

ПРИМЕНЕНИЕ РОЗ-БЕНГАЛ ТЕСТА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ БРУЦЕЛЛЕЗА ЧЕЛОВЕКА

Р. Диаз, И. Морийон (Университет Наварры (Испания)), А. Казанова, Дж. Ариза (Университет Барселоны (Испания))

Введение

Бруцеллез (Бр) — высококонтагиозный зооантропо-ноз, вызываемый грамотрицательными бактериями рода *Brucella*. Три так называемые «гладкие (S) бруцеллы» (*B. abortus*, *B. suis* и *B. melitensis*) поражают преимущественно крупный рогатый скот, свиней и коз, соответственно. В большинстве случаев Бр человека именно эти виды животных служат источником инфекции. В Средиземноморье и ряде других регионов мира инцидентность Бр у населения очень высока. Однако, из-за непатогномичности симптоматики многие случаи инфекции остаются нераспознанными. По данным медицинских служб разных стран инцидентность Бр колеблется в широких пределах — от 0,01 до 200 на 100 тыс. чел.. Для постановки окончательного диагноза на Бр необходимы лабораторные методы диагностики. Изоляция бруцелл предоставляет неопровержимые доказательства их этиологической роли, но она дорога и опасна. Проведение серологических методов диагностики Бр значительно проще. Мишенью для антител к S-бруцеллам служит преимущественно полисахаридный антиген, являющийся компонентом липополисахарида клеточной стенки этих бактерий. Для гуморального иммунитета характерно изменение в процессе инфекции титров иммуноглобулинов разных классов. На ее острой фазе в сыворотке крови появляются IgM-антитела, а в последующем их титр постепенно снижается; на хронической стадии преобладают IgG- и IgA-антитела. Более того, титр выявляемых в тесте Кумбса неагглютинирующих антител по мере прогрессирования инфекции становится выше титра агглютинирующих антител, для оценки которого используются пробирочной реакцией агглютинации (ПРА). С целью повышения достоверности результатов сыворотку крови обычно одновременно исследуют в ПРА и тесте Кумбса. В настоящее время для диагностики Бр человека также применяют другие методы: иммунохроматографический (на IgM- и IgG-антитела), флуоресцентный поляризационный, разные варианты иммуноферментного анализа (ИФА) и тест с захватом антител *Brucellacapt*. Поскольку большинством из них можно пользоваться только в хорошо оснащенных лабораториях, и они требуют значительных финансовых затрат, то для рутинной диагностики в эндемичных по Бр регионах они часто бывают непригодными.

Роз-бенгал тест (РБТ) — реакция агглютинации, проводимая посредством смешивания на стекле сывороток с суспензией окрашенных клеток *B. abortus*. Его проводят при pH 3,6...3,7. Это очень простой тест, который мог бы стать для маленьких лабораторий оптимальным решением проблемы серологической диагностики Бр людей. Однако, ВОЗ рекомендует подкреплять показания РБТ результатами других диагностических тестов. Основанием для этого стала информация о низкой чувствительности РБТ, с которой исследователи столкнулись при диагностике преимущественно хронических случаев инфекции, и пониженной специфичности его показаний в эндемичных по Бр районах. Задача настоящей работы состояла в оценке диагностической ценности РБТ.

Схема эксперимента и результаты исследований

РБТ проводили на белой керамической пластинке посредством смешивания равных объемов (30 мкл) проб сыворотки с антигеном (Vet Lab Agency, Великобритания). Результаты учитывали через 8 мин (при исследовании сыворотки крови животных этот срок в 2 раза меньше), считая реакцию положительной при формировании хлопьев или кольца. Для определения титра антител наносили на пластинку 8 капель (по 30 мкл) тестируемой сыворотки. Добавляли во 2-ю каплю равный объем физиологического раствора. Переносили 30 мкл смеси в 3-ю каплю, последовательно повторяя эту манипуляцию с остальными каплями. В каждое разведение сыворотки вносили по 1 капле антигена для РБТ. Таким образом, в модифицированной РБТ тестировали пробы в диапазоне разведений от 1:2 до ...1:256.

Те же сыворотки исследовали в ПРА, тестах Кумбса (в микропланшетах) и *Brucellacapt* (Vircell S.L, Испания), а также в иммунохроматографическом тесте (KIT Biomed Res, Нидерланды) в соответствии с инструкциями производителей. При исследовании в РБТ 1 559 сывороток крови людей, имевших отличающуюся от Бр симптоматику, положительный результат зарегистрировали только в 1 случае. По данным анамнеза этот пациент болел Бр в прошлом.

Положительную реакцию в РБТ дали 19 из 20 сывороток, полученных от людей, которые контактировали с инфицированными бруцеллами животными и/или продуктами их убоя, либо которым случайно инокулировали вакцину из штамма Rev 1*B. melitensis* (все обследованные не имели симптомов Бр). Однако, в модифицированной РБТ титр антител ни в одной из этих проб не превышал 1:4. При обследовании данной группы людей в других серологических тестах получили следующие результаты. В ПРА установили наличие в 3 пробах антител в титре 1:160. В тесте *Brucellacapt* 8 проб имели титр антител >1:320. 16 проб

дали положительную реакцию в тесте Кумбса. В иммунохроматографическом тесте обнаружили IgM- и IgG-антитела у 4 и 8 пациентов, соответственно. При исследовании 208 сывороток крови пациентов, от которых изолировали *V. melitensis*, положительный результат в РБТ получили во всех случаях. В 185 пробах титр выявляемых ПРА антител был не ниже 1:160. Титр антител признали диагностически значимым в РБТ в 180 сыворотках (>1:8; чувствительность 87,4%), а в ПРА только в 160 пробах (> 1:160; чувствительность 76,9%). В модифицированной РБТ титр антител в сыворотках крови, давших слабую отрицательную реакцию в тесте Кумбса и содержащих IgM, но не IgG-антитела к S-липополисахариду, варьировал от 1:4 до 1:256, а в сыворотках, давших положительную реакцию в тесте Кумбса и содержащих больше IgG, чем IgM-антител к S-липополисахаридам. 23 сыворотки пациентов, от которых изолировали *V. melitensis*, имели по результатам исследования в ПРА титр антител < 1:160. 6 из них проявили феномен «блокирования». Этот редкий феномен проявляется при затяжном течении Бр образованием неагглютинирующих IgA-антител в титре, более высоком, чем другие антитела к S-липополисахариду бруцелл. Феномен «блокирования» не влиял на показания РБТ и теста Brucellacapt. Поскольку оба упомянутых теста проводят с буферными растворами, имеющими pH 3.65 и 5.0, соответственно, мы предположили, что агглютинация усиливается в кислой среде, обеспечивая преодоление блокировки IgA. Для проверки данной гипотезы использовали для постановки ПРА цитратный буферный раствор с pH 5.0. Действительно это устранило блокирующий эффект в ПРА. При исследовании в ПРА 11 сывороток с титром 1:40... 1:80 прозона исчезала после абсорбции IgA и не проявлялась при pH 5.0. 23 пробы с титром < 1:160 в реакции ПРА и сыворотка 20 чел., имевших контакт с инфицированными *V. melitensis* животными и вакциной Rev 1, одновременно исследовали в РБТ и других тестах. Сопоставив полученные результаты, отметили, что ложные положительную/отрицательную реакцию дали: в иммунохроматографическом тесте на IgM и IgG 4/13 и 12/5, соответственно, в тесте Brucellacapt 2/2, в тесте Кумбса 18/1 и в ИФА 8/0 проб.

Через 1... 1 6 мес после антибиотикотерапии у 11 больных Бр пациентов в перечисленных выше тестах отметили снижение уровня специфических антител. Титр антител у 9 чел. опустился ниже диагностически значимого, но в 1 случае сыворотка продолжала давать положительную реакцию в тесте Кумбса и ИФА и еще у одного пациента она помимо положительной реакции в этих 2 реакциях была признана позитивной в тесте Brucellacapt (титр 1:320).

Обсуждение

В самом начале изучения Бр установили, что эта инфекция сопровождается образованием антител, выявляемых в ПРА. Вскоре более практичной признали реакцию агглютинации на стекле, но она нередко давала ложноотрицательный результат, обусловленный прозоной и высоким титром неагглютинирующих антител [6]. Нами установлено, что с помощью РБТ можно избежать таких проблем. Более того, этот тест оказался высокочувствительным. Модифицированный РБТ позволяет определять титр антител, проявляя высокую специфичность, что исключает необходимость дополнительного применения других методов диагностики. В таком варианте РБТ можно считать идеальным для маленьких лабораторий методом серологической диагностики брюшного тифа.

Причиной того, что чувствительность стандартно проводимого РБТ переменна, может быть применение для постановки теста разных антигенов. Этот недостаток РБТ обусловлен способностью S-вариантов бруцелл трансформироваться в R-варианты, лишенных диагностически значимых эпитопов S-липополисахарида [5]. Определенную роль играет правильное проведение теста (сыворотки крови следует инкубировать в смеси с антигеном не 2...5 мин, как при исследовании сывороток животных, а дольше; применять белые пластинки и дифференцировать реакцию агглютинации по типу. По нашим наблюдениям, сыворотки без блокирующих антител дают положительную реакцию в течение 4 мин, но пробы с высоким титром блокирующих IgA или неагглютинирующих антител,

дающие интенсивную реакцию в тесте Кумбса, образуют в РБТ агглютинаты в течение 8 мин. Эти антитела обычно появляются на хронической стадии инфекции. Поэтому причиной низкой чувствительности теста (54.. 61%) при серологическом исследовании такой категории пациентов, вероятно, служит неоптимизированная методика его проведения. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что РБТ в одинаковой степени пригоден для исследования IgM-негативных (хроническая инфекция) и IgM-позитивных (острая инфекция) пациентов, а применение буферного раствора с pH = 5.0 устраняет прозону и феномен «блокирования».

Поскольку РБТ выявляет IgM, IgG и IgA-антитела к S-липополисахариду и не дает ложноотрицательных результатов за счет прозон и блокирующих антител, то, по данным литературы и нашим наблюдениям, этот метод по чувствительности не уступает ПРА, ИФА, иммунохроматографическому тесту на IgM- и IgG-антитела при исследовании сывороток пациентов, от которых изолировали бруцеллы. На показания РБТ и других тестов, выявляющих антитела к S-липополисахариду, не оказывают влияние другие лихорадочные заболевания, в т.ч. туберкулез, малярия, брюшной тиф, ревматоидный артрит, саркоидоз и активная лимфома. С другой стороны S-липополисахарид бруцелл дает перекрестные реакции с *V. cholerae*, *F. tularensis* и *Y. enterocolitica* O:9, но это не имеет большого клинического значения, т.к. по симптоматике бруцеллез значительно отличается от этих инфекций.

Таким образом, при выявлении в РБТ антител в титре > 1:8 можно диагностировать Бр. Чтобы определить

стадию инфекционного процесса можно исследовать сыворотку в иммунохроматографическом тесте: на начальной стадии выявляют IgM-антитела, а IgG-антитела отсутствуют; в последующем титр последних повышается на фоне сохранения высокого титра IgM-антител; на хронической стадии IgM-антитела исчезают, а IgG-антитела сохраняются. В случаях частого контакта с источником инфекции, перенесении ее в прошлом и хронической формы Бр титр антител, выявляемых в РБТ, ниже 1:8. Для подтверждения диагноза в таких случаях необходимо применить культуральный метод и другие серологические тесты (Кумбса, Brucellacapt).

Библиография

1. *Seimenis A., Morelli D., Mantovani A.* Zoonoses in the Mediterranean region. *Ann Ist Super Sanita*, 2006, 42, 437-445.
2. *Franco M.P., Mulder M., Gilman R.H., Smits H.L.* Human brucellosis. *Lancet Infect Dis*, 2007, 7, 775-786.
3. *Chernysheva M.I., Gubina E.A., Zheludkov M.M., Perekopskaia T.I.* Isopol'zovanie kislogo antigen roz-bengal v plastinchatoi reaktsii agglutinatsii pri brutselleze u liudei. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*, 1988, 84-88.
4. *Irmak H., Buzgan T., Evirgen O.* et al. Use of the Brucella IgM and IgG flow assays in the serodiagnosis of human brucellosis in an area endemic for brucellosis. *Am J Trop Med Hyg*. 2004, 70, 688-694.
5. *Alton G.G., Jones L.M., Angus R.D., Verger J.M.* Techniques for the brucellosis laboratory. Paris, France: INRA, 1988.
6. *Spink W. W.* The evolution of the concept that brucellosis is a disease of animals and man. In: *The nature of brucellosis*. Minneapolis: Lund Press Inc, 1956, 3-27.

С разрешения авторов перевод статьи и библиография приведены в сокращенном виде *Diaz R., Casanova A., Ariza J., Moriyon I.* The Rose Bengal Test in Human Brucellosis: A Neglected Test for the Diagnosis of a Neglected Disease. *PLoS Negl Trop Dis*, 2011, 5, 4, e950.