

А. М. САДЫКОВА
 Казахский Национальный Медицинский Университет
 им. С.Д. Асфендиярова
 Кафедра инфекционных и тропических болезней
 Городская клиническая инфекционная больница им. И.С. Жекеновой
 Алматы

ОЦЕНКА СПЕЦИФИЧНОСТИ ВЫЯВЛЕНИЯ ЛИМФОЦИТОВ С РЕЦЕПТОРАМИ К АНТИГЕНАМ ШИГЕЛЛ ПРИ ОБСЛЕДОВАНИИ НА ДИЗЕНТЕРИЮ

В эксперименте иммунизации кроликов шигеллами и при обследовании 364 больных острыми кишечными инфекциями показана родовая (внутри семейства *Enterobacteriaceae*), видовая (внутри рода *Shigella*) и подвидовая (внутри вида *Shigella flexneri*) специфичность иммунореагентов из ЛПС шигелл, предназначенных для выявления лимфоцитов с рецепторами к *Shigella* – антигенсвязывающих лимфоцитов. С учетом ранее продемонстрированной более высокой, чем у бактериологического метода, чувствительностью метод определения антигенсвязывающих лимфоцитов целесообразно применять в диагностике дизентерии.

Ключевые слова: иммунизация, антигенсвязывающие лимфоциты, дизентерия, диагностика.

Определение антигенсвязывающих лимфоцитов (АСЛ) при многих инфекциях является высокоэффективным методом диагностики, в том числе ранней [1-9]. Была выявлена высокая чувствительность этого метода и при дизентерии. Важно выяснить специфичность метода АСЛ при дизентерии.

Материал и методы исследования.

АСЛ выявляли методом розеткообразования с приготовленными реагентами оптимальной и субоптимальной чувствительности специфичности ЛПС шигелл подвидов Флекснер I-V (ЛПС из *S. flexneri* 2a) и Флекснер VI, а также вида Зонне. Специфичность изучали в эксперименте и при обследовании больных с подозрением на дизентерию.

Эксперимент провели на 6 кроликах, иммунизированных взвесями убитых формальдегидом *S. flexneri* 2a (кролики 1 и 2), *S. flexneri* VI (кролики 3 и 4), Зонне (кролики 5 и 6). Кровь у животных для выделения лимфоцитов на градиенте плотности фиколл 400 – верографин забирали через 4, 7, 14, 21 и 28 дней. В каждой суспензии выделенных лимфоцитов при помощи оптимальных и субоптимальных по чувствительности реагентов определяли содержание АСЛ специфичности шигелл Флекснер I-V, Флекснер VI и Зонне.

При обследовании 364 больных, поступивших с подозрением на дизентерию, АСЛ определяли таким же образом.

Для анализа полученных результатов применяли различные методы сравнения серий (точный метод Фишера, оценки по критериям Стьюдента и Сукхатме) и трехфакторного дисперсионного анализа.

Результаты и обсуждение.

Результаты перекрестного определения АСЛ у иммунизированных кроликов показали, что при иммунизации *S. flexneri* подвидов как I-V, так и VI АСЛ специфичности Зонне не были выявлены ни у одного животного при помощи реагентов как субоптимальной, так и оптимальной чувствительности. С другой стороны, при иммунизации *S. sonnei* не были обнаружены АСЛ специфичности обоих подвидов *S. flexneri*, независимо от чувствительности реагентов, гомологичных этим подвидам. Это доказывает видовую специфичность определения АСЛ при иммунном ответе на шигеллы видов Флекснер и Зонне.

Результаты анализа подвидовой специфичности Флекснер приведены в таблице 1.

Таблица 1 - Результаты анализа подвидовой специфичности АСЛ вида Флекснер в эксперименте иммунизации

| Иммуноген | День после иммунизации | № кролика | Реагент | Содержание *АСЛ специфичности подвида | | P |
|--------------|------------------------|-----------|----------------|---------------------------------------|-------------|--------------|
| | | | | Флекснер I-V | Флекснер VI | |
| Флекснер I-V | 4 | 1 | оптимальный | 3,43±0,20 | 1,71±0,18 | <<0,001 |
| | | | субоптимальный | 2,57±0,20 | 1,43±0,20 | <<0,001 |
| | | 2 | оптимальный | 3,86±0,26 | 1,71±0,18 | <<0,001 |
| | | | субоптимальный | 2,29±0,18 | 1,71±0,28 | 0,1>P>0,05 |
| | 7 | 1 | оптимальный | 7,43±0,30 | 2,14±0,26 | <<0,001 |
| | | | субоптимальный | 6,29±0,29 | 1,43±0,20 | <<0,001 |
| | | 2 | оптимальный | 8,43±0,37 | 2,00±0,22 | <<0,001 |
| | | | субоптимальный | 6,00±0,31 | 1,29±0,28 | <<0,001 |
| | 14 | 1 | оптимальный | 6,86±0,26 | 1,14±0,31 | <<0,001 |
| | | | субоптимальный | 4,14±0,34 | 0,71±0,18 | <<0,001 |
| | | 2 | оптимальный | 6,71±0,36 | 0,86±0,34 | <<0,01 |
| | | | субоптимальный | 4,29±0,36 | 0,57±0,20 | <<0,001 |
| Флекснер VI | 4 | 3 | оптимальный | 1,86±0,26 | 3,00±0,22 | 0,01>P>0,001 |
| | | | субоптимальный | 1,14±0,14 | 2,14±0,14 | <<0,001 |
| | | 4 | оптимальный | 2,14±0,26 | 3,71±0,29 | 0,01>P>0,001 |
| | | | субоптимальный | 1,29±0,18 | 2,29±0,18 | <0,001 |
| | 7 | 3 | оптимальный | 1,71±0,18 | 6,71±0,36 | <<0,001 |
| | | | субоптимальный | 1,29±0,18 | 4,86±0,26 | <<0,001 |
| | | 4 | оптимальный | 1,86±0,26 | 6,29±0,36 | <<0,001 |
| | | | субоптимальный | 1,00±0,22 | 4,57±0,20 | <<0,001 |
| | 14 | 3 | оптимальный | 1,29±0,18 | 6,57±0,31 | <<0,001 |
| | | | субоптимальный | 0,86±0,34 | 4,29±0,36 | <<0,001 |
| | | 4 | оптимальный | 1,43±0,20 | 6,71±0,36 | <<0,001 |
| | | | субоптимальный | 0,71±0,18 | 4,00±0,31 | <<0,001 |

Примечания: * – средняя и её средняя квадратическая ошибка, %

P – вероятность нуль-гипотезы при сравнении результатов определения АСЛ

с реагентами различной подвидовой специфичности.

Видно, что гомологичный по подвиду иммуногену реагент позволяет обнаружить достоверно большее, в 1,3 – 11,0 раз, количество АСЛ, чем гетерологичный по подвиду, независимо от чувствительности иммунореагента. Этот результат отражает не только выявление АСЛ специфичности вида

Флексер обоими реагентами подвидовой специфичности, но и четко выраженную подвидовую специфичность определения АСЛ вида Флексер.

Интересно, что общее содержание гомологичных по подвиду АСЛ, как и содержание таких же по специфичности высокоавидных АСЛ, в динамике иммунного ответа (от 4 к 14 суткам) на шигеллы подвида Флексер I-V значимо ($P < 0,001$) увеличивается в 1,9 и 1,7 раза соответственно, но содержание гетерологичных, напротив, существенно ($P < 0,01$) уменьшается – в 2,2 и 2,2 раза соответственно (рис 1).

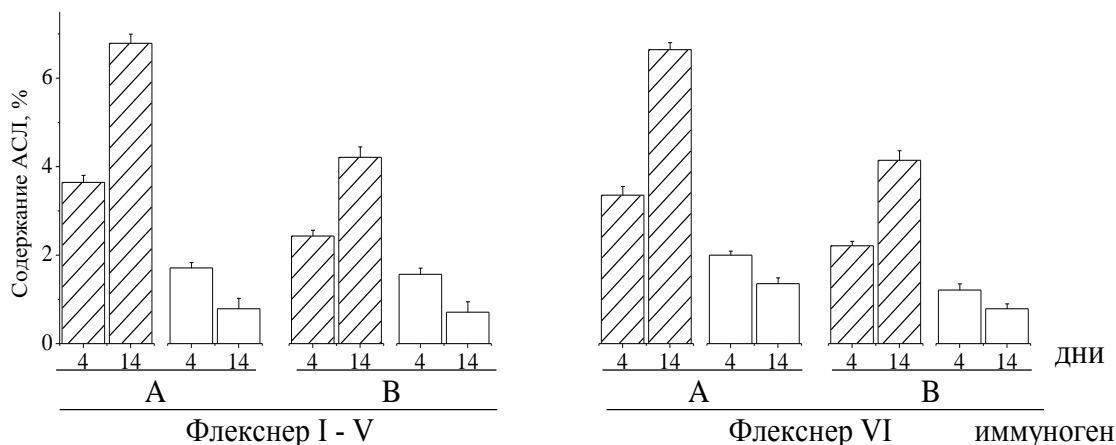


Рисунок 1 - Динамика общего содержания (А) и содержания высокоавидных АСЛ (В) различной подвидовой специфичности Флексер за период 4 – 14 дней после иммунизации



– гомологичные по подвиду АСЛ



– гетерологичные по подвиду АСЛ

Эти результаты показывают, что по мере развития ответа на шигеллы Флексер специфичность продукции АСЛ по подвиду Флексер возрастает.

Аналогично при иммунном ответе на шигеллы подвида Флексер VI общее содержание и содержание высокоавидных гомологичных по подвиду АСЛ значимо ($P < 0,01$) увеличивается в 2,0 и 1,9 раза соответственно, хотя содержание таких же, но гетерологичных по подвиду АСЛ существенно ($P < 0,05$) уменьшается – в 1,5 и 1,5 раза соответственно.

Далее мы рассчитали соотношения содержания гомо- и гетерологичных по отношению к иммуногену АСЛ. Полученные результаты показаны на рис 2.

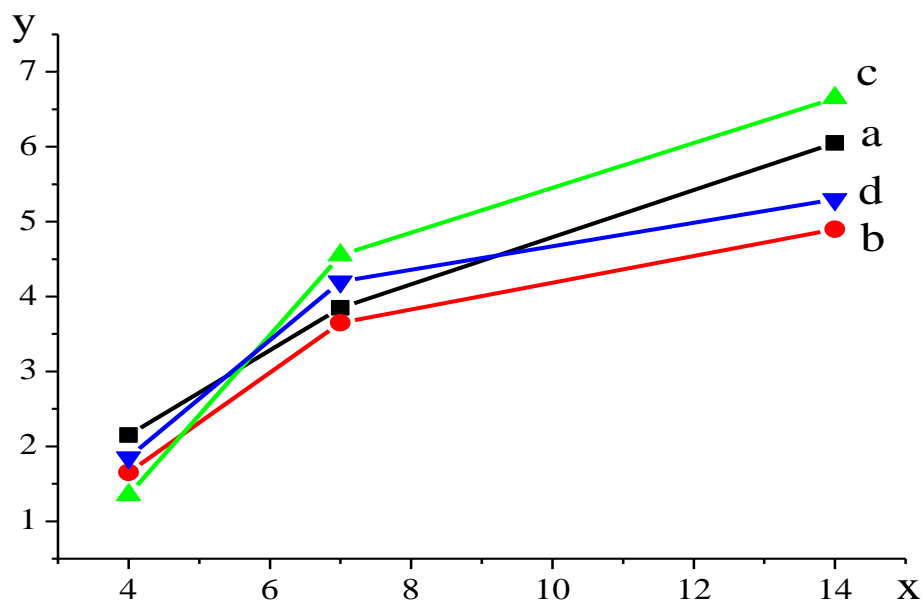


Рисунок 2 - Влияние срока после иммунизации (X) на соотношение содержания гомо- и гетерологических по подвиду Флекснер АСЛ (Y)

- a – соотношение гомо-и гетерологических для Флекснер I – V АСЛ, измеренных при помощи оптимальных реагентов
- b – соотношение гомо- и гетерологических для Флекснер VI АСЛ, измеренных при помощи оптимальных реагентов
- c – соотношение гомо- и гетерологических для Флекснер I – V АСЛ, измеренных при помощи субоптимальных реагентов
- d – соотношение гомо- и гетерологических для Флекснер VI АСЛ, измеренных при помощи субоптимальных реагентов

Трехфакторный дисперсионный анализ влияния на величину этого соотношения следующих факторов - срока после иммунизации, подвиговой специфичности иммуногенов Флекснер и чувствительности использованных в опыте иммунореагентов подвиговой специфичности позволил установить высокозначимое ($P < 0,001$) влияние срока после иммунизации на соотношение содержания АСЛ, гомо- и гетерологических подвида Флекснер. Рост данного соотношения с увеличением срока после иммунизации также демонстрирует повышение подвиговой специфичности иммунного ответа по АСЛ в динамике.

Влияние других факторов и любых сочетаний изученных факторов обнаружить на данном материале не удалось. Следовательно, в динамике ответа на иммунизацию шигеллами вида Флекснер селекция АСЛ подвиговой специфичности развивается практически одинаково, независимо от подвида шигеллезного иммуногена и выявления суммарных (с оптимальным реагентом) или высокоавидных (с субоптимальным реагентом) АСЛ.

Результаты выявления дизентерии Флекснер I-V и VI и Зонне среди больных ОКЗ тестом АСЛ с параллельным использованием реагентов 3 специфичностей и бактериологическим анализом показали следующее. От 24 пациентов из 364 ($6,6 \pm 1,3$) были выделены другие бактерии: *S.dysenteriae* (2 случая), *S.boydii* (1 случай), *Salmonella typhimurium* (3 случая), *Salmonella* группы В другого серовара (1 случай), *Salmonella enteritidis* (14 случаев), *Salmonella chester* (1 случай), *Salmonella* редких групп (1 случай), *Pseudomonas aeruginosa* (1 случай). Ни от одного из этих больных *S.flexneri* любого подвида и *S.sonnei* изолированы не были и АСЛ изученных (под)видов шигелл обнаружены не были. Это однозначно свидетельствует о родовой и видовой специфичности иммунореагентов, по крайней мере, в рамках семейства *Enterobacteriaceae*. *S.flexneri* подвида I-V были выделены от 54 больных ($14,8 \pm 1,9$), подвида VI от 6 ($1,6 \pm 0,4$) и *S.sonnei* от 8 больных ($2,2 \pm 0,8$). У всех этих больных были определены АСЛ соответствующего (под)вида шигелл, что подтверждает описанные выше экспериментальные данные о видовой специфичности АСЛ использованных иммунореагентов.

При этом у больных, от которых выделены шигеллы Флекснер I-V, общее содержание гомологических подвида АСЛ достоверно ($P < 0,001$) превышало в $1,42 - 9,67$, в среднем в $3,57 \pm 0,22$ раза, содержание АСЛ гетерологического подвида – *S.flexneri* VI. У больных, от которых выделены *S.flexneri* VI, общее содержание гомологических этому подвида АСЛ также значимо ($P < 0,001$) в $2,43 - 4,67$, в среднем в $3,14 \pm 0,34$ раза, превышало содержание АСЛ, гетерологических по подвида. Аналогичные результаты получены и при определении высокоавидных АСЛ специфичности подвигов Флекснер (таблица 2).

Сходные результаты получены и при оценке видовой и подвиговой специфичности диагностики дизентерии по АСЛ у тех больных, у которых результаты бактериологических анализов оказались отрицательными. Диагноз дизентерии Флекснер I-V по АСЛ, при отрицательных результатах бактериологических анализов, поставлен у 47 больных. Ни у одного из них не выявлены АСЛ специфичности Зонне, а содержание АСЛ специфичности *S.flexneri* I-V достоверно ($P < 0,001$), в $1,70 - 17,0$, в среднем в $3,47 \pm 0,37$ раза, превысило содержание АСЛ, гетерологических по подвида *S. flexneri*.

Диагноз дизентерии Флекснер VI по АСЛ, при отрицательных результатах бактериологических анализов, поставлен у 29 больных. АСЛ специфичности Зонне у этих больных также не обнаружены, а содержание гомологических по подвида АСЛ было существенно ($P < 0,001$), в $1,38 - 9,83$, в среднем в $4,34 \pm 0,42$ раза, больше чем гетерологических по подвида – специфичности Флекснер I-V. Эти результаты подтверждают на клиническом материале продемонстрированную в эксперименте видовую и подвиговую специфичность АСЛ вида Флекснер.

Таблица 2 - Анализ зависимости выявления АСЛ с реагентами из ЛПС *S.flexneri* 2a от серовара *S.flexneri* I-V, выделенного от больных

| Авидность АСЛ | Анализ при | | Содержание* АСЛ при возбудителе – <i>S. flexneri</i> серовара | | | | | |
|--------------------|-------------|---|---|-----------|-----------|-----------|-----------|---------------------|
| | | | 2а | 1а | 1в | 2в | 3а | 1а,1в,2в,3а в сумме |
| все АСЛ | поступлении | Р | 5,43±0,28 | 5,44±0,39 | 4,91±0,30 | 5,51±0,37 | 4,27±0,34 | 5,23±0,19 |
| | | | - | 1,0>P>0,9 | 0,3>P>0,2 | 0,9>P>0,8 | 0,3>P>0,2 | 0,6>P>0,5 |
| | выписке | Р | 6,67±0,24 | 6,66±0,31 | 6,25±0,26 | 6,78±0,30 | 6,12±0,46 | 6,52±0,21 |
| | | | - | 0,8 | 0,4>P>0,3 | 0,9>P>0,8 | 0,4>P>0,3 | 0,7>P>0,6 |
| высоко-авидные АСЛ | поступлении | Р | 4,07±0,27 | 4,11±0,32 | 3,50±0,18 | 3,78±0,33 | 3,34±0,31 | 3,86±0,10 |
| | | | - | 1,0>P>0,9 | >0,05 | 0,5>P>0,4 | 0,4>P>0,3 | >>0,05 |
| | выписке | Р | 4,87±0,23 | 4,93±0,28 | 4,36±0,18 | 4,64±0,39 | 4,37±0,30 | 4,60±0,17 |
| | | | - | 0,9>P>0,8 | 0,3>P>0,2 | 0,6>P>0,5 | 0,4>P>0,3 | 0,4>P>0,3 |

Примечания: Р – вероятность нуль-гипотезы при сравнении с показателями для *S. flexneri* серовара 2а

У 41 больного, по данным выявления АСЛ, при отрицательных результатах бакисследования, поставлен диагноз дизентерии Зонне. АСЛ специфичности обоих подвидов Флекснер у них не были выявлены.

Важно изучить, одинакова ли эффективность выявления АСЛ с реагентом, приготовленным из ЛПС *S. flexneri* серовара 2а у больных, у которых возбудителем является *S. flexneri* этого же подвида, но других сероваров. Из 54 больных с диагнозом *S. flexneri* I-V от 21 выделены шигеллы серовара 2а, от 8 – серовара 1а, от 8 – серовара 1в, от 12 – серовара 2в и от 5 – серовара 3а. В таблице 2 приведены результаты выявления АСЛ у больных, дизентерия у которых обусловлена этими вариантами подвида *S. flexneri* I-V. Анализ этих результатов не позволил обнаружить различия в продукции АСЛ в этих группах больных. С учетом липополисахаридной природы антигена, использованного для приготовления иммунореагентов, можно заключить, что специфичность выявляемых АСЛ, выявляемых при помощи иммунореагента из ЛПС *S. flexneri* 2а, одинакова при дизентерии Flexner подвида I-V, независимо от серовара шигелл-возбудителя.

Таким образом, полученные в эксперименте и клинике результаты позволяют заключить, что использованные для выявления АСЛ иммунореагенты характеризуются родовой (*Shigella*), видовой (*S. flexneri* и *S. sonnei*) и подвидовой (*S. flexneri* I-V и *S. flexneri* VI), но не серовар специфичностью внутри подвида *S. flexneri* I-V. Поскольку тест АСЛ с данными иммунореагентами при диагностике дизентерии оказался существенно более чувствительным, чем бактериологический метод, его можно рекомендовать для более эффективной лабораторной диагностики дизентерии.

Выводы

1. При обследовании больных ОКЗ показана таксономическая (по родам Enterobacteriaceae) специфичность использованных иммунореагентов и выявления специфичности лимфоцитов с рецепторами (АСЛ) к ЛПС *S. flexneri* и *S. sonnei*.
2. В эксперименте иммунизации кроликов и при обследовании больных ОКЗ выявлена видовая и по подвидам *S. flexneri* – подвидовая специфичность таких иммунореагентов и обнаружения АСЛ у больных дизентерией.
3. При параллельном иммунологическом, по АСЛ, и бактериологическом обследовании больных обнаружена одинаковая специфичность диагностики дизентерии этими методами по видам и для дизентерии Флекснер – по подвидам возбудителя. Вместе с тем иммунореагенты из ЛПС *Shigella* не обладают специфичностью по сероварам *S. flexneri* I-V.
4. С учетом выявленной ранее более высокой, в сравнении с бактериологическим методом, чувствительностью и показанной таксономической в настоящей работе специфичностью метода АСЛ последний целесообразно применять в диагностике дизентерии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Славко Е.А., Дерябин П.Н., Каральник Б.В. Определение антигенсвязывающих лимфоцитов как метод ранней диагностики сальмонеллеза и дизентерии // Здравоохранение Казахстана.-Алматы.- 1999. - №5-6.- С.43-45.
- 2 Славко Е.А. Диагностическая значимость выявления антигенсвязывающих лимфоцитов бактериальной и тканевой специфичности при острых воспалительных заболеваниях желудочно-кишечного тракта: автореф. ...канд. мед. наук.: 14.00.36. – Алматы, 1999. – 30 с.
- 3 Жунусова Г.Б., Каральник Б.В., Бондарь Н.Р., Еркинбекова Б.К. и др. Методы лабораторной диагностики гонореи по определению антигенсвязывающих лимфоцитов // Вестник дерматол. и венерол.-М.- 2001.- №5.- С.49-51.
- 4 Абишев Т.Ж. Лимфоциты с рецепторами к Candida в диагностике кандидозов: дисс. канд. мед. наук. – Алматы, 2003. – 93 с.
- 5 Кожгельдиева А.А. Изучение эффективности определения антигенсвязывающих лимфоцитов в диагностике и контроле излеченности кишечного иерсиниоза: дисс.канд.мед.наук. Алматы, 2005. – С. 56-67.
- 6 Гариб Ф.Ю., Гурарий Н.И., Афанасьев Ю.И. и др. Клиническая ценность определения антигенсвязывающих клеток у больных брюшным тифом и другими заболеваниями // Метод. рекомендации. – Ташкент, 1983. – 40 с.
- 7 Каральник Б.В., Дерябин П.Н., Денисова Т.Г. и др. Антигенсвязывающие лимфоциты в динамике иммунного ответа на бактериальные, вирусные и аутоантигены // Известия МОН РК и НАН РК. Сер.биол. мед.-Алматы.- 2001.- №5- С.37-43.
- 8 Каральник Б.В., Савченко Е.А., Маркова С.Г., Денисова Т.Г., Дерябина Л.В. Ранняя диагностика дифтерии экспресс-методом // Вестник военной медицины Казахстана. – 1997. -№7. – С. 66-71.
- 9 Дүйсенова А.К., Денисова Т.Г., Каральник Б.В., Курманова Г.М., Мусакулова Г.Т. Сопоставление клинических проявлений и эффективности диагностических тестов при остром бруцеллезе // Ж.гигиены, эпидемиол. и иммунобиол. – 2001.-№3-4. – С. 126-129.

А. М. САДЫКОВА

ДИЗЕНТЕРИЯҒА ЗЕРТТЕУ КЕЗІНДЕ ЛИМФОЦИТ РЕЦЕПТОРЛАРЫМЕН ШИГЕЛЛА АНТИГЕНДЕРІ АНЫҚТАЛУЫНЫҢ АРНАЙЛЫҒЫН БАҒАЛАУ

Түйін: Қояндарды шигеллалармен иммунизациялау тәжірибесінде және жедел ішек инфекциясымен 364 наукасты зерттеу кезінде тұқымдастық ішкі (Enterobacteriaceae ішкі тұқымдастық), түрлік (ішкі Shigella тұқымдастығы) және түршілік (ішкі Shigella flexneri түрі) шигеллалардың ЛПС-ның иммунореагенттерінің арнайлығы көрсетілген. Бұрынғы көрсетілген антигенбайланыстырушы лимфоциттер әдісінің жоғары сезімталдығы бактериологиялық әдіске қарағанда дұрыс мәліметтер береді, сол себептен бұл әдісті дизентерияның диагностикасында қолданған жөн.

Түйінді сөздер: иммунизация, антигенбайланыстырушы лимфоциттер, дизентерия, диагностика.

A.M. SADYKOVA

ESTIMATION SPECIFICITY OF EXPOSITION OF LYMPHOCYTES WITH RECEPTORS FOR SHIGELLA ANTIGEN AT EXAMINING FOR DYSENTERY

Resume: Experiment of immunization of rabbits with Shigella and examining 364 patients with acute intestinal infections showed generic (inside Enterobacteriaceal family), specific (inside Shigella genus) and subspecies (inside Shigella flexneri) specificity of immunoreagents from Shigella LPS intended to expose of lymphocytes with receptors for Shigella – antigen connecting lymphocytes. Taking into account earlier demonstrated higher than at bacteriological method, sensitiveness method of exposition of antigen connecting lymphocytes is expedient for application in dysentery diagnostics.

Keywords: immunization, antigen connecting lymphocytes, dysentery, diagnostics.