

Список литературы

1. Баранов, А. А. Показатели ретикулоцитарных индексов у здоровых детей / А. А. Баранов, Е. Л. Семикина, О. С. Мельничук и др. // Вопросы диагностики в педиатрии. – 2010. – Т. 2, № 4. – С. 17–21.
2. Бокова, Е. В. Растворимый трансферриновый рецептор в диагностике, дифференциальной диагностике и прогнозе некоторых заболеваний у детей / Е. В. Бокова, Е. С. Ковригина, А. Г. Румянцев и др. // Российский педиатрический журнал. – 2006. – № 6. – С. 47–52.
3. Румянцев, А. Г. Эритропоэтин в диагностике, профилактике и лечении анемий / А. Г. Румянцев, Е. Ф. Морщакова, А. Д. Павлов. – М. : Медпрактика, 2003. – 448 с.
4. Шилов, В. Ю. Анемия при хронической болезни почек : патогенез, диагностика и лечение / В. Ю. Шилов, Н. Н. Хасабов, В. М. Ермоленко // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2008. – Т. 7, № 2. – С. 28–35.
5. Corwin, H. L. Efficacy and safety of epoetin alfa in critically ill patients / H. L. Corwin, A. Gettinger, T. C. Fabian et al. // The New England Journal of Medicine. – 2007. – Vol. 357, № 10 – P. 965–976.
6. Fleming, R. E. Iron and inflammation : cross-talk between pathways regulating hepcidin / R. E. Fleming // J. Mol. Med. – 2008. – Vol. 86, № 5. – P. 491–494.
7. Thomas, C. Biochemical markers and hematologic indices in the diagnosis of functional iron deficiency / C. Thomas, L. Thomas // Clin Chem. – 2002. – Vol. 48, № 7. – P. 1066–1076.
8. Vaziri, N. D. Erythropoietin and transferrin metabolism in nephrotic syndrome / N. D. Vaziri // Am. J. Kidney Dis. – 2001. – Vol. 38. – P. 1–8.

Гордеева Ольга Борисовна, кандидат медицинских наук, врач педиатр, старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии, ФГБУ «Научный центр здоровья детей» РАМН, НИИ педиатрии, Россия, 119991, г. Москва, Ломоносовский проспект, д. 2/62, тел.: (499) 134-03-59, e-mail: obr@yandex.ru.

УДК 616-022.6-053.3-07

© В.И. Журавлев, Г.А. Харченко, О.Г. Кимирилова, 2013

В.И. Журавлев¹, Г.А. Харченко², О.Г. Кимирилова²

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ К ВИРУСУ «АСТРАХАНЬ-12»

¹ФГУЗ «Астраханская противочумная станция» Минздрава России

²ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздрава России

Представлены результаты изоляции из крови лихорадящего больного арбовируса, получившего название «Астрахань-12» и создания на основе его антигенов диагностической тест-системы иммуноферментного анализа (ИФА) для обнаружения антител класса М и G в сыворотках крови больных и реконвалесцентов.

Ключевые слова: арбовирусы, иммуноферментный анализ, разработка метода.

V.I. Zhuravlev, G.A. Hurchenko, O.G. Kimirilova

THE WORKING-OUT OF TECHNOLOGY IN RECEIVING THE DIAGNOSTIC TEST-SYSTEM TO VIRUS «ASTRAKHAN-12»

The results of isolation from the blood of feverish patient, type arbovirus, having got the name «Astrakhan-12» and creation on its' base the antygene of diagnostic test system of immunoenzyme analysis (IEA) for discovery of antibodies of class M and G in the blood resum of patients and recovering persons are represented.

Key words: arbovirus, immune-enzyme analysis, working-out of method.

Введение. В связи с активацией природных очагов проблема арбовирусных инфекций продолжает оставаться актуальной для врачей всех специальностей. В настоящее время на территории Астраханской области установлена циркуляция 10 арбовирусов: Крымской геморрагической лихорадки (КГЛ), лихорадки Западного Нила (ЛЗН), Тягиня, Инко, Батаи, Синдбис, УкуниEMI, Дхори, Бханджа, штамм № 913/64.

Полиморфизм клинических проявлений арбовирусных инфекций и трудность дифференциальной диагностики требуют разработки новых систем специфической диагностики [1, 2, 3].

Примером частичного решения этих задач может служить изоляция из крови лихорадящего больного арбовируса, условно названного «Астрахань-12», а также создание на основе его антигенов диагностической тест-системы иммуноферментного анализа (ИФА) для обнаружения антител класса М и G в сыворотках крови больных реконвалесцентов.

Цель: разработать и усовершенствовать методы серологической диагностики арбовирусных инфекций.

Материалы и методы исследования. Материалом для исследования служили пробы крови и парные сыворотки от 56 больных детей в возрасте от 5 до 14 лет, лечившихся в детских отделениях ГБУЗ АО «Областная инфекционная клиническая больница им. А.М. Ничоги» с диагнозом серозный менингит или лихорадочное заболевание неясного генеза. Кровь от больных в остром периоде (вторые-третьи сутки от начала заболевания) использовали для интрацеребрального заражения биопробных животных – новорожденных белых мышей (НБМ). Парные сыворотки крови больных исследовали на наличие антител класса М и G к десяти арбовирусам и штамму «Астрахань-12» в различных вариантах ИФА.

В работе использовали диагностические тест-системы ИФА, сахарозоацетоновые антигены (САА) и иммунные асцитные жидкости к вирусам КГЛ, ЛЗН, Тягиня, Инко, Синдбис, Батаи, Бханджа, Дхори, УкуниEMI и штамму № 913/64 производства ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России). При определении иммуноглобулинов класса М и G человека использовали антивидовые иммунопероксидазные конъюгаты (ИПК) производства НПО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск).

Результаты исследования и их обсуждение. Из тринадцати проб крови от больных острыми лихорадящими заболеваниями в начальном периоде болезни изолированы два штамма вируса Лихорадки Западного Нила и выделен вирусный изолят № 12 (от больной Ш.), получивший впоследствии наименование «Астрахань-12».

Больная Ш., 9 лет, проживающая в г. Астрахани, заболела остро. Госпитализирована на второй день заболевания с диагнозом острая респираторная вирусная инфекция, нейротоксикоз. Клиническими признаками инфекции были: лихорадка 38,5° С в течение 4 суток, головная боль, рвота, катаральные явления в ротоглотке, увеличение печени на 1,5 см. В крови лейкопения, увеличение СОЭ, биохимические признаки поражения печени (билирубин 35 мкмоль с преобладанием прямой фракции, АЛТ-2,1 мкмоль). Маркеры вирусных гепатитов не обнаружены, моча и копрограмма без изменений. Клинический диагноз – вирусный гепатит недифференцированный. Из эпиданамнеза: проживает в частном секторе пригорода Астрахани, отмечает постоянные контакты с домашними животными, птицами, кровососущими насекомыми.

На 2 и 12 день заболевания у больной проводили забор крови для клинических лабораторных исследований. Часть материала была передана в лабораторию экологии и индикации возбудителей природно-очаговых инфекций ФГУЗ «Астраханская противочумная станция» Роспотребнадзора. Из кровяного сгустка в лаборатории приготовили 10 % суспензию на растворе Хенкса с антибиотиками, центрифугировали материал 15 мин при 8 000 об/мин на холоде. Надосадочную жидкость использовали для интрацеребрального заражения 2–3-дневных НБМ и исследования в ИФА. Антигены вирусов КГЛ, ЛЗН, Тягиня, Инко, Синдбис, Батаи, Бханджа, Дхори, УкуниEMI и штамма № 913/64 не выявлены. На 7 сутки у части биопробных животных появились признаки инфицирования – анорексия, адинамия, судороги, параличи задних конечностей. Мозг больных животных использовали для последующих пассажей. К восьмому пассажу был закреплен инкубационный период (6 суток), определена патогенность для 2–3-дневных НБМ ($\lg LD_{50}/мл - 5,62$) и проведено накопление вирусосодержащего материала. Из вирусосодержащей суспензии мозга НБМ готовили антиген методом сахарозоацетоновой экстракции по общепринятой методике. Затем леофильно высушенный антиген тщательно гомогенизировали и добавляли 0,05 М карбонат-бикарбонатный буфер (КББ) pH = 9,6 из расчета 0,5 мл на один мозг. Смесь инкубировали 18 часов на холоде при постоянном перемешивании и цен-

трифугировали 1 час при 10 000 об/мин. Концентрацию антигена проводили добавлением к супернатанту до 4 % полиэтиленгликоля (ПЭГ 6000 «Serva»). Инкубировали смесь 2 часа при 4° С, периодически перемешивая. После центрифугирования (на холоде в течение 1 часа при 10 000 об/мин) осадок тщательно ресуспендировали в 0,05 М КББ pH = 9,6 в объеме из расчета 0,2 мл на один изначально взятый мозг. Очищенный антиген разливали по 100 мкл в микропробирки и хранили при -70° С. Первичную идентификацию вирусного изолята «Астрахань-12» проводили в прямом варианте ИФА. Планшеты Flow Laboratories (Англия) в течение 18 часов при 4° С сенсибилизировали очищенным антигеном вируса «Астрахань-12» в разведении 1 : 100 на 0,05 М КББ pH = 9,6. После трехкратной промывки 0,15 М фосфатно-солевым буферным раствором (pH = 7,4), содержащим 0,1 % твина-20 (ФБР-Т), в лунки вносили 1 % альбумин по 200 мкл и инкубировали 1 час при 37° С. Планшеты трижды отмывали раствором ФБР-Т. В вертикальные ряды планшет вносили по 100 мкл иммунных асцитных жидкостей (ИАЖ) к вирусам штаммов, № 913/64, ЛЗН, КГЛ, Тягиня, Инко, Синдбис, Батаи, Бхаджа, Дхори, Укуниими и нормальные иммуноглобулины мышей, в разведениях от 1 : 500 до 1 : 64 000 на растворе ФБР-Т-альбумин. После инкубации в течение 1 часа при 37° С и трехкратной промывки в каждую лунку планшета добавляли по 100 мкл антимишинного иммунопероксидазного конъюгата к Ig G (H- и L- цепям) мышей производства ГУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» РАМН в рабочем разведении. Планшеты инкубировали 1,5 часа при 37° С, затем пятикратно по 3 мин промывали раствором ФБР-Т и подсушивали на воздухе. В лунки вносили по 100 мкл субстрат-индикаторной смеси: фосфат-цитратного буфера pH = 5,0, содержащего 0,4 мг/мл ортофенилендиамина «Sigma» и 0,006 % перекиси водорода. Реакцию останавливали по мере проявления окраски через 20–30 мин добавлением 50 мкл 4 н раствора серной кислоты. Учет результатов проводили на автоматическом иммуноферментном анализаторе – АИФЦ-01С (Россия). За титр реакции принимали максимальное разведение ИАЖ, при котором оптическая плотность в 2,1 раза превышала таковую в отрицательном контроле.

При серологической идентификации штамма «Астрахань-12» в прямом ИФА было установлено, что антигены вируса тесно взаимодействуют с ИАЖ к штамму № 913/64 при разведении до 1 : 64 000, с ИАЖ к штамму № 913/64 при разведении до 1 : 32 000. Антигены вируса «Астрахань-12» слабо взаимодействовали с поликлональными ИАЖ к вирусу ЛЗН в разведении 1 : 500 и не реагировали с коммерческими препаратами ИАЖ к представителям других родов арбовирусов и нормальными иммуноглобулинами мышей. Для определения общности антигенной структуры вируса «Астрахань-12», вирусов ЛЗН и штамма № 913/64 использовали непрямой вариант ИФА с коммерческими тест-системами производства ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России). Для этого лунки планшетов сенсибилизировали иммуноглобулинами из ИАЖ к вирусам ЛЗН и штамма № 913/64. После промывки и блокировки свободных участков альбумином в параллельные ряды вносили разведения от 1 : 200 до 1 : 12 800 САА вирусов «Астрахань-12», ЛЗН и штамма № 913/64, приготовленных по единой методике и стандартизованных по белку (100 мкг/мл). Связавшиеся антигены выявляли ИПК к вирусам ЛЗН и штамма № 913/64. В тест-системе ИФА к вирусу ЛЗН гомологичные антигены выявляли в разведении 1 : 12 800, антигены вируса «Астрахань-12» только 1 : 200, антигены штамма № 913/64 и нормальные мозговые антигены (отрицательный контроль) не выявляли. В тест-системе к вирусу штамм № 913/64 выявляли только гомологичные антигены в титре 1 : 6 400 и антигены вируса «Астрахань-12» в разведении 1 : 3 200.

Заключение. На основании полученных данных можно сделать предположение о наличии глубоких антигенных связей вируса «Астрахань-12» с группой неклассифицированных арбовирусов, выделенных ранее из объектов окружающей среды, представленных штаммами № 913/64. В то же время изолированный из крови лихорадящего больного вирус «Астрахань-12» отличается от них по своим биологическим свойствам. При исследовании клинического материала от 56 больных детей у 14 (25 %) выявлены антитела к вирусу «Астрахань-12» и диагностическая динамика их титров. Изоляция этиологического фактора заболевания и выявление антител в сыворотках крови больных с характерными клиническими проявлениями делают возможным выделение новой нозологической формы инфекционной патологии – Астраханской арбовирусной инфекции.

Список литературы

1. Гришанова, А. П. Серологическая диагностика арбовирусных инфекций в Астраханской области в 1999–2000 гг. / А. П. Гришанова, А. Р. Азарян, Т. Е. Инкина // Природно-очаговые особо опасные инфекции на юге России их профилактика и лабораторная диагностика. – Астрахань : ГП АО «ИПК Волга», 2001. — С. 313–315.

2. Львов, Д. К. Выделение вируса лихорадки Западного Нила от больных людей в период эпидемической вспышки в Волгоградской и Астраханской областях / Д. К. Львов, А. М. Бутенко, О. П. Вышемирский // Вопросы вирусологии – 2002. – № 3. – С. 9–12.

3. Львов, Д. К. Лихорадка Западного Нила / Д. К. Львов, В. Б. Писарев, В. А. Петров, Н. В. Григорьева. – Волгоград : ГУ Издатель, 2004. – 101 с.

Журавлев Виталий Иванович, кандидат медицинских наук, научный сотрудник, ФГУЗ «Астраханская противочумная станция» Минздрава России, Россия, 414000, г. Астрахань, ул. Кубанская, д. 3, тел.: (8512) 33-37-00, e-mail: antichum@astranet.ru.

Харченко Геннадий Андреевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой детских инфекций, ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздрава России, Россия, 414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, д. 121, тел.: (8512) 31-05-46, e-mail: agma@astranet.ru.

Кимирилова Ольга Геннадьевна, кандидат медицинских наук, ассистент кафедры детских инфекций, ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздрава России, Россия, 414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, д. 121, тел.: (8512) 31-05-46, e-mail: agma@astranet.ru.

УДК616.24-002.191-053.3

© С.А. Красовский, Д.Ф. Сергиенко, А.А. Степанова, Н.В. Петрова, 2013

С.А. Красовский¹, Д.Ф. Сергиенко², А.А. Степанова³, Н.В. Петрова³

ГЕНО-ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ У ВЗРОСЛЫХ БОЛЬНЫХ МУКОВИСЦИДОЗОМ

¹ФГУ «Научно-исследовательский институт пульмонологии» ФМБА России

²ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздрава России

³ФГБУ «Медико-генетический научный центр» РАМН, г. Москва

Определено, что для «тяжелых» генотипов муковисцидоза характерно раннее установление диагноза, наоборот, при «мягком» генотипе – более позднее, преимущественно в подростковом и зачастую во взрослом возрасте. В структуре грамотрицательной флоры определена большая частота высева *Burkholderia cepacia* (В. серасия) среди пациентов с «тяжелым» генотипом. Не выявлено различий между «мягкими» и «тяжелыми» генотипами по респираторному и нутритивному статусу, частоте бронхолегочных осложнений, желчекаменной болезни и остеопороза. Сахарный диабет, цирроз печени, кишечная непроходимость встречались только у «тяжелых» генотипов.

Ключевые слова: муковисцидоз, «мягкие» генотипы, «тяжелые» генотипы, гено-фенотипические связи.

S.A. Krasovskiy, D.F. Sergienko, A.A. Stepanova, N.V. Petrova

GENO-PHENOTYPE RELATIONSHIP IN ADULT PATIENTS WITH CYSTIC FIBROSIS

It was determined that the «heavy» cystic fibrosis genotypes characterized by early-tion established the diagnosis, on the contrary, with a «soft» genotype – later, mostly in sub-sprout and often in adulthood. The structure of the gram-negative flora of ethylene higher rate of seeding *Burkholderia cepacia* among patients with «severe» genotype was defined. The differences between «soft» and «severe» genotypes on respiratory and Nutritive-Nome status, incidence of bronchopulmonary complications of cholelithiasis and osteoporosis was not revealed. Diabetes, cirrhosis of the liver, intestinaobstruction were exclusive to the «heavy» genotypes.

Key words: cystic fibrosis, «mild» genotypes «severe» genotypes, genotype-phenotype relation.

Введение. Муковисцидоз (МВ) – наследственная патология с аутосомно-рецессивным типом наследования, обусловленная мутацией гена МВ, которая приводит к нарушению функции расположенного в апикальной части мембран экзокринных желез хлорного канала. Секрет экзокринных желез приобретает чрезмерную вязкость и обезвоженность, что обуславливает ряд патологических про-