

РЕЗУЛЬТАТИ ВИПРОБУВАННЯ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ РНІФ-ТЕСТ-СИСТЕМИ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ БАРТОНЕЛЬОЗНОГО АНТИГЕНУ

Доц. А. В. Бондаренко, канд. мед. наук С. І. Похил*, О. В. Бондаренко*,
канд. мед. наук О. М. Тимченко*

**Харківський національний медичний університет.
*Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова**

*Розроблено тест-систему для діагностики бартонельозної інфекції в реакції непрямой імунофлюоресценції (РНІФ) шляхом виявлення антигену (бактерій *Bartonella henselae*) у зразках клінічного матеріалу. Результати лабораторного тестування з використанням як модельних, так і клінічних зразків показали достатній рівень специфічності, чутливості та відтворюваності РНІФ-діагностики бартонельозної інфекції з використанням створеної системи.*

РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ РНИФ-ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БАРТОНЕЛЛЕЗНОГО АНТИГЕНА

Доц. А. В. Бондаренко,
канд. мед. наук С. И. Похил*, О. В. Бондаренко*,
канд. мед. наук Е. М. Тимченко*

*Разработана тест-система для диагностики бартонеллезной инфекции в реакции непрямой иммунофлюоресценции (РНІФ) путем детекции антигена (бактерий *Bartonella henselae*) в образцах клинического материала. Результаты лабораторного тестирования с использованием как модельных, так и клинических образцов показали достаточно высокий уровень специфичности, чувствительности и воспроизводимости РНИФ-диагностики бартонеллезной инфекции с использованием созданной системы.*

THE RESULTS OF THE TRIAL OF EXPERIMENTAL INDIRECT IFA-TEST-SYSTEMS FOR BARTONELLA ANTIGEN DETECTION

A. V. Bondarenko, S. I. Pokhil*, O. V. Bondarenko*,
O. M. Timchenko*

*Test-system for diagnostic of bartonella infection in indirect immunofluorescence assay (IFA) by antigen (bacteria *Bartonella henselae*) detection has been developed. The results of laboratory testing by using both model and clinical samples have shown sufficient level of specificity, sensitivity and reproducibility of the IFA-diagnostic of bartonellosis by using the system developed.*

Методи для етіологічної діагностики бартонельозної інфекції (БІ) знаходяться на початковому етапі розробки. Поліетіологічність захворювання ускладнює завдання. Клінічний діагноз встановлюється лише за умови типового перебігу захворювання, переважна ж більшість клінічних форм БІ залишаються не діагностованими, що негативно впливає на ефективність лікування. Мікробіологічні методи лабораторної діагностики БІ не знайшли широкого застосування безпосередньо в медичній практиці, оскільки виділити збудника зі зразків клінічного матеріалу при використанні традиційних живильних середовищ та прийомів вдається дуже рідко: бартонели характеризуються високою вибагливістю до живильного середовища і умов культивування. Завдяки простоті, універсальності та доступності для практичних закладів

охорони здоров'я більшість дослідників віддають перевагу реакції непрямой імунофлюоресценції (РНІФ) [1, 4, 6, 7, 9]. Ефективність використання РНІФ залежить від багатьох чинників, однак визначальним є рівень специфічності, чутливості та відтворюваності результатів реакції, що, у свою чергу, залежить від рівня афінності між регіональними штамами збудника та імунобіологічними препаратами, які входять до складу зазначених систем. Це стимулює розробку національних РНІФ-тест-систем на основі типових, а також регіональних штамів продуцентів антигенів. В Україні експериментальний зразок РНІФ-тест-системи для діагностики БІ шляхом виявлення антигену (бактерій *Bartonella henselae*) у зразках клінічного матеріалу розроблений вперше [3].

Мета роботи — клініко-лабораторне випробування РНІФ-тест-системи (діагностичного набору) для виявлення бартонельозного антигену (детекції збудника).

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Об'єктом дослідження був зразок РНІФ-тест-системи для виявлення бартонельозного антигену (АгБІ) у зразках клінічного матеріалу. Diagnostичний набір містить: 0,5 мл антигену бартонельозного (корпускулярна суспензія штаму *Bartonella henselae* ЛНМІЗ 06U054 у фосфатно-сольовому буфері (рН=7,2) з 0,5 % (об'єм/об'єм) оболонкою жовтка семидобового ембріона курки і 0,05 % (об'єм/маса) азидом натрію); 1,0 мл антибартонельозних імуноглобулінів (Ig) кролика (антБарІgКр) (γ -глобулінова фракція сироватки крові кроликів, гіперімунізованих корпускулярним антигеном референтного штаму *B. henselae* ЛНМІЗ 06U054); 0,5 мл антивидових флюорескуючих Ig проти Ig кролика (висушена ліофільним методом γ -глобулінова фракція сироватки коня, бика або інших тварин, імунізована препаратами глобулінів крові кролика і помічена флюорохромом — флюоресцеїн-5-ізотіоціанатом); 0,5 мл альбуміну бика, міченого родаміном (висушена ліофільним методом альбумінова фракція сироватки бика, помічена флюорохромом — сульфохлоридом родаміну Б); 1,2 мл рідини для монтування препаратів.

Для випробування РНІФ-тест-системи з метою виявлення АгБІ було використано: як модельні — 45 типів гомо- та гетерологічних (відносно антБарІgКр) корпускулярних антигенів зі штамів мікроорганізмів групи *Proteobacteria* і грампозитивних *Eubacteria*. Зазначені модельні зразки являли собою корпускулярні суспензії антигенів у забуференому 0,85%-вому розчині NaCl (рН=7,0–7,2), виготовлені з музейних штамів мікроорганізмів та на основі корпускулярних діагностиків, включених до складу комерційних діагностичних наборів різного виробництва; 17 зразків клінічного матеріалу (кров, біоптат ангіом) від хворих на БІ; 40 зразків клінічного матеріалу (кров, пунктат лімфовузлів, секційний матеріал), які за своїм походженням не містили бактерій роду *Bartonella*. Модельні зразки та частину зразків клінічного матеріалу було дозовано (10^2 – 10^8 корпускул/мл) контаміновано штамми *B. henselae* та мікроорганізмами інших таксономічних груп.

Для оцінки інтенсивності специфічної флюоресценції при визначенні рівня АгБІ використовували чотирьоххрестову систему визначень: «++++» — яскраво-блискуча смарагдово-зелена флюоресценція периферії, що чітко контрастує з темним тілом мікробних клітин; «+++» — помірно яскрава смарагдово-зелена флюоресценція периферії, що контрастує з темним тілом мікробних клітин; «++» — виражена флюоресценція, але меншої інтенсивності, морфологічні особливості у деяких бактерій чітко не виявляються, можливе

зелене світіння всієї мікробної клітини; «+» — помітне, але не інтенсивне світіння невизначеного кольору, морфологічні особливості визначаються погано, флюоресценція виявляється по всій клітині або фрагментарно; «–» — світіння не виявляється, ледь помітні «тіні» клітин.

Позитивний результат РНІФ (виявлення АгБІ) констатували за таких умов: наявність у кількох полях зору досліджуваного зразка клінічного матеріалу однотипних мікробних клітин із характерною для збудника БІ морфологією — коко-паличками розміром $(0,8\text{--}2,0) \times (0,6\text{--}0,8)$ мкм — та їх специфічною флюоресценцією; наявність специфічної флюоресценції морфологічно однотипних клітин у препаратах гомологічних мікроорганізмів; відсутність морфологічно типових клітин із специфічною флюоресценцією у препаратах гетерологічних мікроорганізмів та в контрольних мазках, які обробляли нормальними Ig кролика. При іншій комбінації суми умов (ознак) щодо РНІФ-тестування досліджуваних і контрольних препаратів результати РНІФ вважали негативними або сумнівними — такими, що потребували повторного дослідження.

Статистичну обробку результатів досліджень проводили за правилами рядової та альтернативної варіаційної статистики [2].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При трикратному паралельному тестуванні РНІФ-системи для виявлення АгБІ на гомо- та гетерологічних корпускулярних антигенах із штамів *B. henselae*, *B. quintana*, *R. prowazekii*, *R. typhi*, *R. mooser*, *B. abortus*, *C. burnetii*, *L. pneumophila*, *E. coli*, *S. flexneri*, *S. choleraesuis*, *Yersinia spp.*, *H. alvei*, *E. herbicola*, *P. vulgaris*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter spp.*, *H. influenzae*, *P. multocida*, *Corynebacterium spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *Micrococcus spp.*, *Actinomyces spp.*, *Bordetella spp.*, *Campylobacter spp.* позитивні результати РНІФ були зафіксовані лише в модельних зразках, що містили 7 різних штамів *B. henselae* та 1 корпускулярний діагностик *B. quintana*, який включав суміш штамів «Ш» і «Д» цього виду бартонел виробництва НПО «Биомед» (м. Перм, РФ). В усіх інших випадках відтворення РНІФ із гетерологічними корпускулярними антигенами результати реакції були негативними або сумнівними в одному із трьох повторень. Специфічність цього типу РНІФ-тест-системи була визначена на рівні $\approx (92 \pm 3) \%$ при відтворюваності результату $\approx (95 \pm 5) \%$. При клініко-лабораторному випробуванні РНІФ-тест-системи для виявлення АгБІ у 12-ти із 17-ти (70,6 %) досліджених зразках клінічного матеріалу від хворих на БІ останній був виявлений АгБІ, і в жодному з 40-ка зразків крові від хворих на інші інфекції та клінічно здорових людей.

Для діагностики БІ фахівцями різних країн створено РНІФ-тест-системи на основі, як правило, типових або референтних штамів-продуцентів бартонельозних антигенів [1, 5]. Однак відомо, що культури *B. henselae* з різних регіонів дещо

відрізняються не лише за морфологічними, культуральними чи біохімічними властивостями, але й за антигенною структурою, що може знижувати рівень афінності при постановці РНІФ і, взагалі, негативно впливати на показники специфічності та чутливості імунологічних реакцій [5, 8, 9]. Для створення вітчизняних РНІФ-тест-систем нами як виробничий штаб для отримання АГБІ використано регіональний штаб (українська популяція) *B. henselae* ЛНМІЗ 06U054. Тестування на модельних та клінічних зразках показало задовільні результати за рівнями чутливості, специфічності та відтворюваності результатів, які виявились близькими до аналогічних показників випробованих тест-систем, створених за кордоном [1, 4, 5, 7, 9]. Зазначені показники рівнів специфічності та відтворюваності були отримані при концентрації в модельних зразках клітин антигенів 10^5 – 10^8 корпускул/мл. За умови зниження концентрації антигенів до 10^2 – 10^4 корпускул/мл позитивний результат РНІФ встановити було значно складніше, оскільки різко зростала кількість полів зору, які необхідно було переглянути у препараті для виявлення клітин антигену зі специфічною флюоресценцією на «+++». Також при концентраціях антигену менше 105 корпускул/мл значно знижувався (до 40–70%) рівень відтворюваності результатів при повторних дослідженнях одних і тих самих модельних зразків. Із цих міркувань рівень чутливості такої РНІФ-системи, (приблизно) визначено як 10^5 корпускул антигену/мл. Крім того, собівартість вітчизняних РНІФ-тест-систем є суттєво нижчою, ніж собівартість імпортованих аналогів. Результати наших досліджень підтвердили дані інших науковців [1, 5, 7] щодо наявності явища

сероконверсії між різними представниками роду *Bartonella* (*B. henselae* і *B. quintana*) та між представниками родин *Bartonella* і *Rickettsia* (між *R. mooseri* і *B. henselae*), що необхідно враховувати при відтворенні РНІФ та трактуванні результатів досліджень.

Простота відтворення РНІФ, доступність та відносна дешевизна розробленого діагностичного набору для детекції клітин *B. henselae* створюють необхідні умови для впровадження РНІФ-тест-системи у повсякденну практику бактеріологічних лабораторій, що сприятиме підвищенню рівня етіологічної розшифровки і збігається з пріоритетним науковим напрямком, визначеним МОЗ та АМН України як «Розробка принципово нових методів діагностики, лікування та профілактики найпоширеніших хвороб людини, в тому числі онкологічних, СНІДу, серцево-судинних захворювань, цукрового діабету, туберкульозу, інфекційних захворювань тощо».

ВИСНОВКИ

Розроблено тест-систему для діагностики БІ в реакції непрямой імунофлюоресценції шляхом визначення у зразках клінічного матеріалу (кров, пунктат лімфовузлів, скарифікат ангіом, секційний матеріал та ін.) антигену збудника (клітин *B. henselae*).

Проведено експериментальне випробування РНІФ-тест-системи для виявлення АГБІ при тестуванні модельних та клінічних зразків. Установлено, що використання тест-системи *перспективно* і забезпечує проведення лабораторних досліджень з рівнем: чутливості $(1,3 \pm 0,7) \times 10^5$ корпускул антигену/мл, специфічності $92 \pm 3\%$, відтворюваності $95 \pm 5\%$.

ЛІТЕРАТУРА

1. Игнатович В. Ф. Сероиммунологический мониторинг микроорганизмов родов *Rickettsia* и *Bartonella* в Московском регионе / В. Ф. Игнатович, Е. П. Лукин, Н. С. Умнова и др. // ЖМЭИ. — 2001. — № 1. — Р. 14–17.
2. Лакин Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин. — М.: Высшая школа, 1990. — 352 с.
3. Похил С. І. Спосіб лабораторної діагностики бартофельозної інфекції за допомогою реакції непрямой імунофлюоресценції / С. І. Похил, В. М. Козько, А. В. Бондаренко та ін. // Інформаційний бюлетень (додаток до «Журналу Академії медичних наук України»). — Київ, 2007. — Вип. 22. — С. 76.
4. Del Prete R. Prevalence of antibodies to *Bartonella henselae* in patients with suspected cat scratch disease (CSD) in Italy / R. Del Prete, D. Fumarola, L. Fumarola [et al.] // Eur. J. Epid. — 1999. — Vol. 15, № 6. — P. 583–587.
5. La Scola B. Culture of *Bartonella quintana* and *Bartonella henselae* from human samples: a 5-year Experience (1993 to 1998) / B. La Scola, D. Raoult // J. Clin. Microbiol. — 1999. — Vol. 37, № 6. — P. 1899–1905.
6. Maurin M. Comparison of in-house and commercial slides for detection by immunofluorescence of immunoglobulins G and M against *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* / M. Maurin, J. M. Rolain, D. Raoult // Clin. Diagn. Lab. Immunol. — 2002. — Vol. 9, № 2. — P. 1004–1009.
7. Sander A. Seroprevalence of Antibodies to *Bartonella henselae* in Patients with Cat Scratch Disease and in Healthy Controls: Evaluation and Comparison of Two Commercial Serological Tests / A. Sander, M. Posselt, K. Oberle, W. Bredt // Clin. Diagn. Lab. Immunol. — 1998. — Vol. 5, № 4. — P. 486–490.
8. Tsuneoka H. Clinical evaluation of commercial serological test for *Bartonella* infection / H. Tsuneoka, R. Fujii, K. Fujisawa [et al.] // Kansenshogaku Zasshi. — 2000. — Vol. 74, № 4. — P. 387–391.
9. Vermeulen M. J. Serological testing for *Bartonella henselae* infections in The Netherlands: clinical evaluation of immunofluorescence assay and ELISA / M. J. Vermeulen, M. Herremans, H. Verbakel [et al.] // Clin. Microbiol. Infect. — 2007. — Vol. 13, № 6. — P. 627–634.