



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **53690** (13) **U**
(51) МПК (2009)
C12N 1/20

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ АНАПЛАЗМОЗНОЇ ІНФЕКЦІЇ ШЛЯХОМ ВИЗНАЧЕННЯ РІВНЯ (ТИТРУ) ПРОТИАНАПЛАЗМОЗНИХ АНТИТІЛ В РЕАКЦІЇ НЕПРЯМОЇ ІМУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦІЇ (РНІФ)

1

2

(21) u201005597

(22) 11.05.2010

(24) 11.10.2010

(46) 11.10.2010, Бюл. № 19, 2010 р.

(72) ПОХИЛ СЕРГІЙ ІВАНОВИЧ, ТИМЧЕНКО ОЛЕНА МИКОЛАЇВНА, ЧИГИРИНСЬКА НІЛА АНАТОЛІЇВНА, КИЛИПКО ЛЮДМИЛА ВІТАЛІЇВНА, СЕМЕРЕНСЬКА ЄВГЕНІЯ ІВАНІВНА, КОСТИРЯ ІРИНА АНАТОЛІЇВНА, КРУГЛОВА ТЕТЯНА АНАТОЛІЇВНА

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ ТА ІМУНОЛОГІЇ ІМ. І.І. МЕЧНИКОВА АМН УКРАЇНИ", ПОХИЛ СЕРГІЙ ІВАНОВИЧ, ТИМ-

ЧЕНКО ОЛЕНА МИКОЛАЇВНА, ЧИГИРИНСЬКА НІЛА АНАТОЛІЇВНА, КИЛИПКО ЛЮДМИЛА ВІТАЛІЇВНА, СЕМЕРЕНСЬКА ЄВГЕНІЯ ІВАНІВНА, КОСТИРЯ ІРИНА АНАТОЛІЇВНА, КРУГЛОВА ТЕТЯНА АНАТОЛІЇВНА

(57) Спосіб діагностики анаплазмозної інфекції шляхом визначення рівня (титру) протианаплазмозних антитіл в реакції непрямой імунофлюоресценції (РНІФ), який відрізняється тим, що як діагностичний препарат анаплазмозного антигену (Анг) при відтворенні РНІФ застосовують повний корпускулярний антиген штаму *Anaplasma marginale* ВІЗВ1.

Корисна модель належить до медицини, а саме до медичної мікробіології, зокрема до способів лабораторної діагностики анаплазмозної інфекції (АІ). Ця корисна модель може бути використана для встановлення етіологічного діагнозу АІ у людей шляхом визначення діагностичнозначимого титру протианаплазмозних антитіл (загальних, імуноглобулінів класів М і G) в сироватці крові, а також для визначення анамnestичного рівня цих антитіл при проведенні ретроспективних епідеміологічних досліджень специфічної імуноструктури населення.

АІ (синоніми: анаплазмоз, гранулоцитарний анаплазмоз людини - ГАЛ) - трансмісивне (передається через укуси іксодових кліщів) інфекційне захворювання людей та ссавців яке визивається облигатними внутрішньоклітинними патогенами - бактеріями роду *Anaplasma* і характеризується розвитком синдрому загальної інфекційної інтоксикації та специфічним враженням переважно білих клітин крові (найчастіше гранулоцитів, макрофагів) і значно рідше - еритроцитів та тромбоцитів [1,2].

За сучасною класифікацією бактерії роду *Anaplasma* належать до типу *Proteobacteria*, класу α (Alpha) *Proteobacteria*, порядку *Rickettsiales*, родини *Anaplasmataceae*. Остання включає роди - *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia*, *Wolbachia* [3]. Рід *Anaplasma* налічує три види: *A. marginale*, *A. platys* та *A. phagocytophilum*. Анаплазми - грамне-

гативні, гетеротипні за формою (від кокоподібної до еліпсоїдної) мікроорганізми, розміром 0,3-0,4мкм в діаметрі (клітини еліпсоїдної форми в довжину можуть досягати 1,2-1,5мкм), не здатні до рухливості, спор не утворюють. Рівень подібності нуклеотидної послідовності гену 16S рРНК між штамми різних видів роду *Anaplasma* складає не нижче 96%. Вміст гуаніну та цитозину в ДНК *Anaplasma* spp. коливається в широких межах: від 43 до 56 mol%.

Види *A. marginale* та *A. platys* є збудниками анаплазмозу великої рогатої худоби (ВРХ) та інших жуйних тварин, вражаючи в якості основних клітин-мішеней еритроцити та моноцити, відповідно [3, 4]. До теперішнього часу роль цих двох видів анаплазм у формуванні патології людини не доведена. Навпаки, вид *A. phagocytophilum* (раніше - *Rickettsia phagocytophila*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagocytophila*, *Anaplasma phagocytophila*, HGE-агент) здатен визивати захворювання як тварин (ВРХ, коней, собак, котів та ін.), так і людей (ГАЛ). При укусі зараженого кліща із його слиною анаплазми потрапляють в організм ссавців (в тому числі й людини), інфікують тропні клітини периферійного кровотоку, ендотелію судин та органів гемопоезу (печінки, селезінки, кісткового мозку, лімфовузлів) і викликають захворювання з неспецифічним клінічним перебігом у формі синдрому гострої інфекційної інтоксикації. [1, 2]. Розвиток

(19) **UA** (11) **53690** (13) **U**

інфекційного процесу супроводжується формуванням специфічного (протианаплазмозного) імунітету в зараженому організмі. Перші протианаплазмозні антитіла вдається виявити на 4-7-му добу після початку прояву захворювання. Впродовж послідовних 2-3-ох тижнів їх рівень стрімко зростає, досягає максимуму на 4-му тижні та зберігається до 6-го тижня, а потім поступово знижується. Після перенесеного захворювання невисокий (анамнестичний) рівень протианаплазмозних антитіл може зберігатись більше року [5-7]. Кількісні і якісні характеристики відповіді гуморальної ланки імунної при АІ оцінюють як за динамікою накопичення загальних протианаплазмозних антитіл, так і - імуноглобулінів (Ig) класів М і G. При умові первинного захворювання людини на ГАЛ, спочатку продукуються IgM (їх максимальний титр виявляється на 5-8-му добу), а після декількох днів відбувається переключення на синтез IgG. Рівень останніх у сироватці крові швидко зростає, значно перевищуючи - IgM для яких характерна швидка зворотна динаміка. Анамнестичні протианаплазмозні антитіла представлені в основному IgG. На основі кількісних і якісних показників формування специфічної імунної відповіді при анаплазмозі розроблено критерії серологічної (імунологічної) діагностики цього захворювання [5, 7].

На теперішній час спорадичні і групові випадки ГАЛ зареєстровані на всіх континентах (за винятком Антарктиди) більш ніж в 50 країнах світу, в тому числі в країнах Європи та в Україні. В США, де налагоджена лабораторна етіологічна діагностика ГАЛ і де з 1997 року введена його обов'язкова реєстрація, рівень захворюваності на ГАЛ складає 24-58 випадків на 100 000 населення в рік. При цьому, рівень летальності при субклінічних і легких формах (на які припадає переважна більшість випадків) перебігу анаплазмозу становить 0,5-1,0%, а при середній важкості і важких формах захворювання досягає 7-10% [1, 2].

Вперше етіологічну верифікацію випадків ГАЛ в Україні здійснено у 2007 році співробітниками лабораторії трансмісивних вірусних інфекцій Львівського НДІ епідеміології та гігієни МОЗ України [8]. При цьому були використані (одноразово імпортовані в Україну) діагностичні препарати для твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA), що містили в якості анаплазмозного антигену клітини *A. phagocytophilum*, виготовлені в National Center for Zoonotic, Vector-borne, and Enteric Disease, CDC (1600 Clifton Rd., Atlanta, GA 30333, USA). Однак, через відсутність загальнодоступних, простих у застосуванні, ефективних і недорогих діагностичних біопрепаратів і до теперішнього часу випадки ГАЛ у людей діагностуються дуже рідко, хоча на території України існують чисельні осередки популяцій кліщів та досить часто реєструються інші трансмісивні кліщові інфекційні захворювання (наприклад, кліщовий бореліоз), природні ареали циркуляції збудників яких співпадають із ареалами циркуляції анаплазм [9].

Сучасні принципи і критерії діагностики ГАЛ ґрунтуються на епідеміологічних, клінічних і лабораторних даних. Останнім відводиться вирішальне значення в етіологічній діагностиці ГАЛ, так як клі-

нічний перебіг цього інфекційного захворювання, як правило, не супроводжується специфічними клінічними проявами. В першу чергу, це стосується випадків із субклінічними та клінічно слабо вираженими формами АІ.

Робоча група по вивченню *Rickettsia*, *Coxiella*, *Anaplasma* (*Ehrlichia*) і *Bartonella* (EVVOG) Європейського товариства з клінічної мікробіології та інфекційних хвороб рекомендувала основні (безсумнівні) та допоміжні (ймовірні) критерії для найбільш широко застосовуваних методів лабораторної діагностики ГАЛ: виявлення з допомогою світлової мікроскопії специфічних інтрацитоплазматичних мікроколоній (морул) збудника в клітинах-мішенях; виділення штамів збудника шляхом вирощування на спеціальних культурах еукаріотичних клітин; індикація специфічних фрагментів геному збудника з використанням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР); виявлення в зразках клінічного матеріалу антигену збудника та (або) визначення рівня (титру) антитіл проти збудника в сироватці крові з допомогою імунологічних (серологічних) методів [10]. Завдяки простоті і уніфікованості технології відтворення, достатньо високого рівня специфічності, чутливості та відтворюваності результатів дослідження в теперішній час найбільш часто для лабораторної діагностики АІ застосовуються імунологічні методи: імуноферментний аналіз (ІФА), твердофазний імуноферментний аналіз (ТІФА), імуноблотинг, реакція тривалого зв'язування компліменту (РТЗК), реакція імуофлюоресценції (РІФ), реакція непрямої імуофлюоресценції (РНІФ) та ін. [2, 6, 10-12]. Використання РНІФ дозволяє діагностувати ГАЛ як на ранній стадії захворювання шляхом виявлення в досліджуваних зразках клінічного матеріалу самого антигену збудника, так і в період розпаду його клінічних проявів та на стадії видужання шляхом визначення рівня специфічних антитіл проти антигенів збудника в сироватці крові. Останній методичний підступ дозволяє здійснювати не лише діагностику ГАЛ, але й проводити епідеміологічні дослідження специфічної імуноструктури населення для встановлення територій поширення анаплазмозу та для оцінки об'єктивного рівня захворюваності цією інфекцією людей [5, 11].

Принцип технології визначення в сироватці крові рівня (титру) протианаплазмозних антитіл методом РНІФ полягає в наступному [7, 13, 14]: препарати із нанесеним і зафіксованим анаплазмозним антигеном (AgAI) оброблюють послідовними розведеннями досліджуваного зразку сироватки (ступінь розведення і кратність кроку в ряду послідовних розведень сироватки визначається завданням дослідження), яка потенційно може містити антитіла проти збудника АІ (АнтAI), що зв'язуються (адсорбуються) із AgAI, виконуючи функцію антитіл першого порядку (Ант1); в послідовному, адсорбовані на AgAI антигени Ант1 виявляються шляхом додаткової обробки препаратів флуоресціюючими антитілами (сироватками або імуноглобулінами) протидивовими проти імуноглобулінів людини, які є антитілами другого порядку (Ант2). Таким чином, на поверхні AgAI утворюється двохаровий комплекс із Ант1 і Ант2, який містить

флуоресціюючий барвник, що дозволяє при проведенні люмінесцентно-мікроскопічного дослідження препаратів його виявляти (візуалізувати), визначаючи при цьому рівень (титр) Анті в досліджуваному зразку сироватки крові. За титр Ант1 досліджуваної сироватки приймається останнє (найбільше) її розведення, яке обумовлює специфічну флуоресценцію анаплазмозного антигену, що оцінюється на три хреста. При визначенні титру АнтАІ методом РНІФ критеріями результатів лабораторних досліджень, що дозволяють встановити діагноз анаплазмозу є: не менш ніж чотирихкратно зростання титру АнтАІ у парних сироватках, відібраних у одного й того ж хворого в гостру фазу захворювання та в період реконвалесценції (із інтервалом в 2-3 тижні); наявність у сироватці протианаплазмозних IgG та/або IgM в титрі не менш ніж 1:128 і 1:64, відповідно, при одноразовому дослідженні сироватки і неможливості проаналізувати рівень АнтАІ в динаміці. При проведенні імунодіagnostичних досліджень ставляться негативні і позитивні контролі в РНІФ із нормальною сироваткою (перевіреною на відсутність АнтАІ) та протианаплазмозною (позитивною) сироваткою яка містить АнтАІ в титрі не нижче 1:128.

Антивидові флуоресціюючі сироватки та імуноглобуліни проти імуноглобулінів людини, які при відтворенні РНІФ виконують функцію Ант2 є універсальними і загальнодоступними імунобіологічними препаратами завдяки налагодженому комерційному їх виробництву та широкому застосуванню в медицині і біології. Навпроти, різні типи АгАІ які слугують основним компонентом при відтворенні РНІФ є дефіцитними і високовартісними діагностичними біологічними препаратами. Крім того, в розвинутих країнах світу (США, Канада, Японія, країни Європи та ін.) як експериментальні зразки таких препаратів, так і комерційні діагностичні тест-системи до складу яких вони входять (в якості окремого продукту або способу його отримання) захищені чинними документами правової охорони як об'єкти інтелектуальної власності, що робить їх недоступними для використання в Україні з метою лабораторної діагностики ГАЛ.

В теперішній час відомо декілька різних типів АгАІ для імунологічної діагностики ГАЛ шляхом визначення титру АнтАІ в сироватці крові.

Аналог 1: пептиди АнкА для детекції А. phagocytophilum [Патент США №6964855 від 15.11.2005 р.]. Для виявлення і визначення кількості антитіл (та їх фрагментів) проти збудника ГАЛ запропоновано використовувати цитоплазматичні білки (АнкА) А. phagocytophilum масою 68 і/або 145kDa які мають анкіринові повтори. Встановлена гетеротипність білків АнкА у штамів А. phagocytophilum ізолюваних у різних географічних регіонах (США і країнах Європи). Спільними ознаками даного аналогу із корисною моделлю яка заявляється є здатність білків АнкА вступати в імунологічну реакцію (зв'язуватись) з АнтАІ, що дозволяє визначати рівень останніх в сироватці крові з метою діагностики ГАЛ. Суттєвими недоліками які заважають досягнути бажаного технічного результату є технологічна складність і висока вартість отримання достатньої кількості білків АнкА з

використанням молекулярно-біологічних технологій (гібридомних або рекомбінантних). Крім того, використання при відтворенні РНІФ в якості АгАІ білків АнкА ускладнює оцінку візуалізованих люмінесцентно-мікроскопічних результатів через відсутність ряду диференційних ознак (морфологічних особливостей мікроколоній і клітин анаплазм) які вдається виявляти за умови використання повного корпускулярного АгАІ (ПКАгАІ).

Аналог 2: нуклеїнова кислота, що кодує головний білок зовнішньої мембрани збудника ГАЛ і пептиди нею кодовані [Патент США №6436399 від 20.08.2002 р.]. Для відтворення імунологічних реакцій з метою діагностики ГАЛ запропоновано використовувати білки групи Р44 (яка містить білки Р44, Р44-2, Р44-12, Р44-15, Р44-18 і Р44-19 із молекулярною масою від 8,5 до 11 kDa) зовнішньої мембрани А. phagocytophilum. Встановлено високий рівень імуноспецифічності білків групи Р44 та сконструйовано олігопептиди (довжиною 14-16 залишків амінокислот) для проведення хімічного (біохімічного) синтезу цих білків. Спільними ознаками даного аналогу із корисною моделлю яка заявляється є здатність білків групи Р44 (в якості антигену) зв'язуватись із специфічними АнтАІ сироватки крові при відтворенні імунологічних реакцій для лабораторної діагностики ГАЛ. Суттєвими недоліками які заважають досягнути бажаного технічного результату є технологічна складність і висока вартість отримання достатньої кількості білків групи Р44 із використанням методів хімічного (біохімічного) синтезу. Крім того, в структурі білків групи Р44 виявлено гіперваріабельні області, що може негативно впливати на ефективність їх використання з метою імунодіagnostики ГАЛ у різних географічних регіонах в яких штам збудника АІ можуть відрізнятися за антигенною структурою. Застосування білків групи Р44 (аналогічно як і білків АнкА) при відтворенні РНІФ ускладнює оцінку її результатів.

Найближчим аналогом (прототипом) корисної моделі, що пропонується є метод вирощування культури бактерій А. phagocytophilum в лінії клітин промієлоцитів HL-60 та виготовлення препаратів антигенів цього виду анаплазм (у формі незаражених та іммобілізованих на твердофазному носії клітин HL-60, що містять інтрацитоплазматичні морули - мікроколонії, скупчення клітин збудника ГАЛ) з метою їх використання для лабораторної діагностики АІ [Патент США № 5955359 від 09.21.1999 р.]. Ознаками прототипу, які збігаються із суттєвими ознаками способу що заявляється, є використання в імунологічних реакціях (ТІФА, РНІФ) для визначення титру АнтАІ в сироватці крові ПКАгАІ - інактивованих клітин А. phagocytophilum. Використання діагностичних тест-систем, до складу яких входять такий АгАІ, забезпечує достатньо високий рівень чутливості (82-100%) та специфічності (83-100%) і помірний рівень відтворюваності (75-95%) результатів досліджень, а також виключає необхідність проведення технологічно складних і високопрацевітких етапів очищення ПКАгАІ штаму А. phagocytophilum від дебрису еукаріотичних клітин на яких анаплазми виду А. phagocytophilum було вирощено [3, 7, 12].

Причинами, що перешкоджають одержанню очікуваного технічного результату з допомогою прототипу є складність і висока вартість вирощування анаплазм виду *A. phagocytophilum* в культурі спеціальної лінії промієлоцитарних клітин HL-60 без використання антибіотиків, що потребує освоєння високотехнологічних та дорогих методів культивування цієї лінії еукаріотичних клітин *in vitro* і може здійснюватись лише у деяких спеціалізованих лабораторіях в умовах із високим рівнем асептики та біобезпеки в цілому. Крім того, у відомих колекціях культур мікроорганізмів України відсутні офіційно зареєстровані (задепоновані) штами *A. phagocytophilum*.

В основу корисної моделі поставлено завдання розробити ефективний спосіб лабораторної діагностики ГАЛ шляхом визначення титру АнтАІ в РНІФ для відтворення якої використовувався б більш доступний тип АгАІ, виготовлення якого було б технологічно більш простим, дешевим та біобезпечним і використання якого б забезпечувало отримання чітких диференційних ознак для оцінки результатів РНІФ.

Поставлене завдання вирішувалось тим, що в способі діагностики ГАЛ шляхом визначення титру АнтАІ в сироватці крові в РНІФ у якості АгАІ, згідно із запропонованою корисною моделлю, використовують ПКАгАІ штамів анаплазм виду *A. marginale*, а не штамів - *A. phagocytophilum*.

Використання діагностичних препаратів ПКАгАІ отриманих із штамів *A. marginale* для імунологічної діагностики ГАЛ в РНІФ обґрунтовано високим рівнем (більше 60%) антигенної спорідненості між *A. marginale* і *A. phagocytophilum* [15].

В Україні та в інших багатьох країнах світу вихідні субстрати для отримання препаратів ПКАгАІ із штамів *A. marginale* є загальнодоступними і не дорогими. Наприклад, комерційне виробництво такого субстрату (у формі біобезпечної - інактивованої, ліофілізованої бактерійної маси штаму *A. marginale* ВІЭВ1) здійснює Всеросійський НДІ експериментальної ветеринарії ім. Я.Р. Коваленко РАСХН (м. Москва; <http://www.viev.ru>), що в свою чергу, дозволяє їх широко використовувати в установах, закладах та організаціях медичного, біологічного та ветеринарного профілю для виконання наукових і практичних завдань.

Із інактивованої ліофілізованої бактерійної маси штаму *A. marginale* ВІЭВ1 нами було виготовлено експериментальні зразки діагностичного препарату ПКАгАІ для імунодіагностики ГАЛ в РНІФ. Специфікація експериментальних зразків препарату ПКАгАІ представлена в таблиці 1.

В експериментах на модельних зразках та зразках клінічного матеріалу проведено лабораторно-клінічне випробування діагностичного препарату ПКАгАІ, що дозволило встановити рівні чутливості, специфічності та відтворюваності результатів досліджень з використанням запропонованого способу визначення титру АнтАІ в РНІФ.

В якості модельних зразків використано 11 типів гомологічних і гетерологічних (по відношенню до ПКАгАІ) діагностичних сироваток та імуноглобулінів (далі означені як Ант) проти видів мікроорганізмів, які є найбільш філогенетичноспоріднені з анаплазмами та Ант проти патогенів інших таксономічних груп, що є збудниками кліщових бактеріальних інфекцій.

Таблиця 1

Специфікація діагностичного препарату ПКАгАІ

Зовнішній вигляд	Прозора, однорідна із незначною опалесценцією рідина, яка після струшування не містить помітних неозброєним оком включень і осаду.
Загальна характеристика	Суспензія ПКАгАІ штаму <i>A. marginale</i> ВІЭВ1 у ФСБ (рН=7,0), яка містить в якості консерванту 0,05% азиду натрію. Концентрація корпускул ПКАгАІ в суспензії становить $(1,7 \pm 0,7) \times 10^6$ /мл.
Метод отримання	ПКАгАІ виготовлено із інактивованої ліофілізованої бактерійної маси штаму <i>A. marginale</i> ВІЭВ1 за технологією, яка включає етапи: очищення корпускул антигену (шляхом різношвидкісного центрифугування і відстоювання), стандартизацію концентрації корпускул, хімічну постінактивацію та стабілізацію, фасування і маркування препарату.
Основні біологічні властивості	ПКАгАІ здатний вступати в імунологічні реакції із АнтАІ, адсорбуючи їх на своїй поверхні, що забезпечує при відтворенні РНІФ отримання чіткої люмінесцентно-мікроскопічної картини для оцінки диференційних характеристик. ПКАгАІ має деякий рівень природної антигенної подібності із корпускулярними антигенами клінічно-значущих видів рикетсій, бартонел, бруцел, францізел, що обумовлює можливість перехресних імунологічних реакцій між ПКАгАІ та сироватками крові (або імунодіагностичними препаратами) із високим рівнем антитіл проти вказаних груп мікроорганізмів.

Модельні зразки гомологічних Ант були представлені: експериментальним зразком протианаплазмозних імуноглобулінів кролячих (протиАнапІgКр), комерційною діагностичною ("позитивною") сироваткою ВРХ проти Анаплазма marginale, зразками сироваток крові клінічно здорових людей, в які дозовано додавали протиАнапІgКр до визначеної кінцевої концентрації останніх. Модельні зраз-

ки гетерологічних Ант склали комерційні і експериментальні препарати "позитивних" контрольних сироваток (Ант) із видовою специфічністю проти: *Rickettsia prowazekii*, *R. sibirica*, *Bartonella henselae*, *B. quintana*, *Brucella abortus*, *Borrelia garinii*, *Francisella tularensis*, *Coxiella burnetii*. При цьому модельні зразки гомологічних і гетерологічних Ант тестувались як у нативному стані, так і в

робочому титрі, який вказано підприємством-виробником цих імунобіологічних препаратів. При випробуванні ПКАгАІ також було тестовано 101 зразок клінічного матеріалу: 21 зразок сироватки крові осіб, укушених кліщем та 80 зразків сироватки клінічного здорових людей - донорів крові. Із кожним модельним зразком та зразком клінічного матеріалу РНІФ ставили в трьох повторях.

В усіх випадках тестування гомологічних Ант (в тому числі, розведених до титру фарбування - найбільшого розведення Ант яке забезпечує фарбування ПКАгАі з яскравістю люмінесценції на три хреста) був зафіксований позитивний результат РНІФ. Із використанням методу специфічної адсорбції (АнтАІ+ПКАнАІ) та подальшим визначенням титру в постадсорбованих модельних препаратах гомологічних Ант була встановлена межа чутливості досліджень способу діагностики АІ шляхом визначення рівня титру АнтАІ в РНІФ із використанням ПКАгАІ, що становить: в модельній системі протиАнапІgКр+ФСБ (0,197±0,039)мг білку/мл, а в модельній системі протиАнапІgКр+сироватка крові людини (0,249±0,067)мг білку/мл. При тестуванні

гетерологічних типів Ант були встановлені такі закономірності. Перехресні позитивні результати РНІФ відмічали у випадках тестування нативних (нерозведених) препаратів комерційних діагностичних сироваток та імуноглобулінів проти R. prowazekii, R. sibirica, B. henselae, B. quintana, B. abortus, B. garinii, F. tularensis. Проте, в усіх випадках тестування гетерологічних Ант в їх робочому розведенні результати РНІФ були негативними. Крім того, в медичній практиці у випадках наявності перехресних реакцій при імунологічній (серологічній) діагностиці інфекційних захворювань, етіологія захворювання визначається за правилом "найвищого титру", тобто, верифікується етіологічний лабораторний діагноз того захворювання проти збудника якого виявлено найвищий діагностично-значимі титри специфічних антитіл.

Узагальнені результати визначення титру АнтАІ в сироватках крові осіб, укушених кліщем, та сироваток клінічно здорових людей (донорів крові) в РНІФ із використанням ПКАгАІ представлено в таблиці 2.

Таблиця 2

Узагальнені результати визначення титрів АнтАІ в сироватці крові осіб, укушених кліщем та сироваток клінічно здорових людей (донорів крові)

Походження зразків	Кількість досліджених зразків	Титр протианаплазмозних антитіл $1 : \ln(\bar{m} \pm \bar{d})$
Сироватка крові осіб, укушених кліщем	21	$1 : (2,96 \pm 0,73)$
Сироватка крові клінічно здорових людей	80	$1 : (1,76 \pm 0,41)$
Всього	101	$1 : (2,3 \pm 0,55)$

Як свідчать дані цієї таблиці, середнє арифметичне значення \bar{m} титру АнтАІ в сироватці крові осіб, укушених кліщем, є достовірно (з рівнем достовірності $p < 0,001$) вищим від аналогічного показника титру АнтАІ в сироватці крові клінічно здорових людей. Переважна більшість зразків досліджених сироваток була отримана від пацієнтів укушених кліщем в перші вісім днів після укусу кліща. Ймовірно тому, лише в одному випадку (пацієнт "П"), що становить близько 5% від загального числа обстежених осіб цієї групи, ретроспективно вдалося підтвердити анаплазмозну етіологію захворювання на підставі встановленої динаміки зростання рівня загальних АнтАІ в чотири рази і

досягнення останніми титру 1:128. В зразках сироваток, отриманих від донорів крові, в одному випадку (1,25%) виявлено АнтАІ в титрі 1:32, а в переважній більшості зразків цієї групи сироваток (98,75%) титр АнтАІ коливався від 0 до 1:8.

Для визначення титрів специфічних - протианаплазмозних IgM і IgG було проведено вибіркове тестування (з урахуванням результатів попереднього дослідження з визначення найвищого титру загальних АнтАІ) в РНІФ із використанням ПКАгАІ 11-ти зразків сироватки крові осіб, укушених кліщем (перша група) та 10-ти зразків сироваток крові донорів (друга група). Результати цих досліджень представлено в таблиці 3.

Таблиця 3

Узагальнені результати визначення титрів протианаплазмозних IgM і IgG в сироватці крові осіб, укушених кліщем, та сироваток клінічно здорових людей (донорів крові)

Походження зразків	Кількість досліджених зразків	Титр протианаплазмозних імуноглобулінів $1 : \ln(\bar{m} \pm \bar{d})$	
		класу М	класу G
Сироватка крові осіб, укушених кліщем	11	$1 : (0,82 \pm 0,55)$	$1 : (2,21 \pm 0,69)$
Сироватка крові клінічно здорових людей - донорів крові	10	$1 : (0,56 \pm 0,28)$	$1 : (1,39 \pm 0,42)$
Всього	21	$1 : (0,69 \pm 0,42)$	$1 : (1,82 \pm 0,56)$

При статистичній обробці даних таблиці 3 не було підтверджено ($p > 0,05$) наявну тенденцію щодо більш високого \bar{m} титру IgM у сироватках крові осіб першої групи, у порівнянні із аналогічним показником титру IgM у сироватках крові людей другої групи. Навпроти, \bar{m} титру протианаплазмозних IgG в сироватках крові осіб, укушених кліщем достовірно ($p < 0,05$) перевищувало значення аналогічного показника титру специфічних IgG в сироватках крові клінічно здорових людей. Найбільш високий титр протианаплазмозних IgG, визначений серед досліджених сироваток першої групи становив 1:64 (в усіх інших випадках він був 1:<32), а серед сироваток другої групи - не перевищував 1:8.

Таким чином, за результатами визначення титру протианаплазмозних IgM і IgG у пацієнтів, укушених кліщем нами не було встановлено діагнозу ГАЛ. Це цілком узгоджується із даними зарубіжних авторів [11, 12, 15], які встановили, що визначення полівалентних (загальних) протианаплазмозних антитіл забезпечує ефективність діагностики анаплазмозу на рівні 82-100%. А рівень чутливості методу етіологічної діагностики ГАЛ шляхом визначення титру специфічних IgM і IgG не перевищує, відповідно, 27-37% і 44%.

В цілому, узагальнені результати лабораторно-клінічного випробування отриманого препарату ПКAgAl для діагностики ГАЛ в РНІФ (таблиця 4) близькі до результатів досліджень зарубіжних авторів [11, 15-17], що були отримані останніми із використанням інших типів AgAl аналогічного призначення. Крім того, застосування отриманого ПКAgAl для визначення титру АнтAl в РНІФ при дослідженні модельних зразків та зразків сироватки крові різного походження дозволяло отримати чіткі диференційні люмінесцентно-мікроскопічні характеристики для візуальної оцінки результатів досліджень: характер люмінесценції (колір і ступінь яскравості), морфологічна типовість корпускул ПКAgAl, подібність візуалізованих картин в декількох полях зору (Фіг. - люмінесцентно-мікроскопічна картина при визначенні титру АнтAl в сироватці крові людей в РНІФ із використанням діагностичного препарату ПКAgAl).

Таким чином, за результатами проведених досліджень розроблено спосіб діагностики Al в людей шляхом виявлення титру АнтAl в сироватці крові в РНІФ, для відтворення якої запропоновано використовувати ПКAgAl штаму A. marginale ВІ-ЗВ1.

Таблиця 4

Узагальнені результати клініко-лабораторного випробування отриманого препарату ПКAgAl для визначення титру АнтAl в РНІФ

Вивчені показники	Рівень узагальнених показників ефективності використання отриманого препарату ПКAgAl при визначенні титру АнтAl в РНІФ ($\bar{m} \pm d$)
Межа чутливості	в модельній системі: протиАнапIgКр+ФСБ (рН=7,0) (0,197±0,039)мг білку/мл; в модельній системі: протиАнапIgКр+сироватка крові людини (0,249±0,067)мг білку/мл
Специфічність	(84±5)%
Відтворюваність	(78±7)%

Джерела інформації:

1. Васильєва И.С. Новые болезни, передаваемые иксодовыми клещами (Ixodidae). Эрлихиозы и анаплазмозы человека [Электронный ресурс] / И.С. Васильева / Режим доступа : <http://lib.2005.rat-info.ru/files/>.
2. Dumler J.S. Anaplasma and Ehrlichia infection [Text] / J.S. Dumler // Ann. N.Y. Acad. Sci. - 2005. - Vol.1063. - P.361-373.
3. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [on line] / D. R. Boone, R. W. Castenholz, D. H. Bergey [et al] / Second edition : "Springer", Volume Two. -2001. -1338 p. - ISBN 0387241450, 9780387241456 / Режим доступа : <http://books.google.com.ua/books?id=9cwgo-9lyTUC&hl=ru>
4. Rikihisa Y. The tribe Ehrlichieae and Ehrlichial diseases [Text] / Y. Rikihisa // Clin. Microb. Rev. - 1991. - Vol.4, №3. - P.286-308.
5. Рар В.А. Выявление антител к возбудите-

лям гранулоцитарного анаплазмоза и моноцитарного эрлихиоза человека в крови пациентов из Новосибирской области [Текст] / В.А. Рар, Н.В. Фоменко, О.В. Мельникова, Н.Я. Черноусова. // Бюл. сибирской медицины. Приложение 1. Актуальные вопросы неврологии. - Новосибирск. - 2008. - С.73-77.

6. Bakken J.S. The serological response of patients infected with the agent of human granulocytic ehrlichiosis [Text] / J.S. Bakken, I. Haller, D. Riddell [et al] // Clin. Infect. Dis. - 2002. - Vol.34. - P.22-27.

7. Brouqui, P. Diagnosis of granulocytic ehrlichiosis in humans by immunofluorescence assay [Text] / P. Brouqui, E. Salvo, J. S. Dumler, D. Raoult // Clin. Diagn. Lab. Immunol. - 2001. - Vol.8, №1. - P.199-202.

8. Білецька Г.В. Гранулоцитарний анаплазмоз (ГАЛ) - нова природно-осередкова інфекція в Україні [Текст] / Г.В. Білецька, О.Ю. Новохатній, І.І. Бень // Матеріали науково-практичної конференції

"Актуальні питання епіднадзора за особливо небезпечними інфекціями, санітарна охорона території, біологічна безпека" - Іллічівськ, 8-10 вересня, 2009. - С.122-123.

9. Приходько Ю.А. Клещи (Acarina: Ixodidae) - носители и переносчики возбудителей в Северо-Восточной части Украины [Текст] / Ю.А. Приходько, О.В. Никифорова, В.А. Наглов // Материалы IV Всероссийского съезда паразитологического общества при РАН "Паразитология в XXI веке - проблемы, методы, решения". - Санкт-Петербург, 2008. - Т.3. - С.48-53.

10. Малеев В.В. Обзор Европейских рекомендаций по диагностике клещевых бактериальных инфекций [Текст] / В.В. Малеев // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. - 2005. - Т.7, №2. - С.130-153.

11. Comer, J.A. Serologic testing for human granulocytic ehrlichiosis at a National Referral Center [Text] / J.A. Comer, W.L. Nicholson, J.G. Olson, J.E. Childs // J. Clin. Microbiol. - 1999. - Vol.37, №3. - P.558-564.

12. Dumler J.S. Ehrlichiosis in humans: epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment [Text] / J. S. Dumler J.E. Madigan, N. Pusterla, J. S. Bakken // Clin. Infect. Dis. - 2007. -

Vol.45, Suppl.1. - P.S45-S51.

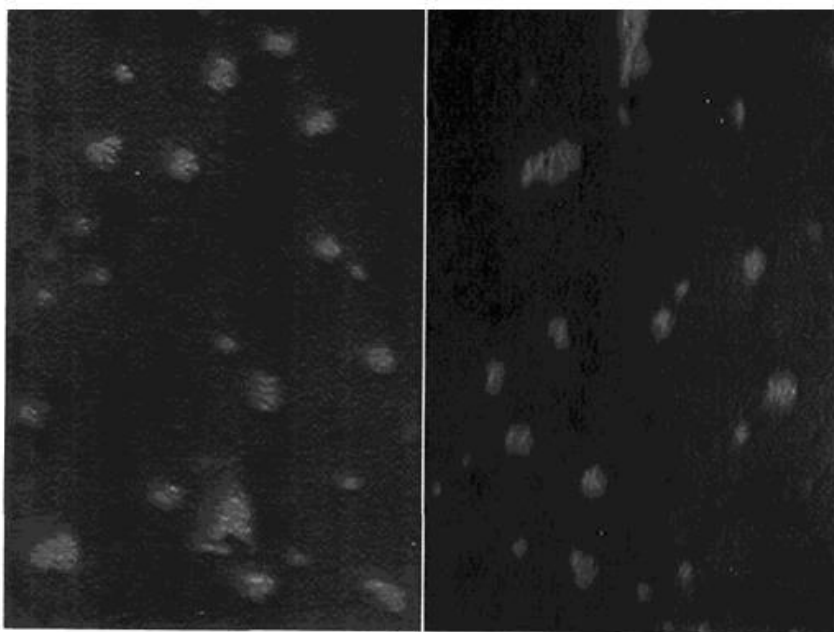
13. Inokuma H. Serotyping isolates of *Anaplasma phagocytophilum* by using monoclonal antibodies [Text] / H. Inokuma, P. Brouqui, J.S. Dumler, D. Raoult // Clin. Diagn. Lab. Immunol. - 2003. - Vol.10, №5. - P.969-972.

14. Walls J.E. Inter- and intralaboratory comparison of *Ehrlichia equi* and human granulocytic ehrlichiosis (HGE) agents strains for serodiagnosis of HGE by the immunofluorescent-antibody test [Text] / J.E. Walls, M. Agüero-Rosenfeld, J. S. Bakken [et al] // J. Clin. Microbiol. - 1999. - Vol.37, №9. - P.2968-2973.

15. Dreher U.M. Serologic cross-reactivity between *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum* / U.M. Dreher, J. Fuente, R. Hofmann-Lehmann [et al] // Clin. Diagn. Lab. Immunol. - 2005. - Vol.12, №10. - P.1177-1183.

16. Dawson J.E. Diagnosis of human ehrlichiosis with the indirect fluorescent antibody test: kinetics and specificity [Text] / J.E. Dawson, D.B. Fishbein, T.R. Eng [et al] // J. Infect. Dis. - 1990. - Vol. 162. - P. 91-95.

17. Olano, J. P. Human monocytotropic ehrlichiosis, Missouri [Text] / J.P. Olano, E. Masters, W. Hogrefe, D.H. Walker // Emerg. Infect. Dis. - 2003. - Vol.9. - P.1579-1586.



Люмінесцентно-мікроскопічна картина при визначенні титру АнтАІ в сироватці крові людей в РНІФ із використанням діагностичного препарату ПКAgAI

Фіг.