

COMPARATIVE ASSESSMENT OF DIAGNOSTIC REAGENTS FROM SYNTHETIC AND ERYTHROCYTE SORBENTS FOR THE DETERMINATION OF LYMPHOCYTES WITH RECEPTORS FOR *BRUCELLA* LIPOPOLYSACCHARIDES

Karalnik B.V.¹, Denisova T.G.¹, Omarova M.N.¹, Zhunussova G.B.¹, Tugambayev T.I.², Zakaryan S.B.², Fedosov Y.S.¹

¹*H.Zhumatov Scientific Hygiene and Epidemiology Center*

34, Makataev str., Almaty, 050002, Kazakhstan

²*M. Aykimbayev Kazakh Scientific Center of Quarantine and Zoonotic Diseases*

14, Kapalskaya str., Almaty, 050054, Kazakhstan

lbimvac@mail.ru

ABSTRACT

The aim of this study was to develop immunologic reagents from a synthetic sorbent for early brucellosis diagnostics and compare them with previously developed erythrocyte immunologic reagents by using animal immunization experiments and examination of patients. Rabbits; veterinary brucellosis vaccines for sheep and cattle; lipopolysaccharides (LPS) of different species of *Brucella* and *Yersinia* chemically activated (with -NH₂ or -COOH groups) with polystyrene beads (diameter, 2 μm) and tagged or not tagged with a fluorochrome (natriumisothiocyanate); previously developed *Brucella* erythrocyte immunologic reagent for revealing lymphocytes with receptors for the antigens; and mononuclear fractions of rabbits and patients suspected to have brucellosis were used. Methods of adhesion of cells/corpuscles and their blocking with LPS and statistical comparisons were used. A *Brucella* immunologic reagent was developed from the synthetic sorbent for determining LfRLPS specificity. Advantages of the developed immunologic reagent were as follows: absence of non-specific adhesion due to binding of the sorbent rather than LPS and higher accuracy of determination of LfR; non-obligation of parallel determination of sorbent binding per se by lymphocytes; and simplification and decrease of spending time for the LfR count. Features of the sorbent did not influence the detection of LfR specific to taxonomically close bacteria. The results substantiate the expediency of use of the immunologic reagent from a synthetic sorbent for the determination of LfR.

Keywords: sorbed immunologic reagents, early diagnostics, brucellosis

УДК 021.57.083 – 048.86 616-007/616.981-42

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ДИАГНОСТИЧЕСКИХ РЕАГЕНТОВ НА ОСНОВЕ СИНТЕТИЧЕСКОГО И ЭРИТРОЦИТАРНОГО СОРБЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛИМФОЦИТОВ С РЕЦЕПТОРАМИ К ЛИПОПОЛИСАХАРИДАМ БРУЦЕЛЛ

Каральник Б.В.¹, Денисова Т.Г.¹, Омарова М.Н.¹, Жунусова Г.Б.¹, Тугамбаев Т.И.², Закарян С.Б.², Федосов Ю.С.¹

¹*Научный центр гигиены и эпидемиологии им. Х. Жуматова*

ул. Макатаева, 34, Алматы, 050002, Казахстан

²*Казахский научный центр карантинных и зоонозных инфекций им. М. Айкимбаева*

ул. Капальская, 14, Алматы, 050054, Казахстан

lbimvac@mail.ru

АБСТРАКТ

Цель работы – получение на основе синтетического сорбента иммунореагентов для ранней диагностики бруцеллеза и сравнение их с ранее разработанными эритроцитарными иммунореагентами в экспериментах иммунизации животных и обследования больных. Использованы кролики, ветеринарные бруцеллезные вакцины для мелкого и крупного рогатого скота, липополисахариды (ЛПС) различных видов бруцелл и нерсиний, химически активированные (с -NH₂ или -COOH группами) полистироновые бусы (beads) диаметром 2 мкм, меченные и не меченные флуорохромом (изотиоцианат натрия), разработанный ранее бруцеллезный эритроцитарный иммунореагент для выявления лимфоцитов с рецепторами к антигену (ЛфР), фракции мононуклеаров иммунизированных кроликов и больных с

подозрением на бруцеллез. Применены методы адгезии клеток/корпускул и ее блокирования ЛПС, хронометраж подсчета ЛфР, статистические методы сравнения серий. На основе синтетического сорбента разработан бруцеллезный иммунореагент и определены его преимущества в сравнении с бруцеллезным эритроцитарным иммунореагентом: отсутствие неспецифической адгезии за счет связывания сорбента, а не ЛПС и более высокая точность определения ЛфР; необязательность параллельного определения связывания лимфоцитами сорбента; упрощение и уменьшение затрат времени на подсчет ЛфР. Особенности сорбента не влияют на определение ЛфР, специфичных к ЛПС таксономически близких бактерий. Полученные результаты обосновывают целесообразность применения для определения ЛфР иммунореагента на синтетическом сорбенте.

Ключевые слова: сорбированные иммунореагенты, ранняя диагностика, бруцеллез.

ВВЕДЕНИЕ

Известны различные иммунологические методы диагностики бруцеллеза: агглютинационные (Хаддлсона, Райта, Роз Бенгал тест), иммуноферментные (ELISA– определение антител изотипов IgM, IgG, IgA), ELISPOT (определение продукции γ -интерферона лимфоцитами, примированными антигеном возбудителя, в ответ на стимул гомологичным антигеном). Однако применение агглютинационных иммуноферментных методов не решает задачу ранней диагностики из-за сравнительно позднего развития антительного ответа. Метод ELISPOT мог бы решить эту задачу, если бы его выполнение не занимало несколько суток. Выявление лимфоцитов с рецепторами (ЛфР) к липополисахариду (ЛПС) бруцелл, как показано в комплексе работ с использованием ранее разработанного эритроцитарного иммунореагента [1], оказалось пригодным для ранней диагностики бруцеллеза тестом [2-5].

Одновременно было выяснено, что использование эритроцитов в качестве сорбента имеет определенные недостатки. Во-первых, в иммунореагенте для определения ЛфР с целью минимизации спонтанной (неспецифической) адгезии с лимфоцитами используют эритроциты быка. Поскольку связываемый антиген не блокирует всю поверхность эритроцита [6], это может привести к получению ложноположительных (за счет взаимодействия собственных эпитопов мембраны эритроцита с соответствующим рецептором лимфоцитов) результатов теста при определении ЛфР у рогатого скота, подлежащего обследованию на бруцеллез. Более того, даже при обследовании людей выявляют небольшое содержание лимфоцитов, связывающих контрольный эритроцитарный сорбент, не нагруженный ЛПС бруцелл. Во-вторых, для обеспечения стабильности сорбента и, соответственно, иммунореагента эритроциты нужно фиксировать достаточно токсичным уксусным альдегидом. Поэтому целесообразно разработать иммунореагенты такого же назначения (для ранней диагностики бруцеллеза) на основе синтетического сорбента.

Цель работы – получение на основе более инертного, синтетического сорбента бруцеллезных иммунореагентов для ранней диагностики заболевания и сравнение их с ранее разработанными эритроцитарными иммунореагентами в экспериментах иммунизации животных и обследования больных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали 8 беспородных кроликов, бруцеллезные вакцины для иммунизации крупного и мелкого рогатого скота производства ТОО «Антиген», Казахстан; разработанный нами ранее бруцеллезный эритроцитарный иммунореагент для выявления ЛфР [1]; выделенные по Westphalна холоде [7] липополисахариды следующих бактерий: *Brucellamelitensis*, *Brucellaabortus*, *Brucellasuis*, *Yersiniapseudotuberculosis*, *Yersiniapestis*, *Yersiniaenterocolitica* сероваров 03, 05 и 09; и химически активированные (с $-NH_2$ или $-COOH$ группами) полистиреновые бусы (beads) диаметром 2 мкм, меченные и не меченные флуорохромом (изотиоцианат натрия) производства SigmaAldrich, Германия, фиколл 400 производства SigmaAldrich, USA, триомбраст производства ОАО «Фармак», Украина, 25% глутаровый альдегид производства Merck, Германия, метиленовый синий производства Sun Pharmaceuticals, Индия; фосфатный буфер, pH 7.2. Использовали центрифугу CM-6M производства ELMi, Латвия, микроскоп производства Zeiss, Германия, микродозаторы производства Laborgerate GmbH, Германия.

Выделение фракции мононуклеаров из гепаринизированной крови выполняли на градиенте плотности фиколл-триомбраст 1.077 г/мл. ЛфР определяли методом адгезии, смешивая равные объемы взвесей выделенных мононуклеаров и иммунореагента–эритроцитарного или на основе синтетического сорбента при соотношении корпускулы/клетки 60:1. После экспозиции (5 мин при 37 и 1 час при 4°C) из осадка корпускул делали мазок на предметном стекле, фиксировали его 96% этиловым спиртом и после испарения спирта окрашивали мазок 0,1% раствором метиленового синего в течение 4 мин. Количество лимфоцитов, связавших более 2 корпускул, подсчитывали в 7 сотнях лимфоцитов порознь.

В работе применены различные статистические методы частных сравнений серий. Результат анализа считали значимым при вероятности нуль-гипотезы не более 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор синтетического сорбента. Размер бус (диаметр 2 мкм) выбран таким образом, чтобы в поле зрения микроскопа было легко дифференцировать лимфоциты (диаметр 8 мкм) и бусы. Выбор бус по способу их химической активации осуществлен по результатам комплексного опыта, в котором у кроликов, иммунизированных вакцинами *B. melitensis* и *B. abortus*, определяли оптимальную для выявления ЛФР дозу гомологичных ЛПС для бус с амино- и карбоксильными группами при связывании антигена без конъюгирующего агента. Для этого в забуференном, pH 7,2 0,85% растворе NaCl были приготовлены ЛПС соответствующих бруцеллконцентрации 0 (контроль), 16, 31, 62, 125, 250, 500, 1000 и 2000 мкг/мл. Каждый из этих растворов смешивали с равным объемом 0,5% суспензии каждого варианта бус, смеси выдерживали 90 мин при 45°C и оставляли при 4°C сутки. Нагруженные ЛПС бусы трижды отмывали при центрифугировании и суспендировали в забуференном, pH 7,2 0,85% растворе NaCl до содержания корпускул $1,2 \cdot 10^8$ кл/мл. Определение ЛФР проводили во фракции моноклеаров, выделенной из крови кроликов через 10 дней после иммунизации. Результаты приведены в таблице 1. Видно, что аминированные бусы без конъюгации не связывают ЛПС. Поэтому для приготовления бруцеллезного ЛПС-иммунореакта были использованы карбоксилированные бусы. Чувствительность иммунореактов, полученных при нагрузке бус растворами ЛПС концентрации 2000 и 1000 мкг/мл, максимальна и не различается, а при использовании растворов более низкой концентрации она резко уменьшается.

Таблица 1. Выбор рабочих доз ЛПС для получения иммунореактов на основе синтетического сорбента

| | | | | | | | | | | |
|---|--------------------------------------|------------------|--|------|-----|-----|-----|------|------|------|
| Специфичность иммуногена и иммунореакта Specificity of immunogen | Активация бус Activation of beads | Кролик Rabbit | Относительное(%) содержание АСЛ*, выявленных иммунореактами, полученными при различных дозах ЛПС, мкг/мл Relative (%) content ABL detected with immunologic reagents received at different doses of LPS, mcg/ml | | | | | | | |
| | | | 2000 | 1000 | 500 | 250 | 125 | 62.5 | 31.2 | 15.6 |

Table 1. Choice of working doses of LPS for receiving of immunologic reagents on the base of synthetic sorbent

| and immunologic reagent | | | | | | | | | | | 0 (control) |
|-------------------------|------------------|------|----------|----------|---------|---------|----------|----------|----------|----------|-------------|
| Brucella melitensis | -COOH | 1 | 16.0±0.3 | 15.9±0.3 | 6.6±0.3 | 0.3±0.2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 2 | 15.7±0.2 | 16.4±0.2 | 7.7±0.2 | 0.3±0.2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | Σ1,2 | 15.9±0.2 | 16.1±0.2 | 7.1±0.2 | 0.3±0.1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | -NH ₂ | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Brucella abortus | -COOH | 3 | 16.4±0.2 | 16.7±0.2 | 6.6±0.2 | 0.3±0.2 | ндп d | ндп d | ндп d | ндп d | 0 |
| | | 4 | 15.6±0.2 | 16.0±0.4 | 6.1±0.3 | 0.1±0.1 | ндп d | ндп d | ндп d | ндп d | 0 |
| | | Σ3,4 | 16.0±0.2 | 16.4±0.2 | 6.4±0.2 | 0.2±0.2 | ндп d | ндп d | ндп d | ндп d | 0 |
| | -NH ₂ | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | ндп d | ндп d | ндп d | ндп d | нд nd |
| | | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | ндп d | ндп d | ндп d | ндп d | нд nd |

*Средняя и ее средняя квадратическая ошибка;
нд – не делали

*Middle and her middle quadratic error;
nd – not done

С иммунореагентами, полученными при дозах ЛПС 16-125 мкг/мл, не выявлены даже единичные ЛфР. Описанная зависимость практически одинакова для ЛПС различных бруцелл: оптимальной чувствительностью характеризуются иммунореагенты, полученные при нагрузке карбоксилированных бус ЛПС обоих видов бруцелл в дозе 1000 мкг/мл.

Сопоставление чувствительности бруцеллезных иммунореагентов на основе двух сорбентов (эритроцитарных синтетических) выполнено на лимфоцитах кроликов, иммунизированных за 10 дней до анализа ветеринарными вакцинами специфичности *Brucellamelitensis* (кролики 5 и 6) и *B. abortus* (кролики 7 и 8). Как видно из приведенных в таблице 2 данных, чувствительность иммунореагентов, приготовленных на основе двух сорбентов, в опыте иммунизации кроликов практически одинакова при определении ЛфР специфичности как *B. melitensis*, так и *B. abortus*.

Несмотря на выбор специального метода фиксации эритроцитов, минимизирующего их спонтанное связывание с антителами или с лимфоцитами – фиксацию ацетальдегидом [8, 9], такой сорбент все же, хотя и в небольшом проценте случаев, связывается лимфоцитами. Для более точного определения ЛфР приходилось параллельно выполнять тест с эритроцитами, не нагруженными антигеном.

Таблица 2. Сравнение чувствительности бруцеллезных иммунореагентов на основе эритроцитарного и синтетического сорбентов для выявления АСЛ у иммунизированных кроликов

Table 2. Comparison of sensitivity of brucellosis immunologic reagents on the base of erythrocyte and synthetic sorbents for detection of ABL at immunized rabbits

| Специфичность иммуногена и иммунореагента Specificity of immunogen and immunologic reagent | Кролик Rabbit | Выявление АСЛ ($\bar{x} \pm S \bar{x}$) при тестировании с иммунореагентом на основе сорбента Detection of ABL ($\bar{x} \pm S \bar{x}$) at testing with immunologic reagent on the base of sorbent | | P* |
|---|---------------------|--|-----------------------------|-----------|
| | | эритроцитарного erythrocyte | синтетического synthetic | |
| Brucella melitensis | 5 | 14.4±0.5 | 15.1±0.3 | 0.3>P>0.2 |
| | 6 | 14.0±0.4 | 14.6±0.2 | 0.3>P>0.2 |
| | P _{5,6} ** | 0.3>P>0.2 | 0.3>P>0.2 | - |
| | Σ5,6 | 14.2±0.2 | 14.9±0.2 | 0.1>P>0.2 |
| Brucella abortus | 7 | 13.4±0.5 | 13.6±0.2 | >>0.05 |
| | 8 | 13.4±0.3 | 13.9±0.1 | >>0.05 |
| | P _{7,8} ** | 1.0 | 0.4>P>0.3 | |

| | | | | |
|--|------|----------|----------|--------|
| | Σ7,8 | 13.4±0.3 | 13.7±0.1 | >>0.05 |
| <p>($\bar{x} \pm S\bar{x}$) – средняя и ее средняя квадратическая ошибка, %; *Вероятность нуль-гипотезы при сравнении содержания ЛфР, выявленного двумя иммунореагентами; **Вероятность нуль-гипотезы при сравнении содержания ЛфР, выявленного у двух кроликов.</p> <p>($\bar{x} \pm S\bar{x}$) – middle and her quadratic error; *Probability of the zero-hypothesis at comparison of ABL content detected withtwo immunologic reagents; **Probability of the zero-hypothesis at comparison of ABL content detected in 2 rabbits</p> | | | | |

Мы проверили, связываются ли с лимфоцитами иммунизированных *B.melitensis* и *B.abortus* кроликов карбоксилированные бусы, не нагруженные ЛПС бруцелл– контрольные реагенты (таблица 3). Видно, что контрольные эритроцитарные реагенты связываются лимфоцитами с частотой от 2,0 до 2,7%. Параллельная проверка контрольных иммунореагентов (синтетического сорбента) не выявила такого связывания. Это преимущество позволяет при применении иммунореагента на основе синтетического сорбента выполнять определение ЛфР без параллельного теста с контрольным реагентом. Таксономическую специфичность определения ЛфР с полученными на основе синтетического сорбента иммунореагентами проверили методом ингибиции выявления ЛфР: лимфоциты тех же иммунизированных кроликов 5-8 предварительно экспонировали с растворами ЛПС (200 мкг/мл) различных бактерий – гомологичных иммуногену и иммунореагенту и гетерологичных.

Таблица 3. Связывание контрольных иммунореагентов – эритроцитарного и синтетического лимфоцитами иммунизированных кроликов

Table 3. Binding of control immunologic reagents – erythrocyte and synthetic by lymphocytes of immunized rabbits

| Иммуноген Immunogen | Кролик Rabbit | Связывание лимфоцитами контрольных реагентов ($\bar{x} \pm S\bar{x}$) Binding of control reagents by lymphocytes | | P* |
|---|---------------------|---|-----------------------------|--------|
| | | эритроцитарного erythrocyte | синтетического synthetic | |
| Brucella melitensis | 5 | 2.14±0.34 | 0 | <<0.01 |
| | 6 | 2.71±0.36 | 0 | <<0.01 |
| | P _{5,6} ** | 0.3>P>0.2 | 1.0 | - |
| | Σ5,6 | 2.43±0.25 | 0 | <<0.01 |
| Brucella abortus | 7 | 2.29±0.18 | 0 | <<0.01 |
| | 8 | 2.00±0.31 | 0 | <<0.01 |
| | P _{7,8} ** | 0.5>P>0.4 | 1.0 | - |
| | Σ7,8 | 2.14±0.06 | 0 | <<0.01 |
| | P*** | 0.3>P>0.2 | 1.0 | - |
| <p>($\bar{x} \pm S\bar{x}$) – средняя и ее средняя квадратическая ошибка, %; *Вероятность нуль-гипотезы при сравнении связывания эритроцитарного и синтетического контрольных иммунореагентов; **Вероятность нуль-гипотезы при сравнении связывания контрольного реагента лимфоцитами двух кроликов; ***вероятность нуль-гипотезы при сравнении связывания контрольного реагента лимфоцитами кроликов, иммунизированных антигенами бруцелл двух видов.</p> <p>($\bar{x} \pm S\bar{x}$) –middle and her quadratic error; *Probability of the zero-hypothesis at comparison of binding of erythrocyte and synthetic control reagents; **Probability of the zero-hypothesis at comparison of binding of control reagent by lymphocyte of 2 rabbits; ***Probability of the zero-hypothesis at comparison of binding of control reagent by lymphocytes of rabbits immunized with antigens of Brucella of two species</p> | | | | |

Из приведенных в таблице 4 данных видно, что гомологичные ЛПС вызвали очень значительное уменьшение количества ЛфР, выявляемых при использовании эритроцитарных иммунореагентов специфичности как *B.melitensis* (73-76, в среднем по группе 74,9±1,1%), так и *B.abortus* (74-77, в среднем по группе 75,6±0,7%). При применении иммунореагентов на основе синтетического сорбента это уменьшение было достоверно (P<0,001) более выраженным (79-80 и 82, в среднем по группе 80,0±0,9 и 82,3±0,9% при определении ЛфР специфичности *B.melitensis* и *B.abortus* соответственно).

ЛПС гетерологичных видов бруцелл у тех же кроликов также вызвали ингибицию, но существенно (P<<0,001), в 2,9-9,0 разменьшую, чем ЛПС гомологичных бруцелл. Так, при применении эритроцитарных иммунореагентов специфичности *B.melitensis* ЛПС *B.abortus* вызвал ингибирование только на 24-27, в среднем

по группе – на $25,4 \pm 0,9\%$), а ЛПС *B.suis* – соответственно на 20-25, в среднем по группе – на $22,2 \pm 1,2\%$. У кроликов, иммунизированных вакциной *B.abortus*, при применении эритроцитарных реагентов специфичности *B.abortus*, ингибитор – ЛПС *B.melitensis* уменьшал выявление ЛфР на 13-14, в среднем по группе – на $13,3 \pm 0,8\%$, а ЛПС *B.suis* – соответственно на 8-10, в среднем по группе – на $9,4 \pm 0,8\%$.

При применении иммунореагентов на основе синтетического сорбента ЛПС *B.abortus* уменьшал выявление ЛфР специфичности *B.melitensis* на 12-18, в среднем по группе на $14,8 \pm 1,2\%$, а ЛПС *B.suis* – на 15-20, в среднем по группе – на $17,3 \pm 1,1\%$. ЛПС *B.melitensis* ингибировал выявление ЛфР специфичности *B.abortus* на 7-10, в среднем по группе на $8,8 \pm 0,8\%$, а ЛПС *B.suis* – на 8-9, в среднем также на $8,8 \pm 0,8\%$.

Известно, что в ЛПС *Brucellamelitensis* и *Yersiniaenterocolitica* серовара О9 имеются общие антигенные детерминанты [10-13]. Эти перекресты выявляются не только в тестах определения антител, но и в тесте обнаружения ЛфР [14]. По результатам настоящего исследования, при использовании эритроцитарных иммунореагентов ЛПС *Y.enterocolitica* О9, примененный в качестве ингибитора, подавлял выявление ЛфР специфичности *B.melitensis* на 13-15, в среднем на $14,1 \pm 0,7\%$, а специфичности *B.abortus* – на 12-14, в среднем на $12,7 \pm 0,9\%$. При использовании иммунореагентов на основе синтетического носителя ингибция этим же ЛПС выявления ЛфР специфичности *B.melitensis* составила 16-17, в среднем по группе $16,3 \pm 0,8\%$, а специфичности *B.abortus* у каждого кролика – около 10 и по группе в среднем $9,9 \pm 1,0\%$. Существенное различие между степенью ингибции ЛПС *Y.enterocolitica* О9 выявления ЛфР специфичности как *B.melitensis*, так и *B.abortus* в зависимости от природы сорбента в иммунореагенте не обнаружено ($P > 0,05$). В целом полученные результаты подтвердили наличие общих эпитопов у ЛПС *B.melitensis* и *Y.enterocolitica* серовара О9, а также значение этих антигенных связей при тестировании ЛфР (таблицы 4 и 5).

Такие же антигенные перекресты выявлены между *B.abortus* и *Y.enterocolitica* О9 при тестировании ЛфР в опыте ингибции (таблица 4). Важно подчеркнуть, что, в отличие от ЛПС *Y. Enterocolitica* серовара О9, у ЛПС иерсиний других сероваров этого вида (О3 и О5) общие эпитопы в опытах ингибции выявления ЛфР специфичности *B.melitensis* и *B.abortus* не обнаружены. Не обнаружены они и у ЛПС других видов иерсиний – *Y.pseudotuberculosis* и *Y.pestis* (таблица 5).

Таблица 4. Оценка специфичности бруцеллезных иммунореагентов на основе эритроцитарного и синтетического сорбентов для выявления лимфоцитов с рецепторами к ЛПС бруцелл (опыт А)

Table 4. Assessment of specificity of brucellosis immunologic reagents on the bases of erythrocyte and synthetic sorbents for determination of lymphocytes with receptors to Brucella LPS (experiment A)

| Иммуноген и иммунореагент Immunogen | Степень ингибции($\bar{x}\pm S\bar{x}$), %, липополисахаридами выявления ЛфР с иммунореагентами на основе сорбента Degree of inhibition by lypopolysacharides($\bar{x}\pm S\bar{x}$), % of the ABL revealing with immunologic reagents on the bases of sorbent | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|------------------------|---------------------|------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|---------------------|------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|--|
| | эритроцитарного erythrocyte | | | | | | | | синтетического synthetic | | | | | | | |
| | Ингибитор – ЛПС Inhibitor – LPS | | | | | | | | Ингибитор – ЛПС Inhibitor – LPS | | | | | | | |
| | | | | | | | | | Ингибитор Inhibitor | | | | | | | |
| | Кролик Rabbit | Brucella melitensis | Brucella abortus | Brucella suis | Yersinia enterocolitica O3 | Yersinia enterocolitica O5 | Yersinia enterocolitica O9 | Физраствор Physiologic solution | Brucella melitensis | Brucella abortus | Brucella suis | Yersinia enterocolitica O3 | Yersinia enterocolitica O5 | Yersinia enterocolitica O9 | Физраствор Physiologic solution | |
| Brucellamelitensis | 5 | 76.3±0.8 | 26.6±1.2 | 24.8±1.2 | 0.09±1.6 | 1.2±1.9 | 14.9±0.8 | 0 | 79.2±0.8 | 17.9±1.1 | 19.9±1.5 | -1.0±1.0 | -1.0±1.0 | 16.9±1.2 | 0 | |
| | 6 | 73.4±1.1 | 24.3±1.3 | 19.5±1.5 | -0.13±2.2 | 0±1.6 | 13.4±1.2 | 0 | 80.5±1.6 | 11.7±1.2 | 14.7±0.8 | -1.0±1.0 | 1.9±1.2 | 15.6±1.1 | 0 | |
| | Σ5,6 | 74,9±0.8 | 25.4±0.9 | 22.2±1.2 | 0.09±0.8 | 0.6±1.2 | 14.1±0.7 | 0 | 80,0±0.9 | 14.8±1.2 | 17.3±1.1 | -0.5±0.5 | 0.5±0.8 | 16.3±0.8 | 0 | |
| | P | <0.001 | <<0.001 | 0.01>P>0.001 | 0.2>P>0.1 | 1.0>P>0.9 | 0.1>P>0.05 | - | | | | | | | - | |
| Brucellaabortus | 7 | 12.7±1.3 | 74.5±0.8 | 10.4±1.1 | 1.0±1.0 | 2.1±1.3 | 11.7±1.4 | 0 | 10.5±1.5 | 82.2±1.3 | 9.4±1.3 | -1.1±1.1 | 1.1±1.1 | 9.5±1.4 | 0 | |
| | 8 | 13.9±1.1 | 76.6±1.0 | 8.5±1.0 | 1.1±1.1 | -1.1±1.1 | 13.8±0.9 | 0 | 7.2±0.1 | 82.5±1.4 | 8.2±1.0 | -1.0±1.8 | -1.0±1.0 | 10.3±1.4 | 0 | |
| | Σ7,8 | 13.3±0.8 | 75.6±0.7 | 9.4±0.8 | 1.0±0.7 | 0.5±0.9 | 12.7±0.9 | 0 | 8.8±0.8 | 82.3±0.9 | 8.8±0.8 | -1.0±1.0 | 0.04±0.8 | 9.9±1.0 | 0 | |
| | P | <<0.001 | <<0.001 | 0.6>P>0.5 | 0.2>P>0.1 | 0.8>P>0.7 | 0.05>P>0.02 | - | | | | | | | - | |

($\bar{x}\pm S\bar{x}$) – средняя и ее средняя квадратическая ошибка, %;
P – вероятность нуль-гипотезы при сравнении степени ингибции, выявленной при использовании иммунореагентов на основе эритроцитарного и синтетического сорбентов.
($\bar{x}\pm S\bar{x}$) middle and her quadratic error;
P –probability of the zero-hypothesis at comparison of inhibition degree at use of immunologic reagents on the bases of erythrocyte and synthetic sorbents.

Таблица 5. Степень ингибиции липополисахаридами иерсиний выявления ЛфР, специфичных для *Brucellamelitensis* (опыт Б), %

Table 5. Inhibition degree by *Yersinia* lipopolysaccharides of revealing of ABL specific to *Brucella melitensis* (experiment B), %

| Кролик Rabbit | Степень ингибиции* липополисахаридами Degree of inhibition %* by lipopolysaccharides | | | |
|------------------|---|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------|
| | <i>Brucella melitensis</i> | <i>Yersinia enterocolitica</i> O9 | <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> | <i>Yersinia pestis</i> |
| 5 | 79.5±1.0 | 20.5±1.0 | 1.7±1.1 | 0 |
| 6 | 82.0±0.5 | 16.1±1.1 | 1.0±1.0 | -2.9±1.4 |
| Σ5,6 | 80.7±0.8 | 18.3±0.8 | 1.3±0.7 | -1.4±1.0 |
| P | - | <<0.001 | <<0.001 | <<0.001 |

*Степень ингибиции – уменьшение % количества выявленных ЛфР в результате предварительной экспозиции лимфоцитов с раствором ЛПС, 200 мкг/мл;
P – вероятность нуль-гипотезы при сравнении ингибиции гомо- (*Brucellamelitensis*) и гетерологичными (иерсиниозными) ЛПС.

*Degree of inhibition – decrease, % of quantity of revealing ABL) consequently of preliminary exposition of lymphocytes with solution of LPS, 200 mcg/ml;
P – probability of the zero-hypothesis at comparison of inhibition degree by the homo- (*Brucella melitensis*) and heterologic (*Yersinia*) LPS.

Полученные результаты подтвердили, что ингибирование выявления ЛфР растворенными антигенами является эффективным способом оценки специфичности как сорбированных иммунореагенов, так и результатов тестов с их использованием. Дополнительным показателем эффективности указанного способа явилось полное отсутствие ингибирования ($P \gg 0,05$) примененными ЛПС связывания контрольного эритроцитарного иммунореагента лимфоцитами иммунизированных кроликов (таблица 6).

Суммируя результаты сравнительной оценки бруцеллезных иммунореагентов для выявления ЛфР по данным проведенных исследований, отметим, что разработанный иммунореагент на основе синтетического сорбента показал высокую чувствительность (при обследовании иммунизированных кроликов – не меньшую, а при обследовании больных людей даже более высокую, чем у эритроцитарного предшественника) и более высокую специфичность. В отличие от эритроцитарного прототипа он не связывал сам сорбент (таблица 3), что позволяет отказаться от выполнения параллельного теста с контрольным иммунореагентом и, соответственно, упростить определение ЛфР. Показано, что выявленные по результатам опытов ингибиции частичные антигенные перекресты между бруцеллами трех видов при иммунном ответе по ЛфР не связаны с особенностями сорбента в иммунореагенте, а обусловлены таксономической близостью этих бактерий. Известные, по результатам агглютинационных и адгезивных реакций, антигенные связи между ЛПС *Y. enterocolitica* O9 и *B. melitensis* подтверждены в этой работе. Подобные связи, определяемые по данным ингибиции выявления ЛфР, обнаружены также между ЛПС *Y. enterocolitica* O9 и *B. abortus*. И в этих случаях особенности сорбента в иммунореагенте не имеют значения: антигенные перекресты обусловлены только структурой ЛПС. Такие взаимодействия, как известно, сохраняются даже после предварительной обработки бруцеллезных антигенных препаратов 0,01M раствором ЭДТА, предотвращающей неспецифические результаты ряда серологических тестов на бруцеллеза [11]. Поэтому можно полагать, что аффинитет перекрестных взаимодействий, обусловленных таксономической близостью вышеуказанных бактерий, достаточно высок.

Далее провели сравнительное изучение затрат времени на подсчет ЛфР, выявляемых при помощи иммунореагентов на основе эритроцитарного и синтетического сорбентов (таблица 7). Полученные результаты показали, что при анализе проб, содержащих ЛфР, время, затрачиваемое на подсчет ЛфР среди 700 лимфоцитов при использовании иммунореагента на основе эритроцитарного сорбента, колеблется от 15 до 22 мин, в среднем – 20 мин, а при использовании в иммунореагенте синтетического сорбента колеблется от 14 до 15 мин, в среднем 14,6 мин. Кратность сокращения времени за счет применения синтетического сорбента составила в среднем $1,4 \pm 0,1$ раза. Это преимущество имеет место ($P \ll 0,001$), несмотря на выявление у обследованных больных при использовании иммунореагента на основе синтетического сорбента более высокого ($0,05 > P > 0,02$) содержания ЛфР (в среднем по группе $5,1 \pm 0,3\%$), чем при использовании иммунореагента на основе эритроцитарного сорбента (в среднем по группе $4,1 \pm 0,2\%$). При отсутствии ЛфР в мазках время, затраченное на получение результата, практически не зависит от особенностей сорбента: $14,7 \pm 0,1$ и $14,5 \pm 0,1$ мин при иммунореагентах на эритроцитарном и синтетическом сорбентах соответственно.

Таблица 6. Влияние ингибиции липополисахаридами на связывание контрольного эритроцитарного реагента лимфоцитами иммунизированных кроликов

Table 6. Influence of inhibition by lipopolysaccharides on the binding of control erythrocyte reagent by lymphocytes of immunized rabbits

| Иммуноген Immunogen | Кролик Rabbit | Относительное содержание лимфоцитов, связавших контрольный эритроцитарный реагент ($\bar{x} \pm S\bar{x}$), % послеингибиции Relative content of lymphocytes binding the control erythrocyte reagent ($\bar{x} \pm S\bar{x}$), % after inhibition | | | | | | |
|---|------------------|--|------------------|---------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|--|
| | | липополисахаридом by lipopolysaccharide | | | | | | физиологическим раствором by physiologic solution |
| | | Brucella melitensis | Brucella abortus | Brucella suis | Yersinia enterocolitica O3 | Yersinia enterocolitica O5 | Yersinia enterocolitica O9 | (контроль) control |
| Brucellamelitensis | 5 | 2.29±0.18 | 2.29±0.18 | 2.29±0.18 | 2.14±0.14 | 2.29±0.18 | 2.29±0.29 | 2.14±0.34 |
| | 6 | 2.57±0.20 | 2.43±0.20 | 2.43±0.20 | 2.57±0.43 | 2.71±0.47 | 2.71±0.29 | 2.71±0.36 |
| | Σ 5,6 | 2.43±0.14 | 2.36±0.13 | 2.36±0.13 | 2.36±0.22 | 2.50±0.25 | 2.50±0.20 | 2.43±0.25 |
| Brucella abortus | 7 | 2.29±0.18 | 2.14±0.14 | 2.14±0.14 | 2.29±0.29 | 2.14±0.26 | 2.14±0.14 | 2.29±0.18 |
| | 8 | 2.00±0.31 | 1.86±0.34 | 2.00±0.00 | 2.00±0.22 | 2.14±0.26 | 1.86±0.26 | 2.00±0.31 |
| | Σ 7,8 | 2.14±0.18 | 2.00±0.18 | 2.07±0.07 | 2.14±0.18 | 2.14±0.18 | 2.00±0.15 | 2.14±0.06 |
| <p>($\bar{x} \pm S\bar{x}$) – средняя и ее средняя квадратическая ошибка, % ($\bar{x} \pm S\bar{x}$) – middle and her quadratic error, %</p> | | | | | | | | |

Более того, оба этих показателя не отличаются от длительности подсчета ЛфР в положительных пробах при иммунореагенте на синтетическом сорбенте ($14,6 \pm 0,1$ мин). Статистически значимое сокращение времени подсчета результата при наличии ЛфР в пуле лимфоцитов имеет место у 5 из 5 больных, а при отсутствии ЛфР даже незначительное снижение зарегистрировано существенно ($P=3,9 \cdot 10^{-4}$) реже – у 1 из 15 больных.

Таблица 7. Хронометраж подсчета результатов теста выявления ЛфР у 20 больных с подозрением на бруцеллез

Table 7. Chronometry of results count of LfR revealing in 20 patients suspected of having brucellosis

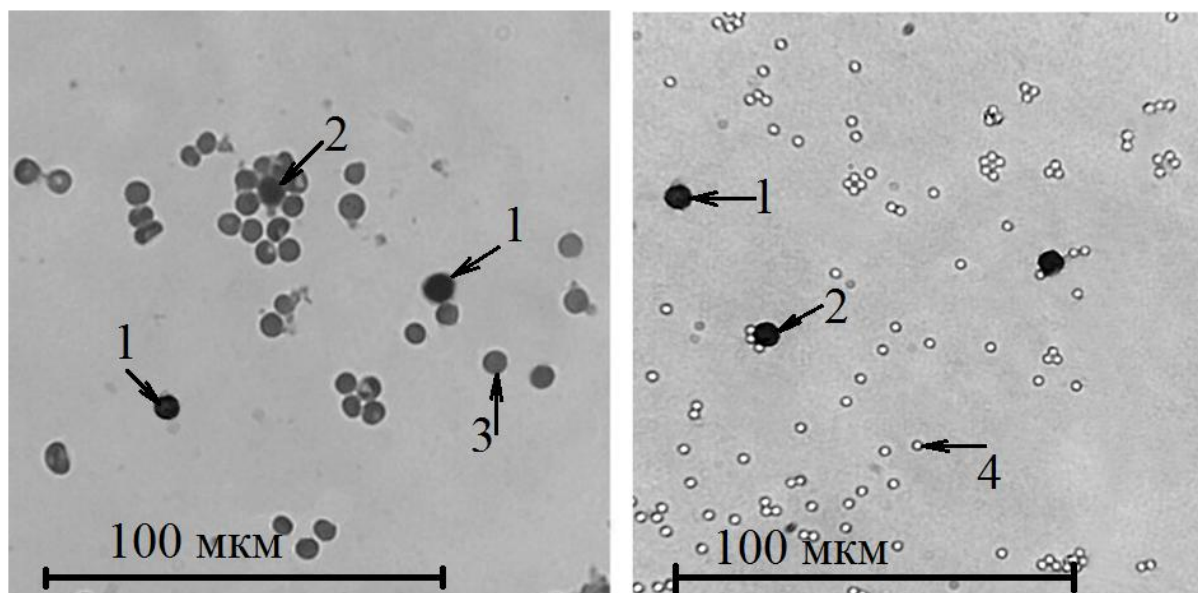
| Показатели Indicators | Подтверждение диагноза по тесту ЛфР Confirmation of diagnosis with LfR test | | |
|--|--|---------------|----------------|
| | ЛфР(+)LfR(+) | ЛфР(-) (LfR-) | P ₂ |
| Количество пациентов Quantity of patients | 5 | 15 | |
| Среднее содержание ЛфР ($\bar{x} \pm S\bar{x}$), %, при сорбенте: эритроцитарном Middle content of LfR ($\bar{x} \pm S\bar{x}$) % at sorbent: erythrocyte | 4.11±0.21 | 0 | |
| синтетическом synthetic | 5.05±0.31 | 0 | |
| P ₁ | 0.05>P>0.02 | - | |
| Средняя длительность подсчета результата ($\bar{x} \pm S\bar{x}$), % сек при сорбенте: эритроцитарном Middle duration of result count ($\bar{x} \pm S\bar{x}$), % sec at sorbent: erythrocyte | 1210±76 | 881±8 | <<0.001 |
| синтетическом synthetic | 875±3 | 871±7 | 0.8>P>0.7 |
| P ₁ P ₁ | 0.01>P>0.001 | 0.4>P>0.3 | |
| Средняя кратность сокращения затрат времени на подсчет результата при замене сорбента на синтетический Middle fold of decrease of time spending at change of sorbent to synthetic | 1.4±0.1 | 1.012±0.006 | <<0.001 |
| Затрата времени ($\bar{x} \pm S\bar{x}$), сек., на выявление одного ЛфР при сорбенте: эритроцитарном Timespending ($\bar{x} \pm S\bar{x}$), sec for revealing 1 LfR at sorbent: erythrocyte | 42.2±1.4 | - | - |

| | | | |
|----------------|----------|---|---|
| синтетическом | 25.1±1.9 | - | - |
| synthetic | | | |
| P ₁ | <<0.001 | | |

($\bar{x} \pm S\bar{x}$) – средняя и ее средняя квадратическая ошибка;
P₁ – вероятность нуль-гипотезы при сравнении показателей при различных сорбентах;
P₂ – вероятность нуль-гипотезы при сравнении показателей при выявлении и отсутствии ЛфР.

($\bar{x} \pm S\bar{x}$) – middle and her quadratic error;
P₁ – probability of the zero-hypothesis at comparison of indicators at different sorbents;
P₂ – probability of the zero-hypothesis at comparison of indicators at revealing and absence of LfR.

Таким образом, сокращение времени подсчета результата вследствие применения синтетического сорбента обусловлено затратами времени на визуальное определение ЛфР. Интегральным показателем для сравнения быстроты выявления ЛфР может служить время, затрачиваемое на визуальное обнаружение одного ЛфР. Оказалось, что при использовании иммунореагента на основе эритроцитарного сорбента на это затрачено от 38 до 45, в среднем 42,2±1,4 секунды, а при использовании иммунореагента на основе синтетического сорбента – от 22 до 32, в среднем – 25,1±1,9 секунды, то есть в 1,7 раза меньше. Приведенный рисунок 1 показывает, что это преимущество обусловлено более легким выявлением ЛфР при использовании иммунореагента на синтетическом сорбенте.



1 – лимфоцит (8 мкм), не связавший >2 корпускул иммунореагента; 2 – лимфоцит (8 мкм), связавший >2 корпускул иммунореагента (ЛфР); 3 – эритроцитарный иммунореагент (4 мкм); 4 – синтетический иммунореагент (2 мкм)

Рис. 1. Обнаружение ЛфР при использовании реагентов на основе эритроцитарного (А) и синтетического (В) сорбентов

1 – lymphocyte (8 μm) not binding >2 corpuscle of immunologic reagent; 2 – lymphocyte (8 μm) binding >2 corpuscle of immunologic reagent (LfR); 3 – erythrocyte immunologic reagent (4 μm); 4 – synthetic immunologic reagent (2 μm).

Fig. 1. Revealing of ABL at use of reagents on the bases the erythrocyte (A) and synthetic (B) sorbents

Полученные результаты обосновывают целесообразность замены эритроцитарного на синтетический сорбент в иммунореагентах, предназначенных для определения ЛфР, специфичных к ЛПС бруцелл и, вероятно, к ЛПС возбудителей других инфекций.

ВЫВОДЫ

1. Синтетический сорбент, не нагруженный антигеном, в отличие от эритроцитарного, не взаимодействует с лимфоцитами иммунизированных животных и больных людей. Применение синтетического сорбента вместо эритроцитарного в иммунореагентах для выявления лимфоцитов с

рецепторами к антигену позволяет повысить специфичность теста определения ЛфР и исключить параллельный тест с сорбентом, не нагруженным антигеном.

2. Замена эритроцитарного сорбента на синтетический не отменяет обусловленного таксономическими связями ЛПС бруцелл и *Y. enterocolitica* серовара О9 взаимодействия, хотя и более слабого, разработанных бруцеллезных ЛПС-иммунореагентов с лимфоцитами, имеющими рецепторы для ЛПС бруцелл ЛПС *Y. enterocolitica* О9.

3. Замена в иммунореагентах эритроцитарного сорбента на синтетический позволяет ускорить выполнение подсчета ЛфР в положительных пробах почти в 3 раза за счет исключения теста с контрольным иммунореагентом и более простым выявлением ЛфР микроскопическим методом.

Финансирование

Работа выполнена по гранту №4187/ГФ4 от 01.04.2015 г. Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан.

ЛИТЕРАТУРА

1. Каральник Б.В., Денисова Т.Г., Грушина Т.А., Курманова Г.М., Омарова М.Н. Набор реагентов для иммунологической диагностики бруцеллеза и способ диагностики бруцеллеза. Предпатент РК №14578 // Промышл. собственность. Официальный бюллетень. – Алматы, 2004. – №7. – С. 7-10.

2. Каральник Б.В., Денисова Т.Г., Грушина Т.А., Тугамбаев Т.И. Анализ иммунного ответа морских свинок, инфицированных *B. melitensis* // Ж. микробиологии. – М., 2002. – №2. – С. 52-56.

3. Каральник Б.В., Денисова Т.Г. Метод выявления АСЛ/В кн.: Курманова К.Б., Дуйсенова А.К. Бруцеллез. Клинические аспекты. – Алматы, 2002. – С. 14-24.

4. Каральник Б.В., Денисова Т.Г., Жунусова Г.Б. и др. Эффективность различных реакций определения антител и теста антигенсвязывающих лимфоцитов в диагностике бруцеллеза у людей // Медицинская иммунология. – СПб., 2006. – Т. 8, №4. – С. 74-78.

5. Мамутова А.М., Кадырова Ш.А., Жанкин А.А. и др. Определение антигенсвязывающих лимфоцитов при остром и подостром бруцеллезе // Гигиена, эпидемиология и иммунобиология. – Алматы, 2007. – №1. – С. 109-113.

6. Шамардин В.А., Каральник Б.В. Зависимость блокирования поверхности эритроцита от количества связанных в процессе гемосенсибилизации молекул IgG // Ж. микробиологии. – М., 1976. – №12. – С. 81-85.

7. Westphal O., Lüderitz O., Bister F. Ueber die Extraktion von Bakterien mit Phenol-Wasser (Об экстракции бактерий смесью фенол-вода) // Z. Naturforsch. – 1952. – Bd. 76. – S. 148-155.

8. Каральник Б.В., Шамардин В.А., Шмуцер М.Ф. Сравнительная оценка стабилизации эритроцитов для реакции пассивной гемагглютинации формальдегидом и ацетальдегидом // Вакцины и сыворотки. – М., 1973. – Вып. 20. – С. 122-126.

9. Каральник Б.В., Лещинская Л.Ц. Способ получения иммунореагента. АС СССР 862919 // Бюлл. изобретений. – М., 1981. – №34. – С. 30.

10. Nielsen K.H., Wright P.F., Kelly W.A., Cherwonogrodzky J.H. A review of enzyme immunoassay for detection of antibody to *Brucella abortus* in cattle (Обзор определения антител к *Brucella abortus* у кошек иммуноферментным методом) // Vet. Immunol. Immunopathol. – 1988. – Vol. 18, №4. – P. 331-347.

11. Дифференциальная диагностика бруцеллеза и иерсиниоза и меры по их профилактике: методические рекомендации / Министерство сельского хозяйства и продовольствия РСФСР. – М., 1991. – 14 с.

12. Смирнов И.В. Способ дифференциации иерсиний серовара О9 от бруцелл // Патент РФ №1703119.

13. Каральник Б.В., Студенцова В.К., Булашев А.К., Дмитриев А.Ф., Муканов К.К. Бруцеллезный антителный эритроцитарный диагностикум из моноклональных антител // Ж. микробиологии. – М., 1991. – №4. – С. 63-66.

14. Каральник Б.В., Карабеков А.Ж., Денисова Т.Г. и др. Дифференциальная диагностика бруцеллеза и кишечного иерсиниоза, вызванного *Y. enterocolitica* серовара О9 // Медицина. – Алматы, 2004. – №3. – С. 155-157.

REFERENCES

1. Karalnik B.V., Denisova T.G., Gruschina T.A. et al. Nabo rreagentov dlya immunologicheskoy diagnostiki brucellosa i sposob diagnostiki brucellosa // Predpatent RK №14578 [Set of reagents for immunologic brucellosis diagnostics and method of brucellosis diagnostics] Predpatent RK №14578: In: Industry property. Official bulletin. Almaty, 2004, no. 7, pp. 7-10.

2. Karalnik B.V., Denisova T.G., Gruschina T.A., Tugambayev T.I. Analiz immunnogo otveta morskych svinok, inficirovannich B. melitensis [Analysis of immune response of infected by *Brucella melitensis* guinea pigs.]. *Z. mikrobiologii* – *J. microbiology*, M., 2002, no. 2, pp. 52-56.

3. Karalnik B.V., Denisova T.G. Metod viyavleniya antigensvyazivayuschich limfocitov [Method of antigen binding lymphocytes revealing]. In: Klinicheskiye aspekty. Almaty, 2002, pp. 14-24.
4. Karalnik B.V., Denisova T.G., Zunosova G.B., et al. Effektivnost razlichnykh reakciy opredeleniya antitel i testa antigensvyazivayuschich limfocytov v diagnostike brucellosa u lyudey [Efficacy of different tests of antibodies determination and test of antigen binding lymphocytes in brucellosis diagnostics at people]. *Medizinskaya Immunologiya. – Medical Immunology*, Sankt-Peterburg, 2006, vol.8, no.4, pp. 74-78.
5. Mamutova A.M., KadyrovaSch.A., Zankin A.A., et al. Opredeleniye antigensvyazyvayuschich limfocitov pri ostrom I podostrom brucellose [Antigen binding lymphocytes determination at acute and subacute brucellosis]. *Gigiyena, epidemiologiya i immunobiologiya – Gigiene, epidemiology and immunobiology*, Almaty, 2007, no.1, pp. 109-113.
6. Schamardyn V.A., Karalnik B.V. Zavisimost blokirovaniya poverchnosti erithrocita ot kolichestva svyazannich v processe hemosensibilizacii molekul IgG [Addiction of blocking of erythrocyte surface from quantity of binding IgG molecules]. *Z.mikrobiologii – J. Microbial*, M., 1976, no.12, pp.81-85.
7. Westphal O., Lüderitz O., Bister F. Ueber die Extraktion von Bakterien mit Phenol-Waser. *Z.Naturforsch.*, 1952, Bd.76, pp.148-155.
8. Karalnik B.V., Schamardyn V.A., Schmuter M.F. Sravnitel'naya ocenka stabilizacii eritrocitov dlya reakcii passivnoy hemagglutinacii formaldehidom i acetaldehidom [Comparative estimation of erythrocyte stabilization for haemagglutination reaction by formaldehyde and acetaldehyde]. *Vacciny isivorotki – Vaccines and sera*, M., 1973, no.20, pp. 122-126.
9. Karalnik B.V., Leschinskaya L.Ch. Sposob polucheniya immunoreagenta [Method of immunological reagent preparation]. ASSSSR 862919. Bull. izobreteniy., M., 1981, no.34, pp. 30.
10. Nielsen K.H., Wright P.F., Kelly W.A., Cherwonogrodzky J.H. A review of enzyme immuno-noassay for detection of antibody to *Brucella abortus* in cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1988, vol.18, no.4, pp.331-347.
11. Differencial'naya diagnostika brucellosa i yersinioza i merypoichprofilaktike [Differential diagnostics of brucellosis and yersiniosis]: Metodicheskie rekomendacii. Ministerstvo selskogo chozyajstva i prodovolstviya RSFSR – Methodical recommendations. Ministry of agriculture and food of RSFSR. M., 1991, 14 p.
12. Smirnov I.V. Sposob differenciacii yersiniy serovara O9 ot brucell [Method of differentiation of Yersinia, serovar O9 from Brucella]. Patent RF № 1703119.
13. Karalnik B.V., Studenzova V.K., Bulashev A.K., Dmitriev A.F., Mukanov K.K. Brucellozniy antitelni yerithrocytarniy diagnosticum iz monoklonalnich antitel [Brucella antibody erythrocyte diagnosticum from monoclonal antibodies]. *Z.mikrobiologii – J. microbial*, M., 1991, no.4, pp.63-66.
14. Karalnik B.V., Karabekov A.Z., Denisova T.G., et al. Differencial'naya diagnostika brucelloza i kischechnogo iersinioza, vizvannogo Y. enterocolitica O9 [Differential diagnostics of brucellosis and intestinal yersiniosis caused by Y. enterocolitica O9]. *Medicina – Medicine*, Almaty, 2004, no.3, pp. 155-157.

БРУЦЕЛЛАЛАРДЫҢ ЛИПОПОЛИСАХАРИДТЕРІНЕ РЕЦЕПТОРЛАРЫ БАР ЛИМФОЦИТТЕРДІ АНЫҚТАУ ҮШІН СИНТЕТИКАЛЫҚ ЖӘНЕ ЭРИТРОЦИТАРЛЫҚ СОРБЕНТТЕР НЕГІЗІНДЕ ЖАСАЛЫНҒАН ДИАГНОСТИКАЛЫҚ РЕАГЕНТТЕРДІ САЛЫСТЫРМАЛЫ БАҒАЛАУ

**Каральник Б.В.¹, Денисова Т.Г.¹, Омарова М.Н.¹, Жунусова Г.Б.¹, Тугамбаев Т.И.²,
Закарян С.Б.², Федосов Ю.С.¹**

¹*Х. Жұматов атындағы Гигиена және эпидемиология ғылыми орталығы
М.Мақатаев көш., 34, Алматы, 050002, Қазақстан*

²*М.Айқымбаев атындағы Қазақ карантиндік және зооноздық жұқпалар ғылыми
орталығы*

Капальская көш., 14, Алматы, 050054, Қазақстан

lbimvac@mail.ru

ТҮЙІН

Жұмыс мақсаты – бруцеллезді ерте анықтау үшін синтетикалық сорбент негізінде иммунореагент дайындаумен науқастарды зерттегенде және жануарларда егу тәжірибелерінде бұрын жасалынған эритроцитарлы иммунореагентпен салыстыру. Жұмыста қояндар, ірі және ұсақ қара малға арналған малдәрігерлік бруцеллезді вакциналар, бруцеллалармен иерсиниялардың әртүрлі липополисахаридтері (ЛПС), флуорохронмен (изотиоцианат натрия) белгіленген және белгіленбеген

(-NH₂ немесе -COOH топтармен) химиялық белсендірілген диаметрі 2 мкм полистеролды моншақтар (beads), антигенге рецепторлары (ЛФР) бар лимфоциттерді анықтайтын ертеде жасалынған бруцеллезді эритроцитарлы иммунореагент, бруцеллезға күмәні бар науқастар және егілген қояндардың моноклеарлы фракциялары.

Жасушалар/корпускулаларды адгезиялау және оларды ЛПС-пен оқшаулау, ЛФР санау хронометражі, серияларды статистикалық салыстыру әдістері қолданылған. Синтетикалық сорбент негізінде бруцеллезді иммунореагент жасалынды және бруцеллезді эритроцитарлы иммунореагентпен салыстырғанда оның артықшылықтары анықталды: ЛПС емес сорбентпен байланысу арқасында спецификалық емес адгезиясы жоқ және ЛФР анықтаудың жоғары дәлдігі; лимфоциттерді сорбентпен байланыстырудың паралельді анықтауының қажеті жоқ; ЛФР санауға уақыт азаяды және жеңілдетіледі. Сорбенттің ерекшеліктері ЛПС-қа таксономиялық жақын бактериялары ЛФР анықтауға әсер етпейді. Алынған нәтижелер синтетикалық сорбентте жасалынған ЛФР анықтайтын иммунореагентті қолдану орындылығын негіздейді.

Негізгі сөздер: сорбенттелген иммунореагенттер, ерте диагностика, бруцеллез.