказательными являются выделение вируса из культуры клеток, прямое определение вирусных антигенов и иммуноблоттинг [9].

Метод выделения вируса из культуры клеток основан на том, что размножаясь в культуре клеток, вирусы нередко оказывают цитопатическое действие, видимое под светлопольным микроскопом.

В других случаях цитопатическое действие вирусов позволяет поставить лишь предварительный диагноз, который подтверждают путем иммунофлюоресцентного окрашивания с использованием моноклональных антител к данному вирусу. Вирусы, выделенные в культуре клеток, идентифицируют также с помощью реакции гемадсорбции, методом интерференции или с помощью электронной микроскопии (при условии, что при светлопольной микроскопии видны изменения клеточной морфологии).

Эффективность и скорость идентификации вирусов увеличивается при сочетании кратковременного культивирования с иммунологическими методами. Для обнаружения вируса в однослойной культуре клеток, растущей на покровном стекле, можно использовать моноклональные антитела к специфическому раннему вирусному белку. Таким образом, зараженные клетки удается выявить в течение нескольких часов или суток после заражения — то есть до того, как вирус пройдет несколько циклов репродукции, необходимых для появления видимого цитопатического действия.

**Метод прямого определения антигенов, или ПЦР-реакция.** Метод предназначен для быстрой диагностики вирусных инфекций. Зараженные вирусом клетки получают непосредственно от больного, выявленные с помощью моноклональных антител к вирусным антигенам. Моноклональные антитела применяют и для специфического окрашивания гистологических препаратов.

Развитие молекулярно-генетических методов открывает новые возможности в лабораторной диагностике вирусных инфекций. Эти методы позволяют обнаружить ничтожно малое количество вирусной нуклеиновой кислоты в исследуемом материале, отличаются чувствительностью, быстротой (до 6 часов) и не зависят от жизнеспособности выделенного вируса и его способности к репродукции. Однако, крайне высокая чувствительность данного метода может привести к ложноположительным результатам из-за загрязнения пробы. К недостаткам молекулярно-генетических методов относится их высокая стоимость.

Имуноблоттинг позволяет одновременно выделять антитела к нескольким вирусным антигенам. Для этого смесь антигенов, разделенных с помощью электрофореза и перенесенных на адсорбирующую мембрану, инкубируют с сывороточными антителами. С помощью этого анализа также можно оценить степень специфичности антител сыворотки, сравнить интенсивность реакции

с вирусными и клеточными антителами. Чаще всего иммуноблоттинг используют при слабopоложительных и сомнительных результатах Ig G. Метод высокочувствителен и высокоспецифичен, но он не подходит для массовых исследований и его результаты трудно оценить количественно.

Как правило, выбор исследований в клинических лабораториях ограничен традиционными серологическими, бактериологическими и бактериоскопическими методами, растянутыми во времени и трудоемкими. Но клиницистам при подозрении на менингит необходимо быстро и информативно поставить диагноз с целью немедленно начать комплекс лечебных мероприятий. Поэтому, несмотря на некоторые слабые стороны перечисленных современных методов, они имеют явное преимущество перед традиционными и продолжают постепенно внедряться в клинические лаборатории, в основном, в коммерческие.

Таким образом, в статье вниманию клиницистов предложены несколько лучших современных методов для диагностики СМ и один из последних методов для дифференциации СМ от БМ. Описанные лабораторные методы ПЦР, иммуноблоттинга и выделения вируса из культуры представляют практическую ценность по причине быстрого получения результатов, являются высокоспецифичными и чувствительными.

#### Список литературы

1. Куприна Н. П. Клинико-иммунологические особенности серозных менингитов энтеровирусной этиологии [Текст] / Куприна Н. П., Земсков П. М., Кокорева С. П. // Детские инфекции. — 2000. — № 1. — С. 59—61.
2. Захворюваність серозними менингітами [Електронний ресурс] // Прес-служба МОЗ України. — Режим доступу : [www.moz.gov.ua/portal](http://www.moz.gov.ua/portal).
3. A Differential Diagnosis of Drug-Induced Aseptic Meningitis [Текст] / Clair Cascella, Sara Nausheen, Burke A. Cunha // Infect. Med. — 2008. № 25. — P. 331—334.
4. Симаченко О. В. Изучение клинико-эпидемиологических и диагностических маркеров менингита у детей на современном этапе [Текст] / О. В. Симаченко, И. Г. Германенко, Т. И. Лисицкая // Медицинская панорама. 2010. № 8. — С. 17—23.
5. Ф. Леманн-Хорн / Лечение заболеваний нервной системы [Текст] / Ф. Леманн-Хорн, А. Лудольф : пер. с нем. О. С. Левина. — М.: МЕДпресс-информ, 2009. — 526 с.
6. Bonsu B. K. Differentiating acute bacterial meningitis from acute viral meningitis among children with cerebrospinal fluid pleocytosis: a multivariable regression model [Текст] / B. K. Bonsu, M. B. Harper // Pediatric Infect. Disease J. — 2004. — Vol. 23. — № 6. — P. 511—517.
7. Cerebrospinal fluid lactate concentration to distinguish bacterial from aseptic meningitis: a systemic review and meta-analysis [Текст] / [Nguyen T. Huy, Nguyen T. N. Tkao, Doan T. N. Diep et al]. // Critical Care. — 2010. V 14. — Issue 6. — P. 240.
8. Cunha B. A. The diagnostic usefulness of cerebrospinal fluid lactic acid levels in central nervous system infections [Текст]. / B. A. Cunha // Clin. Infect. Dis. — 2004. — V 39. — P. 1260—1261.
9. Лабораторные анализы при диагностике вирусных инфекций [Электронный ресурс] // Центр экстракорпоральной гемокоррекции. — Режим доступа : [www.center-hc.ru/diseases/virus13.htm](http://www.center-hc.ru/diseases/virus13.htm).

Надійшла до редакції 22.01.2014 р.

**БОЙКО Людмила Трифоновна**, кандидат медицинских наук, доцент кафедры клинической лабораторной диагностики Харьковской медицинской академии последипломного образования, г. Харьков; e-mail: l-boiko@ukr.net

**BOYKO Lyudmyla Trifonovna**, MD, PhD, Lecturer of the Department of clinical laboratory Diagnostic of the Kharkiv medical Academy of Postgraduate Education, Kharkiv; e-mail: l-boiko@ukr.net