

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН
ФИЛИАЛ «НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ГИГИЕНЫ И ЭПИДЕМИОЛОГИИ ИМЕНИ
ХАМЗЫ ЖУМАТОВА» РГП НА ПХВ «НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР
ОБЩЕСТВЕННОГО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ» МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Б.В.Каральник, Т.Г.Денисова, Г.Б.Жунусова

**МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ КЛЕТОК, СВЯЗЫВАЮЩИХ АНТИГЕН, В
ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ БРУЦЕЛЛЕЗА**

(Методические рекомендации)

Алматы, 2023

УДК 616:612.017.1;616-036.22;612.017.1:616.9

ББК 44.146

М54

Рецензенты: Курманова Г.М. - доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой клинических дисциплин КазНУ имени Аль-Фараби; Утегенова Э.С.- кандидат медицинских наук, заместитель директора филиала «НПЦСЭЭиМ» по лабораторно - диагностической службе

Разработчики: Каральник Б.В., доктор медицинских наук, профессор, Денисова Т.Г., кандидат медицинских наук, Жунусова Г.Б., кандидат медицинских наук

Метод выявления клеток, связывающих антиген, в лабораторной диагностике бруцеллеза: Методические рекомендации / Каральник Б.В., Денисова Т.Г., Жунусова Г. Б. //Алматы: Филиал «Научный центр гигиены и эпидемиологии имени Хамзы Жуматова» РГП на ПХВ «Национальный центр общественного здравоохранения», 2023-24 с.

ISBN 978-601-305-560-2

В методических рекомендациях обоснована целесообразность использования метода лабораторной диагностики бруцеллеза по выявлению клеток, связывающих антиген (КСА), описана методика выполнения этого теста. Применение метода выявления КСА позволит получить более точные данные о распространенности бруцеллеза, повысит возможность ранней диагностики для своевременного обоснованного этиотропного лечения, уменьшит число случаев необоснованного лечения при ложноположительных результатах некоторых обычно применяемых серологических тестов.

Утверждено и разрешено к изданию типографским способом РГП на ПХВ «Национальный научный центр развития здравоохранения имени Салидат Каирбековой» Министерства здравоохранения Республики Казахстан (протокол заседания Департамента развития науки и образования РГП на ПХВ ННЦРЗ им. Салидат Каирбековой) № 421 от «27» декабря 2023 года.

СОДЕРЖАНИЕ

	Перечень сокращений и условных обозначений	3
	Введение	5
1	Проблемы диагностики бруцеллезной инфекции	6
2	Характеристика двух бруцеллезных иммунореагентов	8
2.1	Таксономическая специфичность двух бруцеллезных реагентов	8
2.2	Чувствительность бруцеллезных иммунореагентов на основе различных сорбентов	9
3	Хронометраж подсчета КСА в препаратах при использовании эритроцитарного и латексного бруцеллезных иммунореагентов	11
4	Сравнение различных диагностических иммунологических методов выявления бруцеллеза	13
5	Методика выполнения теста определения КСА с «Набором реагентов для диагностики бруцеллеза по определению клеток с рецепторами к антигенам <i>Brucella melitensis</i> » и с «Набор реагентов для диагностики бруцеллеза по определению клеток с рецепторами к антигенам <i>Brucella abortus</i> »	14
5.1	Для проведения теста КСА необходимы	14
5.2	Сбор, хранение и доставка материала	15
5.3	Выполнение анализа (с каждым латексным иммунореагентом отдельно)	16
5.4	Учет и оценка результатов	16
6	Заключение	17
7	Список использованных источников	19
8	Приложения	23
8а	Приложение 1	23
8б	Приложение 2	24

Перечень сокращений и условных обозначений

БЛПР – биологически ложноположительные результаты

ИФА - иммуноферментный анализ

КСА - клетки, связывающие антиген (ранее в публикациях АСЛ)

ЛПС - липополисахарид

ПЦР - полимеразную цепную реакцию

РБП - Роз-бенгал проба

РПГА - реакция пассивной гемагглютинации

РСК/РДСК - реакция связывания комплемента/ реакция длительного связывания комплемента

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

IgA – иммуноглобулин А

IgG – иммуноглобулин G

IgM – иммуноглобулин М

Введение

В настоящее время известно более 100 зоонозных инфекций, актуальность которых обусловлена их широким повсеместным распространением в регионах с животноводческой ориентацией хозяйства, несовершенством противоэпидемических и противоэпизоотических мероприятий, постоянным супер- и реинфицированием в очагах инфекции, трудностями лабораторной и клинической диагностики, высоким потенциалом хронизации и инвалидизации населения, обусловленной несвоевременным выявлением инфекции, неадекватным лечением и отсутствием реабилитации больных и переболевших [1,2,3].

Одним из наиболее опасных и социально значимых зоонозов, вносящих весомый вклад в инвалидизацию населения, является бруцеллез. В Республике Казахстан ситуация по бруцеллезу, несмотря на проводимые профилактические и противоэпидемические мероприятия, остаётся актуальной медико-социальной проблемой, особенно в сельской местности. Это обусловлено животноводческой специализацией сельского хозяйства большинства областей страны и, в первую очередь южных и юго-восточных регионов, где регистрируется около половины всех первичных случаев заболевания бруцеллезом среди населения республики. Образованию и укоренению антропоургических очагов данной инфекции способствуют скотопроектные трассы, проходящие по территории данных областей [2].

Возбудитель бруцеллеза относится ко второй группе патогенности, пути и факторы передачи инфекции разнообразны.

По данным ряда авторов [3, 4, 5, 6], большинство случаев заболевания остается нераспознанными в связи с трудностями дифференциальной диагностики со сходными заболеваниями из-за многообразия клинических проявлений бруцеллеза, трудностями ранней диагностики из-за, как правило, позднего обращения к врачу, получения ложноотрицательных результатов серологических реакций у значительного числа больных в хронической стадии болезни, приводящей людей к инвалидизации, получения ложноположительных результатов из-за наличия общих с бруцеллами антигенов ряда других бактерий. Ранняя постановка надежного этиологического диагноза любого инфекционного заболевания, являясь условием своевременного, обоснованного и эффективного этиотропного лечения, должна способствовать снижению летальности и потери трудоспособности.

1. Проблемы диагностики бруцеллезной инфекции

Для этиологической диагностики бруцеллеза разработаны различные методы: бактериологические, серологические тесты - реакцию связывания комплемента (РСК/РДСК), реакции Райта и Хаддлсона, Роз-бенгал пробу (РБП), реакцию пассивной гемагглютинации (РПГА), иммуноферментный анализ –ELISA(ИФА), полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и более редко - другие тесты.

Наиболее часто у людей применяют методы серологической диагностики: выявление антител по реакциям агглютинации Райта (объемный вариант) и Хаддлсона (пластинчатый вариант), реакция пассивной гемагглютинации (РПГА), иммуноферментный анализ (ИФА). Различные серологические реакции по своей диагностической эффективности в различные периоды заболевания неравноценны, вследствие чего не всегда могут заменить друг друга. Так, антитела в реакциях агглютинационного типа чаще и в высоких титрах выявлялись у больных острым бруцеллезом, их содержание снижалось в подострой стадии, у больных хроническим бруцеллезом определялись реже и в более низких титрах [3]. ИФА в сравнении с перечисленными серологическими тестами имеет ряд преимуществ, основными из которых являются возможность выявления специфических антител классов М, А, G, возможность автоматизированного учета. Каждая из перечисленных реакций имеет свои преимущества, общим ограничением является отсутствие у некоторых больных бруцеллезом антител, что связано с формированием при бруцеллезе вторичного иммунодефицитного состояния, которое характеризуется снижением абсолютного количества иммунокомпетентных клеток и их функциональной несостоятельностью[3, 4].

Отрицательные результаты серологических реакций не исключают диагноз бруцеллеза и не являются критериями отсутствия его активности.

Бактериологические тесты, даже в современных вариантах, характеризуются относительной длительностью, поэтому их результаты не могут служить основой для раннего назначения этиоспецифического лечения.

Таким образом, для выявления бруцеллеза у людей необходима надежная и ранняя диагностика заболевания. В настоящее время из большого арсенала методов лабораторной диагностики бруцеллеза этим требованиям удовлетворяет разработанный в Казахстане метод выявления лимфоцитов связывающих антиген (АСЛ) [7, 8, 9, 10]. Позднее было показано, что в суспензии клеток человека, выделенных на градиенте плотности

фиколл/верографин 1.077, кроме лимфоцитов, были обнаружены и другие иммуноциты. Поэтому обозначение таких клеток было изменено на – клетки, связывающие антиген (КСА) [11, 12]. Сопоставление клинических и серологических данных с результатами определения КСА бруцеллезной специфичности при остром бруцеллезе показало, что регистрация первого антигенспецифического этапа иммунного ответа посредством определения КСА имеет ряд преимуществ перед серологическими и бактериологическими тестами: более высокая специфичность, высокая чувствительность и значительное укорочение сроков получения результата в сравнении с бактериологическим тестом [13, 14].

До сегодняшнего дня большой проблемой является диагностика и лечение инфекционных заболеваний у беременных, у которых чаще, чем у небеременных и мужчин, наблюдаются ложноположительные результаты серологических реакций в связи с развитием антифосфолипидного синдрома. Нужно отметить, что впервые такую ситуацию обнаружили при сифилисе. Тогда же был использован термин биологически ложноположительные результаты серологических тестов (БЛПР) [15, 16]. Применение метода КСА у беременных с положительными результатами серологических методов выявления антител бруцеллезной специфичности может позволить решить проблему диагностики бруцеллеза у беременных – то есть нужен отказ от назначения лечения беременных только по данным положительных серологических результатов определения антител, особенно в тестах агглютинации [17, 18, 19, 20, 21].

Поскольку иммунореагент, разработанный на основе бычьих эритроцитов в качестве корпускулярного сорбента, из-за антигенных перекрестов с клетками людей, может давать ложноположительные результаты определения КСА [22]. Поэтому для исключения результатов неспецифического связывания бычьих эритроцитов с клетками, имеющими рецепторы к бычьим эритроцитам, при постановке теста КСА ранее параллельно выполняли тест с контрольным реагентом - такими же эритроцитами, не нагруженными антигеном, что усложняло лабораторную диагностику бруцеллеза методом выявления КСА [22]. Для улучшения специфичности определения и упрощения метода выявления КСА разработан диагностический препарат на инертном носителе. В качестве такого использован активированный латекс в виде корпускул (*beads*) размером 2 мкм. Бруцеллезный реагент на таком носителе обеспечивает лучшую специфичность, чувствительность, простоту выполнения теста КСА и сокращение времени подсчета результатов (таблица 3).

2. Характеристика двух бруцеллезных иммунореагентов

2.1. Таксономическая специфичность двух бруцеллезных реагентов.

В таблице 1 показаны результаты определения специфичности при использовании бруцеллезных иммунореагентов, приготовленных из антигенов *B. melitensis* и *B. abortus* на разных сорбентах – латекса и эритроцитов при обследовании 13 больных бруцеллезом, диагноз у которых подтвержден обнаружением КСА.

Таблица 1 – Перекрестные взаимоотношения бруцеллезных ЛПС на этапе выявления лимфоцитов с рецепторами к ЛПС у больных бруцеллезом с эритроцитарным (Э) и латексным (Л) сорбентами

Пациент	Сор- бент	Содержание *КСА специфичности		P	Возбудитель (по результатам определения КСА)
		<i>B. melitensis</i>	<i>B. abortus</i>		
СНА	Э	3.6±0.2	0.7±0.2	<<0.001	<i>B.melitensis</i>
	Л	4.4±0.2	0.6±0.2	0.02>P>0.01	<i>B.melitensis</i>
УЖК	Э	4.3±0.2	1.4±0.5	<<0.01	<i>B.melitensis</i>
	Л	4.7±0.2	0.4±0.2**	<<0.001	<i>B.melitensis</i>
НАК	Э	4.1±0.3	0.3±0.2**	0.01>P>0.001	<i>B.melitensis</i>
	Л	5.1±0.3	0**	<<0.01	<i>B.melitensis</i>
ПЗР	Э	6.6±0.3	0.4±0.2**	<<0.001	<i>B.melitensis</i>
	Л	7.7±0.3	0**	<<0.01	<i>B.melitensis</i>
ЖДС	Э	6.4±0.2	0.4±0.2**	<<0.001	<i>B.melitensis</i>
	Л	7.74±0.2	0**	<<0.01	<i>B.melitensis</i>
Б	Э	3.9±0.3	0.1±0.1**	<<0.001	<i>B.melitensis</i>
	Л	5.0±0.2	0**	<<0.01	<i>B.melitensis</i>
ССЗ	Э	5.7±0.3	3.3±0.3	<<0.001	<i>B.melitensis</i>
	Л	6.4±0.3	0**	<<0.01	<i>B.melitensis</i>
АР	Э	5.4±0.4	0.1±0.1**	<<0.01	<i>B.melitensis</i>
	Л	6.1±0.3	0**	<0.01	<i>B.melitensis</i>
ЕС	Э	4.7±0.3	0.3±0.2**	<0.01	<i>B.melitensis</i>

	<i>Л</i>	5.4±0.2	0**	<<0.001	<i>B.melitensis</i>
КУЛ	Э	3.6±0.2	0.9±0.1	<<0.001	<i>B.melitensis</i>
	<i>Л</i>	3.9±0.1	0.6±0.2	<<0.001	<i>B.melitensis</i>
ССС	Э	0.3±0.2***	2.7±0.3	<<0.001	<i>B.abortus</i>
	<i>Л</i>	0***	3.43±0.3	<<0.01	<i>B.abortus</i>
ЕРР	Э	0.1±0.1***	5.7±0.2	<<0.001	<i>B.abortus</i>
	<i>Л</i>	0***	7.1±0.3	<<0.01	<i>B.abortus</i>
И	Э	0.1±0.1***	2.3±0.2	<<0.001	<i>B.abortus</i>
	<i>Л</i>	0***	5.3±0.3	<<0.01	<i>B.abortus</i>
Примечания: 1*- относительное, % содержание КСА и его средняя квадратическая ошибка; 2 ** - КСА, специфичные для <i>B.abortus</i> , не выявлены; 3 *** - КСА, специфичные для <i>B.melitensis</i> , не выявлены. 4 P – вероятность нуль-гипотезы при сравнении при КСА специфичности <i>B.melitensis</i> и <i>B.abortus</i>					

Видно, что, у некоторых больных при использовании как эритроцитарного, так и латексного иммунореагентов обнаружены КСА специфичности двух основных видов бруцелл. Однако, по достоверному превышению содержания КСА специфичности одного из видов можно четко определить вид бруцелл-возбудителя. Это демонстрирует внутриродовую специфичность определения КСА бруцеллезной специфичности при помощи иммунореагентов на основе обоих сорбентов.

В отличие от эритроцитарных диагностических прототипов латексные иммунореагенты не связывались клетками человека, что позволило отказаться от выполнения параллельного теста с контрольным иммунореагентом и, соответственно, упростить определение КСА.

2.2. Чувствительность бруцеллезных иммунореагентов на основе различных сорбентов

В экспериментах и при обследовании больных людей показана более высокая чувствительность латексных в сравнении с эритроцитарными иммунореагентами.

Сопоставление чувствительности бруцеллезных иммунореагентов на основе двух различных сорбентов (эритроцитарных и латексных) выполнено в эксперименте на иммунизированных кроликах. Как видно из приведенных в таблице 2 данных, чувствительность иммунореагентов, приготовленных на основе двух сорбентов, практически одинакова при определении КСА

специфичности как *B.melitensis*, так и *B.abortus*. Результаты, полученные при лабораторном обследовании больных бруцеллезом, подтвердили эти данные. Более того, при обследовании некоторых больных чувствительность латексных иммунореагентов оказалась даже более высокой.

Таблица 2 - Сравнение чувствительности бруцеллезных иммунореагентов на основе эритроцитарного и латексного сорбентов для выявления КСА у иммунизированных кроликов

Иммуноген и иммунореагент	Кролик, №	Выявление КСА ($\bar{x} \pm Sx$) при тестировании с иммунореагентом на основе сорбента		P*
		эритроцитарного	латексного	
<i>Brucella Melitensis</i>	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	-
	Σ 5,6	14.2±0.2	14.9±0.2	0.1>P>0.2
<i>Brucella Abortus</i>	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	
	Σ 7,8	13.4±0.3	13.7±0.1	>>0.05
Примечания: 1($\bar{x} \pm Sx$) - средняя и ее средняя квадратическая ошибка, %%; 2*- вероятность нуль-гипотезы при сравнении содержания АСЛ, выявленного двумя иммунореагентами; 3**- вероятность нуль-гипотезы при сравнении содержания АСЛ, выявленного у двух кроликов				

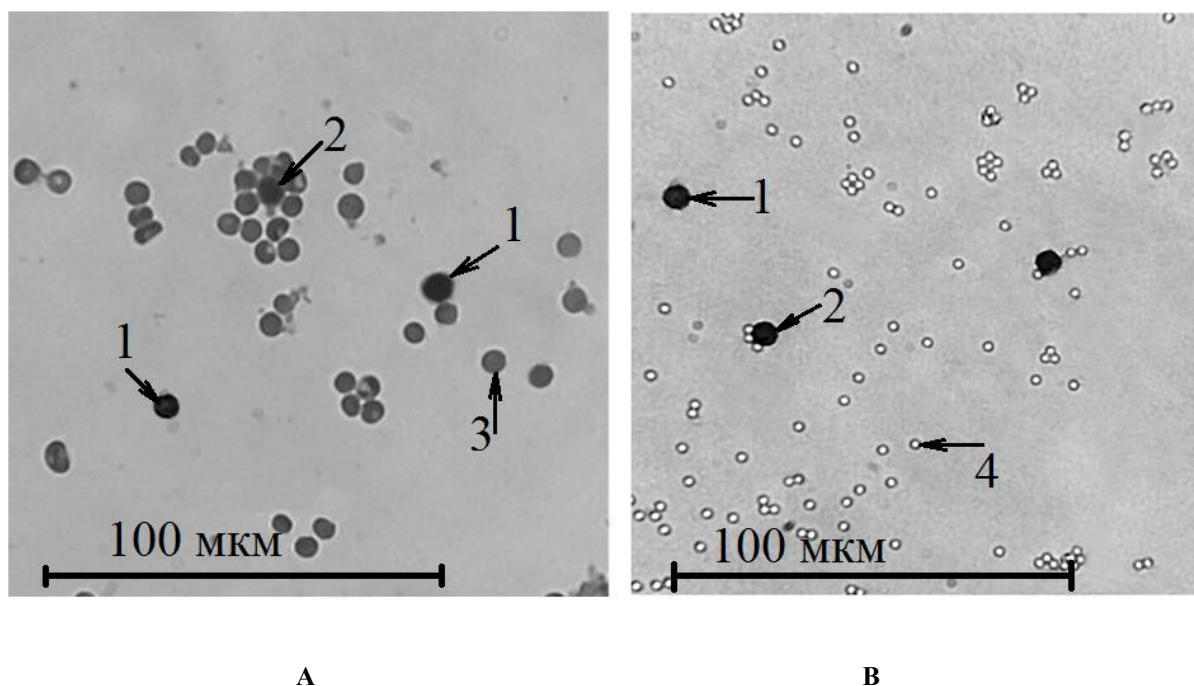
3. Хронометраж подсчета КСА в препаратах при использовании эритроцитарного и латексного бруцеллезных иммунореагентов

При определении времени, затраченного на подсчет клеток, связавших бруцеллезный антиген, у 20 больных с подозрением на бруцеллез показано суммарное, в 1.4 раза уменьшение времени подсчета КСА при использовании латексных бруцеллезных иммунореагентов в сравнении с эритроцитарными (таблица 3).

Таблица 3 - Хронометраж подсчета результатов теста выявления КСА у 20 больных с подозрением на бруцеллез

Показатели	Подтверждение диагноза по тесту КСА		
	КСА (+)	КСА (-)	P ₂
Количество пациентов	5	15	
Среднее содержание КСА($\bar{x}\pm S_x$) % при сорбенте:	4.11 \pm 0.21	0	
Синтетическом	5.05 \pm 0.31	0	
P ₁	0.05>P>0.02	-	
Средняя длительность подсчета результата ($\bar{x}\pm S_x$), % сек при сорбенте: эритроцитарном	1210 \pm 76	881 \pm 8	<<0.001
Синтетическом	875 \pm 3	871 \pm 7	0.8>P>0.7
P1 P1	0.01>P>0.001	0.4>P>0.3	
Средняя кратность сокращения затрат времени на подсчет результата при замене сорбента на синтетический	1.4 \pm 0.1	1.012 \pm 0.006	<<0.001
Затрата времени ($\bar{x}\pm S_x$), сек на выявление одного ЛфР при сорбенте:	42.2 \pm 1.4	-	-
Эритроцитарном			
синтетическом	25.1 \pm 1.9	-	-
P ₁	<<0.001		
Примечания: 1 ($\bar{x}\pm S_x$) - средняя и ее средняя квадратическая ошибка; 2 P ₁ - вероятность нуль-гипотезы при сравнении показателей при различных сорбентах; 3 P ₂ - вероятность нуль-гипотезы при сравнении показателей при выявлении и отсутствии КСА			

Фотографии мазков на которых подсчитаны КСА с каждым из двух бруцеллезных иммунореагентов демонстрируют облегченность, в зависимости от использованного иммунореагента – эритроцитарного или латексного насколько легче подсчет КСА при использовании латексного препарата (рисунок).



1- иммуноцит (8 мкм), не связавший >2 корпускул иммунореагента; 2 – иммуноцит (8 мкм), связавший >2 корпускул иммунореагента КСА); 3 – эритроцитарный иммунореагент (4 мкм); 4 – синтетический иммунореагент (2 мкм).

Рисунок – Обнаружение КСА при использовании реагентов на основе эритроцитарного (А) и синтетического (В) сорбентов

Таким образом, разработанные латексные иммунореагенты характеризуются большей специфичностью не меньшей или даже большей чувствительностью, чем эритроцитарные реагенты. Латексный сорбент в отличие от эритроцитов не связывался иммуноцитами человека и животных, что является основанием для отказа от контрольного исследования с ненагруженным антигеном при постановке теста на определение КСА.

4. Сравнение эффективности различных диагностических иммунологических методов выявления бруцеллеза

Обследовали 100 больных, у которых при поступлении в стационар диагноз бруцеллеза не мог быть исключен. Параллельно использовали следующие иммунодиагностические методы: Хаддлсона, Райта, РПГА; ИФА с тремя тест-системами– IgM, IgG, IgA; КСА с разработанным латексным иммунореагентом. Полученные результаты приведены в таблице 4.

С целью ранжирования примененных методов по частоте положительного результата в группе обследованных стационарных больных статистически (по точному методу Фишера) сравнили частоты результата каждого метода с результатами остальных методов. Частота положительного результата методов КСА с латексным иммунореагентом и ИФА-IgG оказалась практически одинаковой ($P=0.121$). Эти методы разделили 1 и 2 места по чувствительности, так как каждый из них оказался чувствительнее любого другого из примененных методов.

Таблица 4 - Чувствительность методов иммунологической диагностики бруцеллеза

	Частота положительного результата метода						
	Хаддлсона	Райта	РПГА	ИФА на антитела			КСА с латексным реагентом
				IgM	IgG	IgA	
abc	21/100	8/100	15/100	0/100	30/100	18/100	30/100
$\bar{X} \pm S, \%$	21.0 \pm 4.1	8.0 \pm 2.7	15.0 \pm 3.6	0	30.0 \pm 4.6	18.0 \pm 3.8	30.0 \pm 4.6
P	0.045	4.48 \cdot 10 ⁻⁵	0.005	7.17 \cdot 10 ⁻¹¹	1.000	0.019	
Примечание - P – вероятность нуль-гипотезы при сравнении с тестом КСА							

Метод КСА чувствительнее метода Хаддлсона в 1.4 раза ($P=0.045$), метода Райта – в 3.8 раза ($P=4.48 \cdot 10^{-5}$), РПГА – в 2.0 раза ($P=0.005$), ИФА-IgA – в 1.7 раза ($P=0.019$); IgM антитела не были выявлены, Метод ИФА-IgG также чувствительнее метода Хаддлсона 1.4 раза ($P=0.045$), метода Райта - в 3.8 раза ($P= 4.48 \cdot 10^{-5}$), РПГА – в 2.0 раза ($P=0.005$), ИФА-IgA – в 1.7 раза ($P=0.019$), ИФА-IgM – более чем в 30 раз ($P \rightarrow 0$).

Метод Хаддлсона чувствительнее метода Райта в 2.6 раза ($P=0.005$), значимое различие между методами РПГА и Райта не выявлено, хотя имеется тенденция к большей чувствительности РПГА ($P=0.080$), методы Хаддлсона

и ИФА-IgA по чувствительности практически одинаковы ($P=0.123$), чувствительность метода Райта в 2.2 раза меньше, чем ИФА-IgA ($P=0.019$).

Значимое различие чувствительности РПГА и метода ИФА-IgA не обнаружено ($P=0.0129$).

Ранжирование использованных методов по приведенным в таблице 3 данным представлено в таблице 5.

Таблица 5 - Ранжирование иммунодиагностических методов по частоте положительного результата

Метод	Хаддл-сона	Райта	РПГА	ИФА на антитела			КСА с латексным реагентом
				IgM	IgG	IgA	
Частота %	21.0±4.1	8.0±2.7	15.0±3.6	0	30.0±4.6	18.0±3.8	30.0±4.6
Ранг	3-4	6	5	7	1-2	3-4	1-2

При сопоставлении эффективности иммунореагентов на основе двух сорбентов – эритроцитарного и латексного у 14 больных с окончательным диагнозом бруцеллеза оказалось, что у 7 содержание КСА при латексном иммунореагенте было выше, чем при эритроцитарном, и ни у одного больного не выявлена обратная ситуация. Такое преимущество по чувствительности оказалось достоверным ($P=0.003$).

5. Методика выполнения теста КСА с «Набором реагентов для диагностики бруцеллеза по определению клеток с рецепторами к антигенам *Brucella melitensis*» и с «Набором реагентов для диагностики бруцеллеза по определению клеток с рецепторами к антигенам *Brucella abortus*».

5.1. Для проведения теста КСА необходимы:

5.1.1. Аппаратура

- микроскоп бинокулярный, обеспечивающий увеличение x1000, любого производителя;
- центрифуга с горизонтальным ротором, обеспечивающая скорость 1500 об/мин, любого производителя;
- холодильник бытовой (2-8°C);
- автоматический счетчик клеток.

5.1.2. Другое оснащение

- Дозаторы медицинские лабораторные с переменным или фиксированным объёмом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости 100 мкл;
- Пробирки стеклянные на 10 мл и 5 мл;
- Стекла предметные;
- Пастеровские пипетки;
- посуда лабораторная мерная;
- груши и шланги резиновые.

5.1.3. Препараты и реактивы

- Раствор натрия хлорида 0.85 % концентрации (физиологический раствор);
- Спирт 96%;
- «Набор реагентов для диагностики бруцеллеза по определению клеток с рецепторами к антигенам *Brucella melitensis*» в который входят:
 1. Латексный бруцеллезный диагностикум *Brucella melitensis* 4,0 ± 0.2 мл -1 флакон;
 2. Перколл 20 мл – 2 флакона;
 3. Метиленовый синий (МС) 600 мг и натрия карбонат (Na_2CO_3) 300 мг (смесь) – 1 флакон;
 4. Раствор глутарового альдегида 2.5% 2 мл- 1 флакон.
- «Набор реагентов для диагностики бруцеллеза по определению клеток с рецепторами к антигенам *Brucella abortus*» в который входят:
 1. Латексный бруцеллезный диагностикум *Brucella abortus* 4,0 ± 0.2 мл -1 флакон;
 2. Перколл 20 мл – 2 флакона;
 3. Метиленовый синий (МС) 600 мг и натрия карбонат (Na_2CO_3) 300 мг (смесь) – 1 флакон;
 4. Раствор глутарового альдегида 2.5% 2 мл- 1 флакон.

5.2. Сбор, хранение и доставка материала

Взятую кровь желательно немедленно или не позднее, чем через 2 часа использовать для проведения анализа.

5.3. Выполнение анализа (с каждым латексным иммунореагентом отдельно)

Выявление в крови обследуемых людей клеток с рецепторами к бруцеллезным антигенам осуществляют при помощи теста количественной оценки адгезии.

Метод основан на регистрации адгезии латексных бруцеллезных диагностикумов *Brucella melitensis* или *Brucella abortus* на рецепторах КСА при помощи светового микроскопа.

Кровь для исследования берут у людей натошак из локтевой вены в количестве 2 мл в пробирку с гепарином или ЭДТА.

Взятую кровь желательно немедленно или не позднее, чем через 2 часа использовать для проведения анализа.

В стеклянную пробирку наливают 1 мл перколла и наслаивают при помощи пастеровской пипетки 1 мл крови, разведенной физиологическим раствором 1 к 2. Помещают пробирку в центрифугу на 20 мин при 1500 об/мин. Фракцию мононуклеаров из интерфазы переносят в пробирку с 2.5 мл физиологического раствора, отмывают клетки центрифугированием 30 мин при 1500 об/мин. Надосадок аккуратно сливают. К осадку добавляют 100 мкл физиологического раствора и добавляют 100 мкл латексного бруцеллезного диагностикума *Brucella melitensis* или *Brucella abortus*, встряхивают и выдерживают 5 мин при 37°C и 1 час при 4°C. Затем к взвеси добавляют каплю 2.5% раствора глутарового альдегида, смесь немедленно встряхивают и выдерживают 2 мин. Затем взвесь вновь встряхивают и делают мазки на предметном стекле. Мазки высушивают при комнатной температуре, фиксируют 96% этиловым спиртом и после испарения спирта окрашивают раствором метиленового синего в течение 4 мин. Окрашенные мазки высушивают при комнатной температуре.

5.4. Учет и оценка результатов

Учет адгезии производят с помощью светового микроскопа при увеличении ·1000 подсчетом в каждой мазке 4 сотен мононуклеаров порознь. При суммарном содержании КСА в 4 сотнях подсчитанных мононуклеаров не меньше 8 результат на бруцеллез считается положительным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В связи с более высокой трудоемкостью и более высокой стоимостью анализа на выявление КСА выполнение этих анализов проведение тестирования с использованием КСА требует модификации существующей лабораторной схемы обследования на бруцеллез. Модифицированная схема должна быть поэтапной. На первом этапе должны быть выполнены простые и более дешевые тесты определения антител - например при бруцеллезе, тесты Хаддлсона и Райта. При получении положительных результатов даже одного из названных тестов на антитела необходим, особенно у социально значимых групп, второй этап диагностики. На втором этапе целесообразно применение метода определения КСА. В первую очередь такая схема должна быть реализована в группе беременных, у которых намного чаще, чем в других группах, выявляют, как и при сифилисе, биологически ложноположительные результаты определения антител. Пока такая двухэтапная схема при обследовании на бруцеллез беременных не применяется, возникает серьезнейший по социальным последствиям риск – в случае неоправданного проведения лечения беременных, что угрожает как плоду, так и женщине. Чтобы избежать этого, следует опираться на отрицательный результат определения КСА у беременных с положительным результатом одного из серологических тестов на антитела на первом этапе обследования на бруцеллез. Возможно, что подобная схема могла бы оказаться полезной и при других инфекциях, которые могут приобретать хронический характер.

Многие бактерии, особенно *Yersinia enterocolitica* серовара O₉, имеют общие антигены с бруцеллами, что требует дифференциации лабораторных результатов. В этих случаях могут оказаться полезными тесты определения КСА [23, 24, 25].

Обоснованная диагностика при инфекционной и неинфекционной патологии имеет важное значение для принятия правильного решения по лечению любого конкретного больного. Целесообразность применения метода выявления КСА бруцеллезной специфичности обусловлена предварительными данными дифференциации ревматоидного артрита и бруцеллеза.

Как показано выше, применение латексных вместо эритроцитарных иммунореагентов для диагностики бруцеллеза по определению КСА позволяет упростить и ускорить выполнение теста. Это, а также возможность дифференциации бруцеллеза и инфекций, вызванных

некоторыми другими микроорганизмами, тесты КСА с латексными препаратами соответствующих специфичностей тоже могут быть полезны.

Применение разработанного метода диагностики бруцеллеза по выявлению КСА при правильной интерпретации результатов лабораторных анализов позволит обеспечить более объективную оценку распространенности бруцеллеза в целом и территориальные особенности распространения бруцелл разных видов. Чрезвычайно важно, что применение КСА с разработанными препаратами позволит исключить случаи необоснованного лечения бруцеллеза у ряда беременных.

Оба разработанных в Казахстане бруцеллезных диагностических латексных препарата зарегистрированы и разрешены к применению в медицинской практике на территории Республики Казахстан [приложение 1, приложение 2].

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Дуйсенова А.К. Зоонозные инфекции: вчера, сегодня, завтра. – http://journal.ksph.kz/contents/v10n4_2011.pdf
- 2 Сыздыков М.С., Кузнецов А.Н., Абуова Г.М., Бердалиева Ф.А., Садыкова С.С. Оценка эпидемической ситуации по бруцеллезу в Республике Казахстан с использованием географических информационных технологий //Гигиена, эпидемиология және иммунобиология. – 2011. – №4. – С. 69-73.
- 3 Курманова К.Б., Дуйсенова А.К. Бруцеллез. Клинические аспекты // Алматы: ИД «Кітап», 2002. – 352с.
- 4 Дуйсенова А.К., Каральник Б.В. Денисова Т.Г., Курманова Г.М. Диагностическая ценность антигенсвязывающих лимфоцитов бруцеллезной специфичности при хроническом бруцеллезу // Материалы международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию со дня рождения П.М.Поспелова «Актуальные проблемы организации здравоохранения, клинической и экспериментальной медицины». – Караганда, 2003. – С.373-375.
- 5 Кайыргали Ш.М., Бахтиярова Д.А., Кулымбетова Б.А., Садыкбекова Ж.Н. Клинический случай наблюдения пациента с ревматоидным артритом и первично-хроническим бруцеллезом. //Вестник КазНМУ. - №2.- 2018.-С.494-495
- 6 Хайдарова Ю.М., Курманова Г.М., Сейжанова Б.Б., Курманбекова М.Б. Трудности дифференциальной диагностики раннего серонегативного спондилоартрита спондилоартрита в условиях эпидемичной зоны по бруцеллезу //«Современная наука: актуальные проблемы теории и практики». - №11. – 2021.- С.208-214
- 7 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.– Пром. Собственность. Официальный бюллетень. – Алматы, 2004. – №7.
- 8 Каральник Б.В., Денисова Т.Г., Грушина Т.А., Тугамбаев Т.И. Анализ иммунного ответа морских свинок, инфицированных *B.melitensis* //Ж. микробиологии. – 2002.– №2. – С.52-56.

9 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

10 Каральник Б.В., Денисова Т.Г., Жунусова Г.Б., Федосов С.А., Жанкин А.А., Оспанов К.С., Мизанбаева С.У. Эффективность различных реакций определения антител и теста антигенсвязывающих лимфоцитов в диагностике бруцеллеза у людей //Медицинская иммунология. – 2006. – Т.8, №4. – С.74 – 78

11 Перфильева Ю.В., Остапчук Е.О., Денисова Т.Г., Абдола Н., Жунусова Г.Б., Беляев Н.Н., Каральник Б.В. Определение CD маркеров клеток, связывающих антиген в ранней стадии иммунного ответа // Гигиена, эпидемиология и иммунобиология Алматы. - 2017.- №2. - С.22-29

12 Омарова М.Н., Жунусова Г.Б., Денисова Т.Г., Умбетпаева А.Т., Остапчук Е.О., Перфильева Ю.В., Каральник Б.В. Определение фенотипической характеристики клеток, связывающих антиген, выявляемый в раннюю стадию антигенспецифического иммунного ответа, методом люминисцентной микроскопии // Здоровье семьи – 21 век: электронное периодическое издание. – 2017. – №1 – С.121-124. URL [http://fh-1.perm.ru/download/2017%20\(27\).pdf](http://fh-1.perm.ru/download/2017%20(27).pdf)

13 Дуйсенова А.К., Денисова Т.Г., Каральник Б.В., Курманова Г.М., Мусакулова Г.Т. Сопоставление клинических проявлений и эффективности диагностических тестов при остром бруцеллезе //Гигиена, эпидемиология және иммунобиология. – 2001. – №3-4. – С. 126-130.

14 Мамутова А.М., Кадырова Ш.А., Жанкин А.А., Каральник Б.В., Курманова Г.М., Денисова Т.Г. Определение антигенсвязывающих лимфоцитов при остром и подостром бруцеллезе//Гигиена, эпидемиология и иммунобиология. – 2007. – №1. – С.109 – 113

15 Каральник Б.В., Денисова Т.Г., Кешилева З.Б., Пшеничная Л.А. и др. Антигенсвязывающие лимфоциты и антитела в диагностике сифилиса //Инфекции, передающиеся половым путем. – 1999. - №5. - С.34-36

16 Karalnik B.V., Pshenichnaya L.A., Denisova T.G., Utegenova A.K. The pregnancy and syphilis diagnostics by determination of antigenbinding lymphocytes (ABL) of treponemal specificity //Abstr. 11 Congress of the European Academy of Dermatology and Venerology. Prague, Czech Republic. - 2002. P.34-41

17 Пшеничная Л.А., Каральник Б.В., Тимиргалиев С.А., Айманова А.А. Информативность лабораторных тестов в диагностике сифилиса у беременных //Вопр. дерматологии и венерологии. – 2002. - С.4-7

18 Утегенова А.К., Каральник Б.В. Диагностика сифилиса у беременных, рожениц и их новорожденных и контроль излеченности методом выявления антигенсвязывающих лимфоцитов //Гигиена, эпидемиология и иммунобиология. - 2003. - № 2. - С.101-104

19 Denisova T.G., Karalnik B.V., Duysenova A.K., Zhunusova G.B. Characteristic features of immunological diagnosis of brucellosis in pregnant women //Development of International Collaboration in Infections Diseases Research. Intern. Conference. "Sosnovka." Russia. – 2004. - P.89

20 Karalnik B.V., Utegenova A.K., Denisova T.G., Pshenichneya L.A. The early control of the syphilis recovery in pregnant women, mothers and infants // Development of International Collaboration in Infections Diseases Research. Intern. Conference. "Sosnovka." Russia. – 2004. - P.178

21 Каральник Б.В., Асанжанова М.С., Жунусова Г.Б., Денисова Т.Г. Эффективность методов лабораторной диагностики гонореи, сифилиса и уrogenитального хламидиоза у беременных с уrogenитальной и/или акушерской патологией // Медицина. Алматы. - 2005. - №7. - С.51-55

22 Каральник Б.В., Денисова Т.Г., Омарова М.Н., Жунусова Г.Б., Тугамбаев Т.И., Закарян С.Б., Федосов Ю.С. Сравнительная оценка диагностических реагентов на основе синтетического и эритроцитарного сорбентов для определения лимфоцитов с рецепторами к липополисахаридам бруцелл // Eurasian journal of applied biotechnology.- 2016.- №3.-р.36-45

23 Каральник Б.В., Карабеков А.Ж., Денисова Т.Г., Кожгельдиева А.А., Жунусова Г. Дифференциальная диагностика бруцеллеза и кишечного иерсиниоза, вызванного *Y.enterocolitica* серовара О9//Медицина. – 2004. – №4. – С.51-53.

24 Karalnik B.V., Kozhageldieva A.A., Denisova T.G., Zhunusova G.B. The value of antigenic relationships among bacteria in diagnosis of brucellosis and enteric yersiniosis // Development of International Collaboration in Infections Diseases Research. Intern. Conference. "Sosnovka." Russia. – 2004. - P.95

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

Приложение 1

Қазақстан Республикасының
Денсаулық сақтау министрлігі

010000, Қазақстан Республикасы,
Астана қ., Сол жағалау,
Мәңгілік Ел даңғылы, 8
(Министірліктер үйі), 5-кіреберіс
Номер НИКАД: KZ01\BP00021020



Министерство здравоохранения
Республики Казахстан

010000, Республика Казахстан,
г. Астана, Левый берег, пр. Мәңгілік Ел, 8
(Дом Министерств), 5 подъезд

РЕГИСТРАЦИОННОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ РК МИ (in vitro)-0№026225

В соответствии с Кодексом Республики Казахстан «О здоровье народа и системе здравоохранения» настоящее регистрационное удостоверение выдано:

Информация	Наименование
Производитель, страна	Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения "Национальный центр общественного здравоохранения" Министерства здравоохранения Республики Казахстан, Казахстан
Производственная площадка, страна	Филиал "Научный центр гигиены и эпидемиологии имени Хамзы Жуматова" Республиканского государственного предприятия на праве хозяйственного ведения "Национальный центр общественного здравоохранения" Министерства здравоохранения Республики Казахстан, Казахстан
Уполномоченный представитель производителя	Филиал "Научный центр гигиены и эпидемиологии имени Хамзы Жуматова" Республиканского государственного предприятия на праве хозяйственного ведения "Национальный центр общественного здравоохранения" Министерства здравоохранения Республики Казахстан

в том, что **Набор реагентов для диагностики бруцеллеза по определению клеток с рецепторами к антигенам Brucella melitensis**

(наименование медицинского изделия)

Класс 3 – с высокой степенью риска

(класс безопасности в зависимости от потенциального риска применения)

зарегистрирована/о и разрешена/о к применению в медицинской практике на территории Республики Казахстан.

Перечень расходных материалов и комплектующих к медицинскому изделию в приложении к данному регистрационному удостоверению, согласно форме 3 (количество листов 2).

Дата государственной регистрации (перерегистрации): 14.04.2023г., №N062513 решения

Действительно до: Бессрочно

Дата внесения изменений:

Фамилия, имя, отчество (при его наличии) руководителя государственного органа (или уполномоченное

Данный документ согласно пункту 1 статьи 7 ЗРК от 7 января 2003 года «Об электронном документе и электронной цифровой подписи» равнозначен документу на бумажном носителе

Бұл құжат РК 2003 жылдың 7 қаңтарындағы «Электронды құжат және электронды қолтаңба туралы заңның» 7-ші бабы, 1-тармағына сәйкес халғаз бетіндегі заңмен тең. Электрондық құжат www.elicense.kz порталында қарастырылған. Электрондық құжат тұрғысына www.elicense.kz порталында тексеріле аласыз. Данный документ согласно пункту 1 статьи 7 ЗРК от 7 января 2003 года «Об электронном документе и электронной цифровой подписи» равнозначен документу на бумажном носителе. Электронный документ сформирован на портале www.elicense.kz. Проверить подлинность электронного документа вы можете на портале www.elicense.kz.



Приложение 2

Қазақстан Республикасының
Денсаулық сақтау министрлігі

010000, Қазақстан Республикасы,
Астана қ., Сол жағалау,
Мәңгілік Ел даңғылы, 8
(Министрліктер үйі), 5-кіреберіс
Номер НИКАД: KZ69VBP00021057



Министерство здравоохранения
Республики Казахстан

010000, Республика Казахстан,
г. Астана, Левый берег, пр. Мәңгілік Ел, 8
(Дом Министерств), 5 подъезд

РЕГИСТРАЦИОННОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ РК МИ (in vitro)-0№026248

В соответствии с Кодексом Республики Казахстан «О здоровье народа и системе здравоохранения» настоящее регистрационное удостоверение выдано:

Информация	Наименование
Производитель, страна	Филиал "Научный центр гигиены и эпидемиологии имени Хамзы Жуматова" Республиканского государственного предприятия на праве хозяйственного ведения "Национальный центр общественного здравоохранения" Министерства здравоохранения Республики Казахстан, Казахстан
Производственная площадка, страна	Филиал "Научный центр гигиены и эпидемиологии имени Хамзы Жуматова" Республиканского государственного предприятия на праве хозяйственного ведения "Национальный центр общественного здравоохранения" Министерства здравоохранения Республики Казахстан, Казахстан
Уполномоченный представитель производителя	Филиал "Научный центр гигиены и эпидемиологии имени Хамзы Жуматова" Республиканского государственного предприятия на праве хозяйственного ведения "Национальный центр общественного здравоохранения" Министерства здравоохранения Республики Казахстан

в том, что **Набор реагентов для диагностики бруцеллеза по определению клеток с рецепторами к антигенам Brucella abortus**

(наименование медицинского изделия)

Класс 3 – с высокой степенью риска

(класс безопасности в зависимости от потенциального риска применения)

зарегистрирована/о и разрешена/о к применению в медицинской практике на территории Республики Казахстан.

Перечень расходных материалов и комплектующих к медицинскому изделию в приложении к данному регистрационному удостоверению, согласно форме 3 (количество листов 2).

Дата государственной регистрации (перерегистрации): 20.04.2023г., №N062620 решения

Действительно до: Бессрочно

Данный документ согласно пункту 1 статьи 7 ЗРК от 7 января 2003 года «Об электронном документе и электронной цифровой подписи» равнозначен документу на бумажном носителе

Бұл құжат РК-009 заңымен "Электрондық құжат және электрондық қол қою" туралы заңның 8-бабы 1-тармағына сәйкес қағаз бетіндегі заңмен тең. Электрондық құжат www.eicense.kz порталында қаралған. Электрондық құжат түпнұсқасын www.eicense.kz порталында тексеріңіз. Данный документ согласно пункту 1 статьи 7 ЗРК от 7 января 2003 года «Об электронном документе и электронной цифровой подписи» равнозначен документу на бумажном носителе. Электронный документ сформирован на портале www.eicense.kz. Проверить подлинность электронного документа вы можете на портале www.eicense.kz.

