

НОВЫЙ ПОДХОД К АЛЛЕРГОДИАГНОСТИКЕ БРУЦЕЛЛЕЗА

Д.Г. Пономаренко¹, О.В. Логвиненко¹, Н.С. Саркисян¹, Е.Л. Ракитина¹,
О.Г. Голубь², А.Н. Куличенко¹

¹ ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь

² МБУЗ Городская клиническая больница № 2, г. Ставрополь

Резюме. Предложен новый цитометрический метод лабораторной диагностики бруцеллеза в условиях *in vitro*, основанный на определении повышенной чувствительности организма к бруцеллам. Тест позволяет дифференцировать вакцинный и инфекционный процессы при хроническом бруцеллезе, производить количественный учет степени сенсибилизации к бруцеллам и, соответственно, может быть использован для оценки напряженности поствакцинального иммунитета перед повторной иммунизацией против бруцеллеза. Использование метода проточной цитометрии при постановке теста исключает добавочное антигенное воздействие на организм и позволяет проводить постановку и учет реакции в течение 1 часа.

Ключевые слова: бруцеллез, аллергодиагностика, проточная цитометрия.

A NEW APPROACH TO BRUCELLOSIS ALLERGODIAGNOSTICS

Ponomarenko D.G., Logvinenko O.V., Sarkisian N.S., Rakitina C.L., Golub O.G., Kulichenko A.N.

Abstract. The new cytometric method for laboratory diagnosis of brucellosis *in vitro* conditions based on detection of hypersensitivity to *Brucella* has been developed. This test allows to differentiate vaccinal and infectious processes in case of chronic brucellosis, and to measure the level of patient sensibilization to *Brucella*. Thus, the test might be used to estimate intensity of post-vaccination immunity before re-immunization against brucellosis. Using of flow cytometry in the test excludes additional antigenic influence on human organism and allows to provide testing within 1 hour. (*Infekc. immun.*, 2013, vol. 3, N 1, p. 89–92)

Key words: brucellosis, allergic diagnostics, flow cytometry.

В результате взаимодействия организма с аллергенами (антигенами) возникает сенсибилизация — повышенная специфическая чувствительность, которая используется в лабораторной диагностике как маркер, указывающий на имевшийся контакт организма с чужеродными субстанциями [8, 10].

Для выявления сенсибилизации организма разработан комплекс методов, включающий кожные пробы и аллергологические тесты *in vitro*. С целью определения аллергической перестройки организма наиболее часто применяют кожное аллерготестирование. Однако его использование сопряжено с риском возникновения общих и местных реакций на дополнительную антигенную нагрузку. Не рекомен-

дуется постановка кожных аллергических проб детям до трех лет и беременным [8, 9].

Кожно-аллергическая проба с бруцеллином, так называемая проба Бюрне, была разработана и применяется со второй половины XX века. Согласно методическим указаниям МУ 3.1.7.1189-03 кожно-аллергические тесты используются для лабораторной диагностики бруцеллеза, а также с целью определения напряженности поствакцинального иммунитета перед повторной иммунизацией [2, 5, 9].

Постановка аллергических тестов с бруцеллином имеет ряд недостатков. У лиц высоко сенсибилизированных к бруцеллезному антигену возможно развитие реакции в виде повышения температуры, озноба, головной боли, лимфан-

поступила в редакцию 25.12.2012
принята к печати 18.02.2013

© Пономаренко Д.Г.
и соавт., 2013

Адрес для переписки:

Пономаренко Дмитрий Григорьевич,
к.б.н., зав. лабораторией патоморфологии
особо опасных инфекционных
заболеваний ФКУЗ Ставропольский
противочумный институт
Роспотребнадзора

355035, г. Ставрополь, ул. Советская, 13-15,
ФКУЗ Ставропольский противочумный
институт Роспотребнадзора.
Тел.: (8652) 26-18-19 (служебн).
Тел./факс: (8652) 26-03-12.
E-mail: patomorf@yandex.ru, dich@nm.ru

гита, артралгии и т.д. К недостаткам можно отнести риск возникновения ложноположительного результата при наличии аллергии и других иммунопатологических состояний; учет реакции осуществляется через 24–48 часов [5].

С конца XX века и по настоящее время ведутся исследования, направленные на замену инвазивных аллергических тестов на более безопасный и высокоспецифичный метод оценки аллергической перестройки организма *in vitro*. Предложенные к использованию тесты, такие как радиоаллергосорбентный, метод микроскопической оценки дегрануляции базофилов при окраске щелочными красителями, определение концентрации освобожденного гистамина (метод Шелли), реакция лейкоцитолита (тест аллергической альтерации лейкоцитов), выявления специфических иммуноглобулинов Е имеют ряд ограничений, обусловленных или трудоемкостью, или низкой чувствительностью и слабой специфичностью [6, 7, 14, 15].

В 1994 г. Sainte-Laudu et al. впервые предложили определение дегрануляции базофилов методом проточной цитометрии [15]. Сущность теста сводится к тому, что при внесении в пробу известного аллергена, при наличии сенсибилизации, он взаимодействует со специфическими молекулами IgE, которые связаны с поверхностными рецепторами базофилов. Это инициирует каскад ферментных реакций, приводящих к дегрануляции эффекторной клетки с экспрессией маркера клеточной перестройки CD63 (gp53). Благодаря используемой технологии CAST® (Cellular Antigen Stimulation Test, тест антигенной стимуляции клеток), способ обладает высокой специфичностью по сравнению с классическими методиками.

Целью исследований явилось изучение возможности применения теста активации базофилов для выявления повышенной чувствительности организма к бруцеллам.

Исследовали кровь 92 человек. Из них — 26 человек больных острым и 16 — хроническим бруцеллезом, 12 человек, вакцинированных *Brucella abortus* 19 VA (на 30–35 сутки после иммунизации). С целью определения специфичности и чувствительности используемого метода исследовали кровь беременных — 7 человек (31–33 неделя беременности), 19 обследованных в возрасте от 2-х до 37 лет с проявлениями аллергии в анамнезе, контрольную группу составили 12 человек, не имевших в анамнезе симптомов аллергии, не переболевших бруцеллезом и не вакцинированных против этой инфекции.

Экспрессию на базофилах CD63 определяли на проточном цитометре FACSCalibur (США), используя набор моноклональных антител Buhlmann laboratories (Швейцария). Для определения фонового значения использовали «буфер для стимуляции» (Flow 2 CAST). При учете

результата значение фоновой пробы вычитали из аналогичного показателя при стимуляции антигеном. Полученные цифровые данные отражают процент активированных базофилов.

В качестве специфического антигена использовали аллерген бруцеллезный жидкий (Бруцеллин) производства ФГУП «НПО Микроген» (Россия).

Обеззараживание исследуемого материала от больных бруцеллезом людей осуществляли в соответствии с СП № 1.3.1285-03 путем добавления к исследуемой пробе мертиолята натрия до конечной концентрации 1:10 000 с последующим прогреванием при 56°C в течение 30 мин [1].

Полученные результаты обрабатывали статистически с помощью компьютерной программы Microsoft Excel 2010. С учетом малой выборки ($n < 30$) для выявления статистической значимости различий результатов использовали t-критерий Стьюдента при уровне надежности $P \geq 0,95$ [11].

В контрольной группе и у людей, имеющих в анамнезе аллергию, исследуемый показатель находился в пределах от 0 до 5% при среднем значении $2,17 \pm 0,45$ и $2,43 \pm 0,42\%$ соответственно. В группе беременных среднее количество активированных бруцеллином базофилов составило $2,57 \pm 0,49\%$ при вариации от 0 до 4%. При постановке теста активации базофилов с бруцеллином достоверных различий в показателях у беременных, у лиц имеющих в анамнезе аллергопатологию и у лиц контрольной группы не установлено, в связи с этим они были объединены в контрольную группу.

Проведенные исследования показали, что у больных хроническим бруцеллезом количество активированных бруцеллином базофилов находилось в пределах от 32 до 57% и в среднем составляло $38,15 \pm 3,96\%$ ($P \geq 0,95$). У больных острой формой заболевания выявили от 10 до 17% дегранулированных базофилов, среднее значение — $12,9 \pm 2,04\%$ ($P \geq 0,95$). В группе иммунизированных против бруцеллеза, количество детектируемых клеток варьировало от 9 до 19% и в среднем составило $14,7 \pm 2,83\%$ ($P \geq 0,95$) (рис.)

При проведении исследований установлено, что у больных острой формой бруцеллеза количество активированных бруцеллином базофилов более чем в 5 раз превышало значения контрольной группы. В случае хронического течения заболевания и у иммунизированных пациентов выявляли увеличение определяемых клеток в 16 и 9 раз соответственно относительно контрольного уровня. У больных острым бруцеллезом и у вакцинированных исследуемый показатель был в 3,7 и 2 раза ниже, чем у пациентов с хронической формой заболевания.

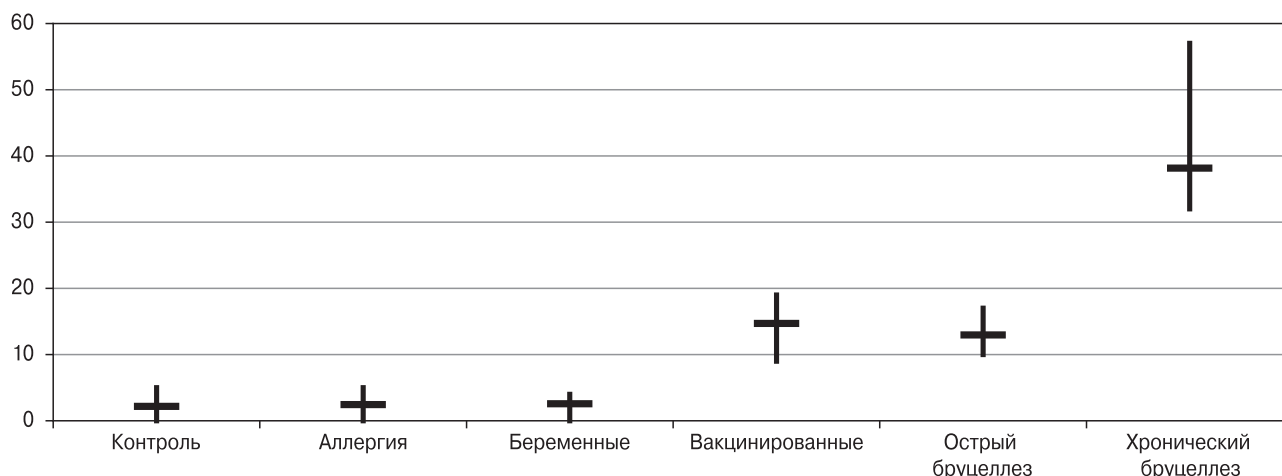


Рисунок. Анализ диапазонов значений активации базофилов в группах сравнения

Используемая технология CAST обеспечивает высокую специфичность метода, а полученные результаты указывают на перспективу применения аллергического теста *in vitro* для диагностики бруцеллеза. Преимуществом метода является возможность количественной оценки степени сенсибилизации организма, получение результатов в течении одного часа от начала исследования. Предложенная методика исключает добавочное антигенное воздействие на организм, что предупреждает возникновение осложнений, связанных с дополнительной аллергизацией организма, и может быть использована как полноценная альтернатива классического метода — пробы Бюрне.

Количество активированных бруцеллином базофилов в крови иммунизированных против бруцеллеза и больных хронической формой этой инфекции имеет статистически значимые различия ($P > 0,05$), следовательно, тест активации базофилов позволяет дифференцировать вакцинный и инфекционный процессы при хроническом бруцеллезе.

Широкий диапазон колебания полученных данных в группе иммунизированных и пациентов с острой формой инфекции указывает на то, что дифференциация степени аллергической перестройки организма при остром бруцеллезе и после вакцинации, с помощью теста активации базофилов, возможна только с учетом комплекса клинических и лабораторных исследований.

Иммунитет при ряде инфекций, например при бруцеллезе, не может формироваться без аллергических реакций [3, 4, 10, 13, 14]. Степень сенсибилизации организма может выступать как показатель устойчивости к данной инфекции [3, 15]. Предлагаемый нами метод позволяет производить количественный учет уровня чувствительности к бруцеллам и, соответственно, может быть использован для оценки напряженности поствакцинального иммунитета перед повторной иммунизацией против бруцеллеза.

Таким образом, предложенный метод лабораторной диагностики бруцеллеза, а также способ оценки напряженности поствакцинального иммунитета против бруцеллеза в условиях *in vitro*, является перспективным и может быть внедрен в практику лабораторных исследований при бруцеллезе как альтернатива пробе Бюрне и для определения показаний к вакцинации.

Список литературы

1. Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности). Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.1285-03 / Бюллетень нормативных и методических документов Госсанэпиднадзора. — Вып. 3 (13). — М., 2003. — С. 67–144.
2. Богачева Н.В., Дармов И.В., Елагин Г.Д., Крючков А.В., Тихвинская О.В. Современные лабораторные методы оценки эффективности проведения иммунизации против опасных и особо опасных инфекций // Клиническая лабораторная диагностика. — 2011. — № 6. — С. 39–42.
3. Вершилова П.А., Чернышова М.И., Князева Э.Н. Патогенез и иммунология бруцеллеза. — М., 1974. — 271 с.
4. Галактионов В.Г. Иммунология. — М., 2004. — 528 с.
5. Инструкция по применению аллергена бруцеллезного жидкого (бруцеллина), раствор для внутрикожного введения: № 01-11/198-06: утверждена Главным государственным санитарным врачом РФ Г.Г. Онищенко 22.11.06. — М., 2006.
6. Куличенко А.Н., Ракитина Е.Л., Пономаренко Д.Г., Логвиненко О.В., Рязанова А.Г. Использование теста активации базофилов с антраксином для лабораторной (*in vitro*) диагностики сибирской язвы // Проблемы особо опасных инфекций. — Вып. 3 (113). — С. 86–88.
7. Новиков П.Д., Новикова Н.Д. Диагностика аллергии в реакции выброса миелопероксидазы под влиянием аллергена // Иммунопатология,

- аллергология, инфектология. — 2002. — № 1. — С. 63–68.
8. Иммунопатология и аллергология. Алгоритмы диагностики и лечения / под ред. Р.М. Хаитова. — М.: ГЭОТАР-МЕД, 2003. — 112 с.
 9. Профилактика и лабораторная диагностика бруцеллеза людей: МУ 3.1.7.1189-03: утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 30.01.2003).
 10. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология: [пер. с англ.]. — М.: Мир, 2000. — 592 с.
 11. Урбах В.Ю. Биометрические методы. — М.: Наука, 1964. — 410 с.
 12. Almajid F.M. Lymphocyte activation test for diagnosis of seronegative brucellosis in humans // *Indian J. Pathol. Microbiol.* — 2011. — Vol. 54(4). — P. 775–781.
 13. Bercovich Z. The use of skin delayed-type hypersensitivity as an adjunct test to diagnose brucellosis in cattle: a review // *Vet Q.* — 2000. — Vol. 22(3). — P. 123–130.
 14. Boura P., Skendros P., Kountouras J., Zacharioudaki E., Tsapas T. Effect of bacterial extracts on the immunologic profile in chronic relapsing brucellosis patients // *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* — 1999. — Vol. 12(2). — P. 103–111.
 15. De Weck A.L., Sanz M.L., Gamboa P.M., Jeremann J.M., Kowalski M., Medrala W., Sainte-Laudy J., Schneider M.S., Weber J.M., Wolanczyk-Medrala A. Nonsteroidal anti-inflammatory drug hypersensitivity syndrome: a multicenter study. II. Basophil activation by nonsteroidal anti-inflammatory drugs and its impact on pathogenesis // *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* — 2010. — Vol. 20(1). — P. 39–57.