

УДК 576.8.097.29

А.П.Козлов, М.В.Криницина

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОВ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ СИСТЕМНОЙ ЭНДОТОКСИНЕМИИ**

Уральская государственная медицинская академия

Эндоотоксины (ЭТ) грамотрицательной микрофлоры выступают в роли этиологического и патогенетического фактора при патологии инфекционного и неинфекционного происхождения [4,5,7]. Источником эндотоксина является как экзогенная микрофлора, так и аутофлора кишечника [6]. Определенные доли участия бактериального эндотоксина в патогенезе аутоинтоксикаций, полиорганной патологии и септического шока - задача актуальная, тем более, что до 40 % случаев септических состояний, с выраженной клиникой интоксикации, не получают этиологического подтверждения [8].

Существующие методы диагностики системной эндотоксинемии обладают рядом недостатков: громоздки, малоэкономичны, связаны с использованием дефицитных, дорогостоящих ингредиентов, часто позволяют выявлять лишь интегральные показатели [3]. Из методов непрямого серологического анализа наибольший интерес представляет реакция пассивной гемагглютинации (РПГА). Многолетний научно-практический опыт использования РПГА сотрудниками нашей кафедры для диагностики и сероэпидемиологической разведки различных инфекций (управляемых и неуправляемых средствами специфической профилактики) многократно подтвердил высокую эффективность и надежность этого метода. Он практически не уступает по чувствительности реакциям иммуноферментного анализа и значительно превосходит их по показателям экономичности.

Опыт применения РПГА с наборами коммерческих диагностикумов "Антиэндотокс" и "Ди-эндотокс", для выявления антител (АТ) к эндотоксину грамотрицательной микрофлоры в сыворотке крови здоровых доноров и больных с различной органопатологией [2], побудил нас к разработке наиболее рациональной методики данного теста.

Исходя из вышеизложенного, нами была поставлена цель - разработка методики приготовления эритроцитарного диагностикума (ЭД) на основе бактериального Ре-гликолипида и отработать оптимальные условия выявления эндотоксин-

связывающих факторов в биологическом материале с помощью РПГА.

В качестве антигена-сенситина применяли гликолипид Ре-хемотипа S.minnesota. Для сенсibilизации использовали 1% суспензию эритроцитов человека I(0), Rh+, формалинизированных по методу R.Weinbach, после обработки и без обработки раствором танина. После формализации отмытые эритроциты доводили до 50% (по объему) взвеси стандартным солевым раствором с бычьим сывороточным альбумином (ССР с БСА).

При таннизации к 0,1 мл 50% взвеси формализированных эритроцитов человека (ФЭЧ) добавляли 0,9 мл фосфатного буферного раствора (рН 7,2). К полученному 1 мл 5% взвеси добавляли 1,5 мл раствора танина в рабочей концентрации 1:20000, 2,5 мл смеси встряхивали на шуттель-аппарате 30 мин. при комнатной температуре. Эритроциты выдерживали 12 ч при комнатной температуре в растворе танина. После этого эритроциты трехкратно отмывали забуференным физраствором (ЗФР) в объеме 3,0 мл, ресуспензировали в 1,0 мл ССР с БСА для получения 5% взвеси. При отсутствии спонтанной агглютинации в контроле таннизированные ФЭЧ использовали в дальнейшей работе.

Для стандартизации, оценки чувствительности и специфичности РПГА применяли сыворотку кролика, иммунизированного Ре-гликолипидом; нормальные сыворотки: человеческую, крупного рогатого скота, лошадиную, а также иммунную шигеллезную ослиную сыворотку. Сравнительные опыты ставили с диагностикумами коммерческой тест-системы "Антиэндотокс" НПК "Гематолог".

Реакцию ставили микрометодом в панелях из набора "Такачи". Готовили двукратные разведения стандартных и испытуемых сывороток в диапазоне 1:2 - 1:2048 в объеме 25 мкл на ЗФР рН 7,2. В качестве стабилизатора использовали 0,1% раствор желатина для инъекций на 0,15 М фосфатном буферном растворе рН 7,2. В опытные и контрольные лунки вносили по 12,5 мкл 1% взвеси сенсibilизированных ФЭЧ. Панель помещали в термостат на 20 мин. при 37°C. Окончательный учет результатов проводили через 60 мин. по четырех плюсовой системе. Титром сыворотки считали наибольшее ее разведение, вызывавшее агглютинацию эритроцитов не менее, чем на два плюса.

Специфичность тест-системы подтверждали в реакции торможения пассивной гемагглютинации (РПГА, вариант РНАТ) с набором антигенов белковой и небелковой природы. Достоверность получаемых результатов оценивали методами вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента.

Успешное конструирование эритроцитарных диагностикумов зависит от сочетания ряда факторов: концентрации сенситина, температуры сенсибилизации, pH растворов, экспозиции, наличия коъюгирующих посредников [1].

При изучении влияния температурного фактора на процесс сенсибилизации ФЭЧ Ре-гликолипидом (Ре-ГЛ), с помощью РПГА испытывали активность нетанизированных эритроцитов, сенсибилизированных при 37, 45, 50, 55, 56, 60, 61°C. Результаты (здесь и далее) оценивали по величине титров антител к Ре-ГЛ, выявляемым в иммунной сыворотке (табл. 1). Исследования показали, что сенсибилизация происходит во всем диапазоне испытанных температур, однако при разных температурных условиях степень сенсибилизации была различной. Наиболее высокие титры определялись в РПГА с ФЭЧ, сенсибилизированными при 55°C. С повышением или снижением температуры титр антител снижался ( $t=2,06-7,46$ ;  $P<0,05-0,01$ ), чаще наблюдалась спонтанная агглютинация эритроцитов, нечеткость контролей. Достоверных различий средних геометрических титров АТ в интервале температур 55-60°C не установлено, но поскольку максимальные титры АТ к ЭТ в РПГА выявлялись при 55°C (в 66,7% опытов), эта температура сенсибилизации была использована в дальнейшей работе.

При сравнении степени сенсибилизации Ре-ГЛ таннизированных и не обработанных раствором танина ФЭЧ было установлено, что ЭД на основе нетанизированных ФЭЧ позволяет выявлять антитела в титрах ( $181,04\pm 2,46$ ) в 4 раза более высоких, чем ЭД на основе таннизированных ФЭЧ ( $P<0,01$  при  $t=7,73$ ). Кроме того, при постановке РПГА с сенсибилизированными ФЭЧ, обработанными раствором танина, чаще наблюдалось неполное их оседание в контроле, склонность к спонтанной агглютинации. ЭД сохранял свои свойства не более двух недель. Учитывая это, в последующих опытах мы использовали ФЭЧ без таннизации.

Была изучена активность ФЭЧ, сенсибилизированных при pH 6,4; 6,8; 7,2; 7,4; 8,0. Достоверных различий в результатах РПГА при данных значениях pH не выявлено, но поскольку при pH 7,2 были получены наиболее четкие результаты, в дальнейшей работе сенсибилизацию осуществляли при pH 7,2.

Для сенсибилизации эритроцитов использовали Ре-ГЛ в исходной концентрации 400 мкг/мл и его серийные разведения 1:2 и 1:4 (200 и 100 мкг/мл соответственно). Наиболее эффективную сенсибилизацию обеспечивал АГ в исходной концентрации, при этом средний геометрический титр составлял  $172,1\pm 1,57$ . Снижение концентрации Ре-ГЛ в 4 раза (100 мкг/мл) приводило к 8-кратному снижению чувствительности РПГА

( $P<0,01$  при  $t=5,85$ ). При использовании АГ в концентрации 200 мкг/мл средний геометрический титр ( $111,42\pm 1,84$ ) не имел достоверных различий с титром, выявляемым при использовании цельного Ре-ГЛ, но применение цельного антигена обеспечивало более высокий процент обнаружения АТ в высоких титрах (1:128-1:256 - в  $85,7\pm 1,57\%$  и  $60\pm 2,11\%$  соответственно). Поэтому в дальнейшей работе для сенсибилизации ФЭЧ мы использовали Ре-ГЛ в концентрации 400 мкг/мл.

В РПГА испытывали активность нетанизированных ФЭЧ, сенсибилизированных Ре-ГЛ в концентрации 400 мкг/мл, при температуре 55°C и pH 7,2 в течение 60, 90, 100, 120, 140 мин. (табл. 2). Сенсибилизация происходит во всем диапазоне выбранных экспозиций, но степень ее при различных экспозициях была различной. Увеличение экспозиции приводило к достоверному повышению титров антител в РПГА. Наиболее высокая чувствительность диагностикума зафиксирована при сенсибилизации ФЭЧ в течение 120 мин. Дальнейшее увеличение времени сенсибилизации приводило к достоверному снижению титров АТ в РПГА. В последующей работе мы применяли экспозицию 120 мин.

Специфичность полученного ЭД подтверждали в РПГА (РНАТ). В качестве антигенов использовали Ре-ГЛ (400 мкг/мл), пирогенал (10 мкг/мл), бычий сывороточный альбумин (500 мкг/мл), липополисахарид (ЛПС) E.coli по Westphal (1000 мкг/мл). Диагностическую сыворотку применяли в рабочем разведении 1:32, определенном в предварительном опыте. Высокой тормозящей активностью обладал только гомологичный антиген ( $147,02\pm 1,66$ ), гетерологичные антигены такой активностью либо не обладали, либо она была в 52 раза ниже (ЛПС E.coli), чем у Ре-ГЛ ( $P<0,01$  при  $t=7,18$ ).

При постановке РПГА с различными сыворотками установили, что высокие титры (1:128 и выше) определяются только в кроличьей референс-сыворотке, содержащей антитела к Ре-ГЛ. В остальных же случаях титр был достоверно ниже (в 12,6-15,8 раз;  $P<0,05$  при  $t=2,01-2,09$ ) либо не определялся.

Чувствительность полученного ЭД оценивали в РПГА с гипериммунной кроличьей сывороткой, а также в сравнительных опытах с использованием коммерческого диагностикума. Приготовленный по разработанной нами методике ЭД позволял выявлять АТ к Ре-ГЛ в максимальном для референс-сыворотки титре (1:256). Средние геометрические титров АТ к Ре-ГЛ, выявленные с помощью собственного и коммерческого диагностикумов ( $190,2\pm 1,45$  и  $209,99\pm 1,37$  соответственно), не имели достоверных различий ( $t=0,9$ ;  $P>0,05$ ).

Таблица 1

Влияние температуры на процесс сенсибилизации ФЭЧ Re-ГЛ

Температура сенсибилизации (°С)	Число опытов	Средний Геометрический титр	Достоверность различий		
			Группы сравнения	t	P
37	8	58,68±3,88	1 и 4	2,06	P<0,05
45	5	37,99±4,84	2 и 4	7,46	P<0,01
50	4	98,05±3,65	3 и 4	4,37	P<0,01
55	9	203,17±1,42	4 и 5	1,83	P>0,05
56	6	134,02±2,73	4 и 6	1,97	P>0,05
60	5	92,10±3,87	4 и 7	2,11	P<0,05
61	6	64,75±4,11			

Таблица 2

Влияние экспозиции на процесс сенсибилизации ФЭЧ Re-ГЛ

Экспозиция (мин.)	Число опытов	Средний геометрический титр	Достоверность различий		
			Группы сравнения	t	P
60	2	11,31±2,90	1 и 4	6,60	P<0,01
90	2	45,25±1,63	2 и 4	4,67	P<0,01
100	3	101,59±1,49	3 и 4	2,69	P<0,01
120	4	215,0±1,35	4 и 5	6,84	P<0,01
140	2	22,62±2,61			

Результаты проведенных исследований позволили выбрать следующий режим приготовления ЭД на основе Re-ГЛ для РПГА: формализированные эритроциты без посредника сенсибилизировали при pH 7,2 Re-гликолипидом в концентрации 400 мкг/мл, в ультратермостате при 55°C, в течение 120 мин., встряхивая пробирки через каждые 15 мин. После трех кратного отмывания сенсибилизированных эритроцитов от избытка АГ, ЭД применяли в виде 1% взвеси на ЗФР pH 7,2 для определения АТ к эндотоксину грамотрицательных бактерий в РПГА. Эритроцитарный диагностикум сохранял свои качества, при консервировании азидом натрия (1:20000) и хранении в холодильнике при +4°C, в течение 12 мес. (срок наблюдения).

При усовершенствовании методики постановки РПГА нам удалось уменьшить в 2 раза объемы используемых ингредиентов (в том числе и исследуемого материала) без снижения устойчивости эритроцитарных систем. Благодаря применению стабилизатора был сведен к минимуму процент неспецифической агглютинации сенсибилизированных эритроцитов. Учет реакции стал возможен (при условии инкубации при 37°C) через 30 мин., а не через 1,5 ч.

Таким образом, разработанная нами методика позволяет получать высокоэффективный эритроцитарный диагностикум для выявления в РПГА антител к наиболее общему компоненту эндотоксинов грамотрицательной микрофлоры - Ре-

гликолипиду. Высокая специфичность системы подтверждается отсутствием перекрестных реакций с гетерологичными антителами и антигенами. Усовершенствованная методика постановки РПГА превосходит существующую по экономичности, позволяет получать четкие, воспроизводимые результаты при выявлении антиэндотоксиновых антител в сыворотке либо плазме крови и может быть использована для диагностики системной эндотоксинемии у больных с различной органопатологией.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Каральник Б.В. Эритроцитарные диагностикумы. М.: Медицина, 1976. 164 с.
2. Козлов А.П., Криницина М.В., Захарова С.Ю. Характеристика популяционного гуморального иммунитета к эндотоксинам грамотрицательной микрофлоры // Вестник УрГМА. Вып.1, 1995, С.159-163.
3. Криницина М.В., Коцдрашова З.Н., Козлов А.П. Эндотоксины грамотрицательной микрофлоры в норме и патологии // Бюллетень ГЦНМБ МЗ РФ, № Д-213124. М., 1993. С.18-19.
4. Румянцев А.Г., Касаткин В.Н., Виноградов В.И. и др. Клинико-патогенетическая характе-

- ристикa эндотоксинемии // Материнство и детство. 1992. Вып.37. № 10-11, С.11-14.
5. Яковлев М.Ю. Эндотоксинальный шок // Казанский мед. журнал. 1987. № 3, С.207-211.
  6. Linder H., Engberg J., Baltzer J.M. et al. Induction of inflammation by Escherichia coli on the mucosal level: requirement for adherence and endotoxin // Infect. Immunol. 1988. Vol.56, № 5. P.1309-1313.
  7. Matthew Pollac M.D. New therapeutic strategies in gram-negative septic shock based on molecular mechanisms of pathogenesis // Principles and Practice of Infections Diseases. California, 1992. Update 8. P. 1-18.
  8. Zieger E.Y., Fisher C.Y., Sprung C.L. et al. Treatment of gram-negative bacteremia and septic shock with HA-1A human mononuclear antibody against endotoxin. A randomized, double blind, placebo controlled trial // New England J.of Medicine. 1991.P 424-436.

УДК 616-4 : 614.1:312.6

**В.Н.Прохоров, В.В.Беляков**

### **СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ МЕДИЦИНСКИХ И СОЦИАЛЬНО-ГИГИЕНИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА СОСТОЯНИЕ ЗДОРОВЬЯ ДЕТЕЙ МЛАДШЕГО ВОЗРАСТА**

Уральская государственная медицинская академия

Состояние здоровья детей в дошкольном возрасте во многом определяет дальнейший рост и развитие организма и имеет серьезное социально-экономическое значение (расходы из семейного и государственного бюджета, необходимость пребывания матери на больничном листе, а иногда невозможность для нее иметь постоянную работу из-за болезни ребенка).

Представляется весьма важным выявить иерархию факторов, оказывающих определяющее влияние на состояние здоровья детей младшего возраста с целью прогноза и обозначения основных направлений в проведении лечебно-профилактических мероприятий [2].

Было изучено состояние здоровья 98 детей в возрасте от 3 до 6 лет, посещающих детские дошкольные учреждения, и зависимость его показателей от влияния сорока трех факторов медицинского и социально-гигиенического характера.

Оценка состояния здоровья детей производилась по итогам общей продолжительности заболеваний каждого ребенка, взятой суммарно за

3 года с различными диагнозами по фактам обращаемости за медицинской помощью по амбулаторной карте (форма 112/у - история развития ребенка). Изучалась также суммарно за 3 года длительность временной нетрудоспособности матери по уходу за больным ребенком (лист временной нетрудоспособности и справка по уходу).

Данные о перинатальных факторах были взяты из карт наблюдения за беременными, историй родов и историй развития новорожденных. Группу перинатальных факторов составили сведения о состоянии генитальной сферы и наличии экстрагенитальных заболеваний до и во время беременности, паритете родов, особенностях течения беременности и родов и подробная характеристика состояния новорожденного в период пребывания в роддоме (общее состояние, оценка по шкале АПГАР, масса тела, травматизм и болезни).

Сведения о возрасте и состоянии здоровья родителей отнесены к медико-биологическим факторам, а данные о составе семьи, материально-бытовых условиях, особенностях режима труда матери, образовании и образе жизни родителей - к социально-гигиеническим и получены путем анкетного опроса матерей.

Для выявления степени значимости влияния каждого фактора на заболеваемость детей был использован однофакторный дисперсионный анализ с определением величины критерия достоверности влияния (фактор Фишера) по общепринятой методике [4]. При значении фактора Фишера, равном 1,0 и более, показатель считался существенным, т.е. оказывал выраженное воздействие на здоровье ребенка. При определении значимости влияния изучаемого показателя на продолжительность болезни ребенка фактор Фишера обозначался как F1, а при определении его влияния на длительность пребывания матери на больничном листе и справке по уходу - как F2. Математическая обработка данных была произведена в НИИ математики и механики УРО АН РФ. Результаты исследования приведены в таблице.

При анализе влияния социальных факторов выявлено, что заболеваемость детей существенным образом зависела от таких показателей, как образование родителей, наличие полной или неполной семьи и количество детей. Более высокий уровень состояния здоровья детей обеспечивался заботой обоих родителей, особенно при их высоком образовательном цензе и наличии единственного ребенка. Присутствие в семье бабушки позволяло матери реже оставаться дома с заболевшим ребенком и не пропускать выходы на работу.