

А.Н.Куличенко, Е.Л.Ракитина, Д.Г.Пономаренко, О.В.Логвиненко, А.Г.Рязанова

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕСТА АКТИВАЦИИ БАЗОФИЛОВ С АНТРАКСИНОМ ДЛЯ ЛАБОРАТОРНОЙ (*IN VITRO*) ДИАГНОСТИКИ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ

ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь

Получены данные о перспективе применения теста оценки активации базофилов с учетом результатов на цитометре для диагностики сибирской язвы. Длительность анализа – 1 ч, возможна количественная оценка степени сенсибилизации организма. Методика *in vitro* исключает дополнительную аллергизацию организма. Предлагаемый метод перспективен в качестве экспресс-теста для ранней и ретроспективной лабораторной диагностики сибирской язвы, оценки поствакцинального иммунитета.

Ключевые слова: сибирская язва, антраксин, тест активации базофилов, проточная цитометрия.

A.N.Kulichenko, E.L.Rakitina, D.G.Ponomarenko, O.V.Logvinenko, A.G.Ryazanova

Application of Basophil Activation Test with Anthraxin for Laboratory (*in vitro*) Diagnostics of Anthrax

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol

Demonstrated is the possibility to use *in vitro* basophil activation test with anthraxin, with registration of the results by means of flow cytometry, for anthrax diagnostics. This approach seems promising as it provides quantitative assessment of sensitization of the organism and does not cause its additional allergization. The duration of the analysis is 1h. The test is suggested for application, as an express one, for early and retrospective laboratory diagnostics of anthrax, estimation of post-vaccinal immunity.

Key words: anthrax, anthraxin, cellular antigen stimulation test, flow cytometry.

Для диагностики сибирской язвы во второй половине XX века был разработан и активно применялся иммунологический метод с использованием антраксина, так называемый антраксин-кожный тест (АКТ). Сущность метода заключается в том, что организм больного, переболевшего сибирской язвой или иммунизированного против этой инфекции, отвечает местной аллергической реакцией в виде гиперемии и инфильтрации кожи на месте введения сибиреязвенного аллергена – антраксина. Реакция может проявляться с первых суток после инфицирования, у подавляющего числа наблюдаемых на 5–7-е сутки [3, 4, 5].

Есть данные о высокой эффективности АКТ теста при ранней диагностике сибирской язвы: на третий день заболевания АКТ был положителен у 82 % больных с острой формой сибирской язвы, при этом культуру удалось выделить лишь у 42 % (группа наблюдения 110 чел.) Аллергическая перестройка организма у переболевших сибирской язвой может сохраняться длительное время, имеются данные, что у 72 % из них АКТ остается положительным в течение трех лет; это позволяет использовать метод и для ретроспективной диагностики. Показано, что антибиотикотерапия не влияет на интенсивность реакции с антраксином [3, 8].

По данным Э.Н. Шляхова, у людей, иммунизированных вакциной СТИ-1, положительная кожная реакция на введение антраксина развивалась у 28 % испытуемых на 2–5-й день после вакцинации, затем процент таких лиц повышался до 61, а через год составил 30.

Таким образом, АКТ позволяет проводить раннюю и ретроспективную диагностику сибирской язвы, метод обладает сравнительно высокой диагностической и специфической чувствительностью. К недостаткам АКТ относят риск побочных реакций организма на дополнительную антигенную нагрузку, возможность возникновения ложноположительного результата при патологических иммунных процессах.

В настоящее время ведутся исследования, направленные на замену инвазивного АКТ на более безопасный, с точки зрения возникновения осложнений, метод *in vitro* оценки аллергической перестройки организма [1, 2, 3], однако достойной альтернативы кожно-аллергическому тесту пока не разработано.

На сегодняшний день имеется значительный прогресс в диагностике аллергических состояний путем выявления специфических IgE методом иммуноферментного анализа и тестов оценки активации базофилов специфическими аллергенами с помощью проточной цитометрии.

Особо перспективным представляется тест активации базофилов, сущность которого сводится к тому, что при контакте аллергена с молекулами IgE на специализированных эффекторных клетках – базофилах – происходит каскад ферментных реакций, приводящих к дегрануляции и высвобождению медиаторов из гранул (гепарин, гистамин). Маркером клеточной перестройки базофилов является CD63(gp53). По сути дела, это аналогичный аллергический тест в условиях *in vitro*. Благодаря используемой технологии CAST®(Cellular Antigen Stimulation Test, тест антигенной стимуляции клеток) способ обладает вы-

сокой специфичностью по сравнению с классическими методиками.

В доступной литературе публикации по использованию теста дегрануляции базофилов со специфическими аллергенами применительно к диагностике особо опасных инфекций отсутствуют.

Целью работы являлось изучение возможности применения теста активации базофилов с антраксином в условиях *in vitro* с использованием проточной цитометрии для оценки аллергической перестройки у больных и вакцинированных против сибирской язвы людей.

Материалы и методы

В эксперименте исследовали кровь 15 человек. Из них – 5 больных кожной формой сибирской язвы на 7-е сутки после инфицирования (на 2–4-й день заболевания), 5 – иммунизированные по эпидпоказаниям вакциной *Bacillus anthracis* СТИ-1 на 21-е сутки после вакцинации, 5 – контрольная группа. Экспрессию на базофилах CD63 определяли на проточном цитометре FACSCalibur, используя набор высокоспецифичных моноклональных антител, которые связываются с высокоаффинным IgE рецептором (Flow 2 CAST, Buhlmann laboratories, Швейцария) [7].

Для определения фонового значения, с целью исключения ложноположительного результата, в контрольную пробирку со стабилизированной кровью вносили «буфер для стимуляции» (Flow 2 Cast). В опытную пробирку добавляли антраксин.

Окрашивание базофилов проводили с помощью реагента – смесь моноклональных антител к CD63 человека, конъюгированных с флюоресцеинизотиоцианатом (анти-CD63-FITC), и хемокиновому рецептору CCR, меченному фикоэритрином (анти-CCR3-PE). CCR3 конститутивно экспрессируется на эозинофилах и базофилах. Эритроциты удаляли с помощью лизирующего агента и центрифугирования, после чего лейкоциты ресуспендировали в отмывающем буфере и анализировали на проточном цитометре. При учете результата значение фоновой пробы вычитали из аналогичного показателя при стимуляции антраксином, полученные цифровые данные отражают процент активированных базофилов.

Обеззараживание исследуемого материала от больных сибирской язвой осуществляли согласно санитарно-эпидемиологическим правилам (СП 1.3.1285-03).

Результаты и обсуждение

При постановке теста активации базофилов в крови больных кожной формой сибирской язвы определено от 41 до 79 % активированных антраксином базофилов. У вакцинированных количество детектируемых клеток варьировало от 12 до 26 %. В контрольной группе процент сенсibilизированных базофилов находился на уровне от 1,7 до 6,7 % (рисунок).

При исследовании крови больных сибирской язвой фоновое количество активированных базофилов составило (5,8±1,9) %, после внесения в пробу специфического аллергена выявлено достоверное повышение исследуемых клеток до (60,0±6,1) % (p<0,05).

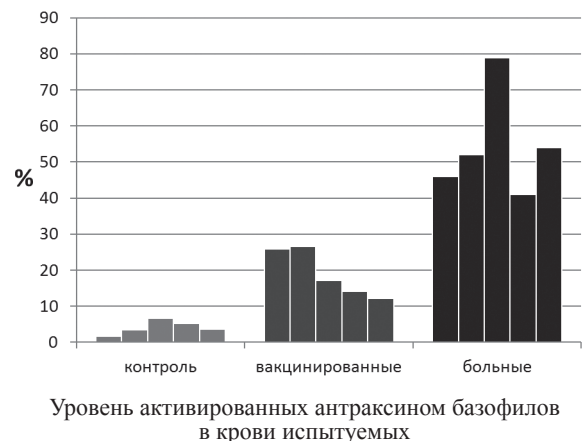
Аналогичная тенденция отмечается у пациентов, иммунизированных вакциной *B. anthracis* СТИ-1. Полученные фоновые значения составили (4,9±0,6) %, при добавлении антраксина в пробу наблюдали увеличение показателя до (24,1±3,3) % (p<0,05).

В контрольной группе пациентов среднестатистическое фоновое количество активированных базофилов составило (4,4±1,4) %, при активации антраксином число исследуемых клеток увеличилось до (8,52±0,75) %.

При проведении исследований выявлено, что в контрольной группе уровень активированных базофилов, экспрессирующих рецепторы к CD63, составил (4,12±0,85) %, что в 5,3 раза ниже, чем у людей, вакцинированных против сибирской язвы – (21,7±3,02) %, и в 13,2 раза, чем у больных кожной формой – (54,4±6,5) %. В группе переболевших сибирской язвой имело место достоверное увеличение количества активированных антраксином базофилов более чем в два раза, по сравнению с вакцинированными.

Полученные результаты указывают на перспективу применения аллергического теста *in vitro* для диагностики сибирской язвы. Учет результатов проводят через 1 ч от начала исследования, при этом возможна количественная оценка степени сенсibilизации организма. Предложенная методика исключает добавочное антигенное воздействие на организм, что предупреждает возникновение осложнений и дополнительной аллергизации организма и может быть использована как экспресс-тест при диагностике сибирской язвы.

В связи с тем, что базофилы являются активными эффекторными клетками в развитии реакций гиперчувствительности немедленного типа и вызывают на своей поверхности специфические IgE к различным аллергенам, с которыми человек контактирует в течение жизни, могут возникать ложноположительные результаты реакции. Для объективной



интерпретации полученных результатов необходимо определение индивидуальных фоновых значений количества базофилов неспецифически активированных стимулирующим буфером. Также необходимо проведение исследований по динамике изменения изученного показателя в поствакцинальный период.

Таким образом, показана принципиальная возможность и перспектива использования теста активации базофилов для лабораторной диагностики сибирской язвы и оценки поствакцинального иммунитета.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бакулов И.А., Гаврилов В.А., Селиверстов В.В. Сибирская язва новые страницы в изучении «старой» болезни. Владимир: Посад; 2001. 278 с.
2. Новиков Д.К., Сергеев Ю.В., Новиков П.Д. Лекарственная аллергия. М: Национальная академия микологии; 2001. 330 с.
3. Онищенко Г.Г., Васильев Н.Т., Литусов Н.В., Харченко А.Т., Васильев П.Г., Садовой И.В., Кожухов В.В. Сибирская язва: актуальные аспекты микробиологии, эпидемиологии, клини- ки, диагностики, лечения и профилактики. М: ВУНМЦ МЗ РФ; 1999. 448 с.
4. Онищенко Г.Г., Кожухова В.В. Сибирская язва. М: Медицина; 2010. 424 с.
5. Шляхов Э.Н. Сибирская язва. Биологические и имму- нологические основы диагностики и защиты. Сообщение 4. Динамика и интенсивность кожных проб с антраксином у мор- ских свинок, инокулированных вакциной СТИ. Журн. гигиены, эпидемиол., микробиол. и иммунол. 1970; 3:364–8.
6. Шуковская Т.И., Фирстова В.В., Кравцов А.Л., Клюева С.Н., Попов Ю.А., Микшиш Н.И. Оценка приобретенного имму- нитета против сибирской язвы по степени повреждения лейкоци- тов крови *in vitro* антраксином. Пробл. особо опасных инф. 2007;

1(93):81–4.

7. De Weck A.L., Sanz M.L. Flow cytometric cellular allergen stimulation test. Technical and clinical evaluation of a new diag- nostic test in allergy and pseudo-allergy. ACI International. 2002; 4(5):204–15.

8. Shlyakhov E. Anthraxin- α skin test for early and retrospective diagnosis of anthrax and anthrax vaccination assessment. Salisbury Med Bull Suppl. 1996; 87:109–10.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Bakulov I.A., Gavrilov V.A., Seliverstov V.V. [Anthrax. New pages in histories of old disease]. Vladimir; 2001. 278 p.
2. Novikov D.K., Sergeev Yu.V., Novikov P.D. [Drug allergy]. M: 2001. 330 p.
3. Onishchenko G.G., Vasil'ev N.T., Litusov N.V., Kharchenko A.T., Vasil'ev P.G., Sadovoi I.V., Kozhukhova V.V. [Anthrax: actual aspects of micro- biology, epidemiology, clinic, diagnostics and prophylaxis]. M.; 1999. 448 p.
4. Onishchenko G.G., Kozhukhov V.V. [Anthrax]. M.; 2010. 424 p.
5. Shlyakhov E.N. [Anthrax. Biological and immunological principles of diagnostics and prevention. 4. The dynamics and intensity of skin tests with anthraxin in guinea pigs inoculated with a STI vaccine]. Zh. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. 1970; 3:364–8.
6. Shchukovskaya T.I., Firstova V.V., Kravtsov A.L., Klyueva S.N., Popov Yu.A., Mikshis N.I. [Estimation of the acquired immunity against an- thrax according to the extent of blood leucocytes damage *in vitro* caused by anthraxin]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2007; (93):81–4.

Authors:

Kulichenko A.N., Rakitina E.L., Ponomarenko D.G., Logvinenko O.V., Ryzanova A.G. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russia. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Об авторах:

Куличенко А.Н., Ракитина Е.Л., Пономаренко Д.Г., Логвиненко О.В., Рязанова А.Г. Ставропольский научно-исследовательский проти- вочумный институт. 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Поступила 22.11.11.