

ЭФФЕКТИВНОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ РЕАКЦИЙ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ И ТЕСТА АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИХ ЛИМФОЦИТОВ В ДИАГНОСТИКЕ БРУЦЕЛЛЕЗА У ЛЮДЕЙ

Каральник Б.В., Денисова Т.Г., Жунусоправила для авторов
Для рассмотрения возможности публикации статьи в журнале «Медицинская иммунология» она должна быть

подготовлена в полном соответствии с нижеперечисленными

Научный центр гигиены и эпидемиологии, Алматы, Казахстан;

правилами. В случае существенных отклонений от правил

редакция не рассматривает присланные материалы и оповещает

о этом авторов не позднее чем через 1 месяц со дня

их получения. Все материалы должны быть присланы заказ-

но, что специфичность всех реакций определения антител с коммерческими реагентами и ИФА одинако-

ва. Губернаторность теста, ЕСМ-пробы и т.д. являются не всех реакций определения антител. Метод ИСЛ име-

ет преимущества перед методами определения антител: он позволяет вести ранний контроль эффективно-

сти лечения бруцеллеза и дифференцировать положительные и ложноположительные результаты опреде-

ления антител у беременных.

197089, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6/8,

Санкт-Петербургское Региональное Отделение Российской Ассоциации лимфоциты.

Аллергологов и Клинических Иммунологов, Тотоляну Арегу Артемовичу

Karalnik B.V., Denisova T.G., Zhunusova G.B., Fedosov S.A., Zhankin A.A., Ospanov K.S., Mizanbaieva S.U.

EFFICIENCY OF DIFFERENT TECHNIQUES FOR ANTIBODY DETERMINATION AND TESTING

OF ANTIGEN-BINDING LYMPHOCYTES IN DIAGNOSTICS OF BRUCELLOSIS

Abstract. The aim of this study was to compare the efficiency of different methods applied for the diagnostics

Подготовка и материалы light reactions, RoseBengal test, ELISA-based test system (IgG determination),

and a test for antigen binding lymphocytes (ABL) were used. There was shown that the specificity of tests was

identical for all the reactions based on detection of antibodies with commercial immune reagents and ELISA-IgG

The sensitivity of ABL test is lower than that of all the reactions based on antibody determination. The ABL

test is more useful for early diagnosis of brucellosis, since early terms of disease may be regarded as positive and false

2. название учреждения, где работает автор (Med. Immunol., 2006, vol.8, № 4, pp 567-572)

3. Почтовый адрес для переписки (с указанием почтового индекса).

В таблицах, рисунках, графиках, фотографиях и т.д. необходимо использовать

при использовании таблицы, рисунка, фотографии и т.д. необходимо использовать

тупе. При подготовке к печати необходимо использовать оригиналы рисунков, таблиц и т.д.

(Хаджисидерис Райт, Рамадана Садат, Чошубекулова М.С., Денисова Т.Г., Каральник Б.В., Жунусоправила для авторов)

(ИФА, ПЦР) в широкой практике не используют, однако их применение может оказаться перспективным.

Нами разработан стабильный иммунореагент для определения антигенсвязывающих лимфоцитов

(АСЛ), специфичных к липополисахаридам (ЛПС) бруцелл [1] и характеристика эффективности метода

на примере АСЛ в диагностике бруцеллеза. [2, 3].

Показано, что эффективность теста АСЛ выше, чем

дифференциальный вариант должен быть подготовлен в

формате 95. Типичный вариант, различие, может быть

каждый из рисунков и каждая из таблиц располагают-

ся на дискете в отдельных файлах.

Текст статьи необходимо отпечатать на одной стороне листов формата А4 (бумага белая, плотностью не менее 80 г/см³), через 2 интервала, с полями со всех сторон по 2,5 см и обязательной нумерацией страниц. Количество знаков на странице не должно превышать 1800 (т.е. 30 строк по 60 знаков, включая знаки препина-

Адрес для переписки:

Каральник Борис Вольфович

050035, Казахстан, Алматы, 11 микрорайон, д.4, кв. 16.

Тел.: 8 (3272) 996-831.

E-mail: bvkz@nursat.kz

определение общей активности антител реакциями Хаддлсона, Райта, РозБенгал; IgG антител при помощи ИФА и выявление АСЛ.

Материал и методы

Всего обследовали 115 больных бруцеллезом (109 – хроническим и 5 – острым, у 1 больного стадия заболевания не указана), 11 переболевших бруцеллезом, получивших курс лечения фторхинолоновыми препаратами (10) или гентамицином (1) и 5 беременных в связи с положительными или слабopоложительными результатами реакций Хаддлсона или Райта.

Применяли реакции Хаддлсона, Райта, РозБенгал тест (все с коммерческими реагентами), ИФА с разработанной нами IgG тест-системой и тест АСЛ с ранее разработанным препаратом [1].

В работе использовали различные статистические методы сравнения серий, корреляционно-регрессионного и дисперсионного анализа, анализа соответствия результатов различных тестов [6].

Результаты и обсуждение

В первую очередь мы сопоставили эффективность наиболее часто применяемых методов определения общей активности антител. Результаты определения у 89 больных с диагнозом бруцеллеза (из них 85 – с диагнозом хронического бруцеллеза, 3 – острого, у 1 больного стадия заболевания не указана) представлены в таблице 1. Анализ показал, что реакция Райта оказалась достоверно ($P=0,031$) менее чувствительной, в 1,3 раза, чем реакция Хаддлсона, и достоверно ($P=0,013$) менее чувствительной, в 1,4 раза, чем РозБенгал тест. Существенных раз-

личий между чувствительностью реакции Хаддлсона и РозБенгал теста на нашем материале выявить не удалось ($P=0,108$).

Важно оценить, в какой степени результаты этих тестов соответствуют друг другу. Расчет критерия соответствия (χ^2) результатов любой пары из этих трех тестов показал, что χ^2 результатов реакций Хаддлсона и Райта равен 41,92; результатов реакций Хаддлсона и РозБенгал теста – 66,70; реакций Райта и РозБенгал – 43,35. Во всех случаях соответствие результатов высоко достоверно ($P<0,001$). Такой высокий уровень соответствия отражает практически одинаковую специфичность сопоставляемых тестов.

Далее выполнили корреляционно-регрессионный анализ зависимости результатов одного из тестов от результатов другого. При таком анализе учитывается не только соответствие между одинаковыми результатами, но принимается во внимание и интенсивность каждого сравниваемого теста. Полученные результаты приведены в таблице 2. Видно, что результаты каждого из трех тестов определения антител высокозначимо зависят от результатов любого из двух других тестов. Выявленная зависимость подтверждает практически одинаковую специфичность сравниваемых тестов.

Затем мы провели оценку диагностической эффективности пока мало используемого ИФА для определения IgG антител к ЛПС бруцелл и сравнительно нового теста выявления АСЛ с разработанным ранее иммунореагентом той же специфичности. Учитывая, что использовали новую разработанную ИФА тест-систему, важно вначале определить оптимальное разведение тестируемых сывороток. С этой целью каждую из 52 сывороток анализировали в двух разведениях – 1:25 и 1:50. Положитель-

Табл. 1. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ РУТИННЫХ ТЕСТОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ

Реакция	Обследовано больных	Больные с положительным результатом	Частота положительного результата, %
Хаддлсона	89	46	51,7±5,3
Райта	89	35	39,3±5,2
РозБенгал	89	49	55,1±5,3

Табл. 2. РЕЗУЛЬТАТЫ КОРРЕЛЯЦИОННО-РЕГРЕССИОННОГО АНАЛИЗА ЗАВИСИМОСТИ МЕЖДУ РЕЗУЛЬТАТАМИ ТЕСТОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОБЩЕЙ АКТИВНОСТИ АНТИТЕЛ

Анализ регрессии	Статистические показатели		
	$b \pm S_b$	r	P
Логарифма титра реакции Райта по интенсивности реакции Хаддлсона	0,188±0,025	0,614	<0,001
Логарифма титра реакции Райта по интенсивности РозБенгал теста	0,153±0,021	0,622	<0,001
Интенсивности РозБенгал теста по интенсивности реакции Хаддлсона	0,857±0,046	0,895	<0,001

$b \pm S_b$ – коэффициент регрессии и его средняя квадратическая ошибка; r – коэффициент корреляции; P – вероятность нуль-гипотезы

ные результаты ИФА при диагнозе бруцеллеза получены одинаково часто в обоих разведениях – у 39 обследованных (75,0±6,0%), в том числе у 19 из 25 больных с диагнозом «бруцеллез», обследованных до или в первые дни лечения (76,0±8,5%); у 10 из 10 переболевших, обследованных через 1 – 12 месяцев после окончания лечения. Совпадение результатов (положительных и отрицательных) ИФА при обоих разведениях сывороток оказалось полным ($\chi^2 = 52,0$; $P < 0,001$). Такое совпадение имело место независимо от диагноза у обследованных.

Однако привлекает внимание, что величина оптической плотности (ОД) при тестировании каждой из 52 сывороток в разведении 1:25 несколько выше, чем при разведении 1:50. Анализ этого различия методом связанных выборок показал достоверность ($P < 0,001$) такого превышения ($0,033 \pm 0,004$). При этом в 39 сыворотках с положительным результатом ИФА превышение оказалось существенно ($P < 0,001$) большим ($0,044 \pm 0,004$), чем в 13 сыворотках с отрицательным результатом ИФА ($0,0029 \pm 0,0009$). Выявленное различие между группами положительных и отрицательных сывороток с положительным и отрицательным результатами ИФА показывает, что оно не связано с ролью неспецифических факторов, а обусловлено антителами к бруцеллезному ЛПС. Несущественная роль неспецифических факторов в вышеописанном превышении подтверждается также практически одинаковой ($P > 0,05$) средней величиной ОД при контроле конъюгата ($0,0312 \pm 0,0001$) и средней величиной превышения ОД разведения сывороток 1:25 над ОД сывороток в разведении 1:50 ($0,0334 \pm 0,0039$). Исходя из приведенных данных, следует считать, что тестирование сывороток в разведении 1:25 имеет определенное преимущество по чувствительности ИФА перед тестированием разведения 1:50.

Далее сопоставили эффективность двух методов выявления антител – реакции Хаддлсона и ИФА в IgG тест-системе. Полученные результаты приведены в таблице 3. Результат реакции Хаддлсона оце-

нивали как положительный при интенсивности агглютинации не менее 3+. Такой результат получен у 33 из 52 обследованных (63,5±6,7%).

Положительный результат ИФА получен у 39 из тех же 52 обследованных (75,0±6,0%). При анализе общей выборки удалось обнаружить лишь тенденцию ($P = 0,076$) к большей чувствительности ИФА. При этом выявлено высокозначимое соответствие между результатами двух тестов ($\chi^2 = 30,11$; $P < 0,001$). Это соответствие является следствием того, что совпадение результатов двух реакций получено существенно ($P = 2,61 \cdot 10^{-16}$) чаще – в 46 случаях, чем расхождение – в 6 случаях. Характерно, что расхождение результатов выявлено только при интенсивности реакции Хаддлсона 2+. Такой результат агглютинационного теста получили у 7 обследованных, у 6 из них ($85,7 \pm 13,2\%$) результат ИФА оказался положительным, что демонстрирует более высокую чувствительность ИФА.

Корреляционно-регрессионный анализ зависимости ОД при разведении сывороток 1:25 от результата реакции Хаддлсона (в крестах) показал высокозначимую ($P \leq 0,001$) корреляцию ($r = 0,935$) с коэффициентом регрессии ОД в ИФА по интенсивности реакции Хаддлсона $0,145 \pm 0,008$. Результаты этого анализа, как и выявление высокозначимого соответствия по критерию χ^2 , отражают практически одинаковую специфичность этих двух тестов. С учетом показанной выше одинаковой специфичности реакций Хаддлсона, Райта и РозБенгал теста можно заключить, что специфичность всех использованных в данной работе реакций определения антител одинакова. Известно, однако, что в агглютинационных тестах активны антитела двух изоформ – IgM и IgG, а в ИФА с разработанной тест-системой выявляют только IgG антитела. Но, поскольку при исследовании сывороток в нашей выборке вклад IgM антител в агглютинацию не мог быть значительным (острый бруцеллез диагностировали только у 2 из 26 больных бруцеллезом), более высокая чувствительность ИФА-IgG в сравнении с реакцией

Табл.3. СРАВНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ ХАДДЛСОНА И ИФА-IgG

Результат ИФА	Количество сывороток с результатом реакции Хаддлсона				
	4+	3+	2+	1+	0
+	22	11	6	0	0
-	0	0	1	2	10

Табл.4. СРАВНИТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИМЕНЕНИЯ ТРЕХ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ТЕСТОВ

Диагноз	Частота положительных результатов теста			
	Хаддлсона	ИФА в разведении сывороток		АСЛ
		1:25	1:50	
Бруцеллез	17/23	17/22	17/22	22/23
Переболевшие бруцеллезом	9/11	10/10	10/10	1/11
Беременные	3/5	4/5	4/5	0/5

* - в числителе число положительных результатов, в знаменателе – число обследованных

Хаддлсона должна быть интерпретирована как более высокая чувствительность выявления IgG антигенов при помощи первого из этих тестов.

При обследовании при помощи реакции Хаддлсона, ИФА-IgG и теста АСЛ 23 больных бруцеллезом, 11 переболевших бруцеллезом; 5 беременных, направленных на обследование в связи с положительным или сомнительным результатом реакции Хаддлсона, получены результаты, приведенные в таблице 4. Анализ этих данных показал, что при обследовании больных бруцеллезом АСЛ выявлены чаще, в 1,3 раза, чем антитела по реакции Хаддлсона ($P = 0,043$).

Обнаружена тенденция к большей частоте положительного результата теста АСЛ и в сравнении с положительным результатом ИФА, независимо от анализируемого в ИФА разведения сывороток. Напротив, при обследовании переболевших АСЛ выявлены существенно реже, чем антитела по реакции Хаддлсона, в 8,2 раза ($P = 9,4 \cdot 10^{-4}$) или по ИФА, независимо от разведения сывороток ($P = 3,1 \cdot 10^{-5}$). Интересно отметить, что единственная переболевшая, у которой выявлены АСЛ (через 1 месяц после лечения), получила курс лечения гентамицином (неэффективным при бруцеллезе), в то время как остальных обследованных переболевших лечили

фторхинолоновыми препаратами (пемфлосацином или ципрофлоксацином). Сравнение степени агглютинации при постановке реакции Хаддлсона у обследованных больных и переболевших показывает, что частота менее выраженной агглютинации (+ и ++) больше у больных, а более выраженный (+++ и ++++) - у переболевших (рис).

Методом двухфакторного (роль особенностей обследованных – больные, переболевшие; роль метода определения антител – реакция Хаддлсона и ИФА в двух разведениях сыворотки) дисперсионного анализа удалось выявить значимое ($0,05 \geq P \geq 0,01$) увеличение частоты обнаружения антител у переболевших в сравнении с больными, в 1,3 раза (рис.). Кроме того, обнаружено, что средняя величина ОД при обследовании переболевших ($0,600 \pm 0,016$) достоверно ($0,05 > P > 0,02$) выше, чем у больных ($0,480 \pm 0,050$). Это доказывает продолжающееся после лечения увеличение активности антител. Частота обнаружения АСЛ при обследовании переболевших, наоборот, значимо ($8,8 \times 10^{-7}$), в 9,6 раза меньше, чем у больных. Эти результаты подтверждают полученные ранее данные о более быстром исчезновении АСЛ по сравнению с антителами после лечения бруцеллеза и сделанный вывод о возможности использова-

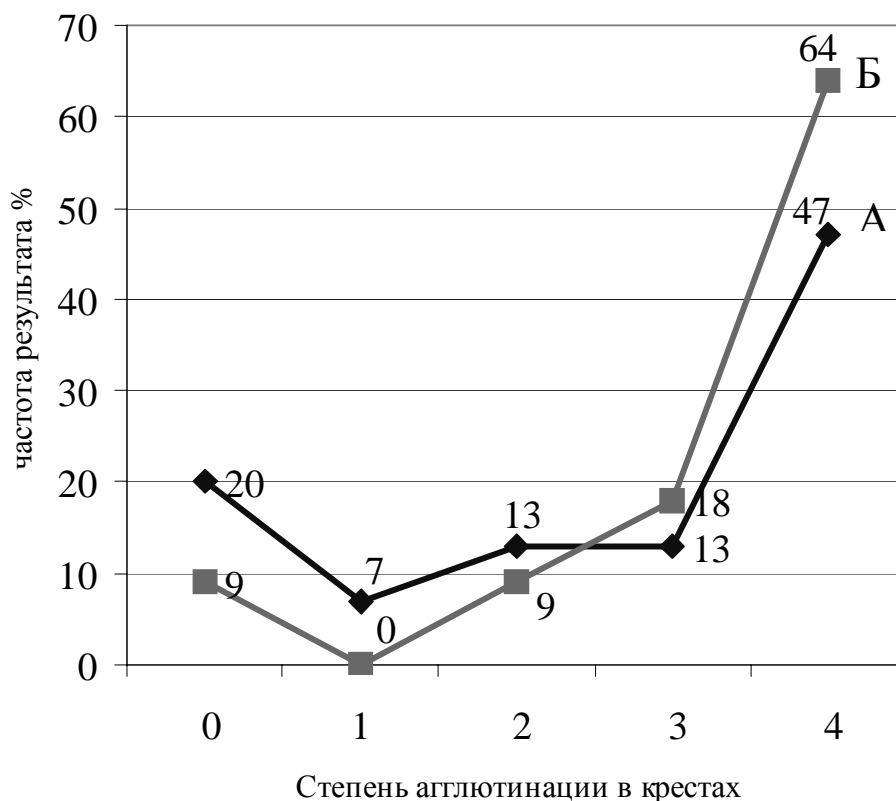


Рис. Распределение результатов реакции Хаддлсона по степени агглютинации у больных бруцеллезом (А) и переболевших (Б). По оси X – степень агглютинации в крестах; по оси Y – частота результата.

ния теста АСЛ для ранней оценки эффективности лечения [7].

Пять беременных обследованы на основании того, что ранее в течение беременности у них были выявлены положительные или слабоположительные результаты реакции Хаддлсона. Как видно из данных таблицы 4, у 3 из них при контрольном исследовании получен положительный результат реакции Хаддлсона, у 4 – результата ИФА. Но у всех 5 беременных АСЛ не были обнаружены. Отметим, что ранее при обследовании беременных с ложноположительными результатами серологических реакций на сифилис АСЛ трепонемной специфичности также не были выявлены [8-10]. Недавно сообщено, что у беременных могут быть ложноположительными и результаты серологических реакций агглютинационного типа на бруцеллез, при этом АСЛ бруцеллезной специфичности также отсутствовали [11]. Таким образом, приведенные данные показали, что, во-первых, при диагностике бруцеллеза у беременных ложноположительными могут быть результаты не только агглютинационных тестов выявления антител, но и ИФА. Во-вторых, как показано в этой и в ранее опубликованной [10] работах, возможна и целесообразна верификация положительных результатов определения антител к *Brucella* у беременных при помощи теста АСЛ.

Полученные в работе результаты применения разработанной ИФА тест-системы показали целесообразность определения антител к *Brucella* методом ИФА. При этом следует учитывать, что этот метод в принципе, при использовании конъюгатов соответствующей изотиповой специфичности, позволяет более точно характеризовать активность антител различных изотипов, чем агглютинационные тесты. Вместе с тем продемонстрировано преимущество метода определения АСЛ по сравнению с выявлением антител. Преимущество теста определения АСЛ наиболее значимо при контроле эффективности лечения бруцеллеза иммунологическими методами.

Выводы

1. Разработана тест-система для определения IgG антител к бруцеллам методом иммуноферментного анализа, обеспечивающая более высокую чувствительность, чем реакция Хаддлсона.
2. Определение антигенсвязывающих лимфоцитов при диагностике бруцеллеза является более чувствительным тестом, чем тесты определения антител.
3. Применение теста антигенсвязывающих лимфоцитов, в отличие от определения антител, обеспечивает ранний контроль эффективности лечения бруцеллеза.

4. Применение теста антигенсвязывающих лимфоцитов при обследовании беременных на бруцеллез позволяет дифференцировать положительные и ложноположительные результаты определения антител.

Список литературы

1. Каральник Б.В., Денисова Т.Г., Грушина Т.А., Курманова Г.М., Дуйсенова А.К., Омарова М.Н. Набор реагентов для иммунологической диагностики бруцеллеза и способ диагностики бруцеллеза. Предпатент РК N14578 // Промышленная собственность... Официальный бюллетень. - 2004. - №7.
2. Каральник Б.В., Денисова Т.Г., Грушина Т.А., Тугамбаев Т.И. Анализ иммунного ответа морских свинок, инфицированных *Brucella melitensis* // Ж. микробиол. - 2002. - №1. - С.52-56.
3. Грушина Т.А., Каральник Б.В., Сыздыков М.С., Денисова Т.Г., Айтбаева Ж.Т., Даулбаева С.Ф. Экспериментальная оценка сравнительной эффективности известных методов и теста антигенсвязывающих лимфоцитов в диагностике бруцеллеза // Вторая межгосударственная научно-практ. конф. по взаимодействию государств - участников СНГ в области санитарной охраны территории. - Алматы. - 2001. - С. 57-58.
4. Дуйсенова А.К., Денисова Т.Г., Каральник Б.В., Курманова Г.М., Мусакулова Г.Т. Сопоставление клинических проявлений и эффективности диагностических тестов при остром бруцеллезе // Гигиена, эпидемиология и иммунобиология. - 2001. - №3-4. - С.126-130.
5. Дуйсенова А.К., Каральник Б.В., Денисова Т.Г., Курманова Г.М. Сопоставление клинических проявлений и эффективности диагностических тестов при хроническом бруцеллезе // Мед. журнал Казахстана. - 2001. - №3 (12). - С.14-17.
6. Урбах В.Ю. Биометрические методы. - М. - 1964. - 416 С.
7. Каральник Б.В., Денисова Т.Г., Дуйсенова А.К., Жунусова Г.Б. Контроль эффективности лечения бруцеллеза по определению антигенсвязывающих лимфоцитов (АСЛ) // Объединенный иммунол. форум. Тез. докл. - Екатеринбург. - 2004. - С.88.
8. Пшеничная Л.А., Каральник Б.В., Тимиргалиев С.А., Айманова С.А. Информативность лабораторных тестов в диагностике сифилиса у беременных // Вопросы дерматологии и венерологии. - Алматы. - 2002. - №1. - С.4-7.
9. Karalnik B.V., Pshenichnaya L.A., Denisova T.G., Utegenova A.K. The pregnancy and syphilis diagnostics by determination of antigen binding lymphocytes (ABL) of treponemal specificity // Abstracts 11 Congress of the European Academy of Dermatology and Venerology. - Prague. - 2002. - P.34-41.

10. Утегенова А.К., Каральник Б.В. Диагностика сифилиса у беременных, рожениц и их новорожденных и контроль излеченности методом выявления антигенсвязывающих лимфоцитов // Гигиена, эпидемиология и иммунобиология. - 2003. - №2. - с.101-104.

11. Denisova T.G., Karalnik B.V., Duysenova A.K., Zhunusova G.B. Characteristic Features of Immunological Diagnosis of Brucellosis in Pregnant Women // In: Development of International Collaboration in Infectious Diseases Research. International Conference. - Russia. - "Sosnovka" - 2004. - P.89.

*поступила в редакцию 02.02.2006
отправлена на доработку 21.03.2006
принята к печати 10.04.2006*