



Original Article: APPLICAZIONE DELLA TECNOLOGIA DI STIMOLAZIONE ANTIGENICA DELLE CELLULE PER LA DIAGNOSI DI BRUCELLOSI.

Citation

Ponomarenko D.G., Rakitina E.L., Logvinenko O.V., Kostjuchenko M.V., Sarkisjan N.S., Kovalevich N.I., Applicazione della tecnologia di stimolazione antigenica delle cellule per la diagnosi di brucellosi. *Italian Science Review*. 2014; 1(10). PP. 178-181.

Available at URL: <http://www.ias-journal.org/archive/2014/january/Ponomarenko-Rakitina-Logvinenko.pdf>

Authors

Dmitrij G.Ponomarenko, Head of the Laboratory Pathomorphology dangerous infectious diseases, Ph.D., Stavropol Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Russia.

Ekaterina L.Rakitina, leading researcher Pathomorphology dangerous infectious diseases, PhD, Stavropol Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Russia.

Olga V.Logvinenko, leading researcher Pathomorphology dangerous infectious diseases, Ph.D., Stavropol Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Russia.

Marina V.Kostjuchenko, Researcher, Laboratory Pathomorphology dangerous infectious diseases, PhD, Stavropol Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Russia.

Nushik S.Sarkisjan, Associate Laboratory Pathomorphology dangerous infectious diseases, PhD, Stavropol Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Russia.

Nadezhda I.Kovalevich, Head of research and preventive clinical diagnostic laboratory, PhD, Stavropol Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Russia.

Submitted: January 14, 2014; Accepted: January 20, 2014; Published: January 30, 2014

Introduzione. Le malattie infettive e il processo di vaccino accompagnati da cambiamenti allergiche nel corpo, che possono persistere per lungo tempo, quindi è possibile utilizzarlo come un marker per la diagnosi delle malattie [3,4].

Test cutaneo di allergia con brucellina cosiddetto processo Burne, introdotto nella pratica di laboratorio nella prima metà del XX secolo. Secondo le norme sanitarie - SP 3.1.7.2613-10 e linee guida - MU 3.1.7.1189-03 di test utilizzato per la diagnosi di laboratorio della brucellosi, nonché per determinare l'intensità

dell'immunità post-vaccinazione prima di ri-immunizzazione [2].

Messa in prova allergica con brucellina ha diversi svantaggi. Gli individui che sono altamente sensibilizzati all'antigene di *Brucella* possono sviluppare reazioni quali febbre, brividi, mal di testa, linfoangite, artralgia, ecc Lo svantaggio è il rischio di un risultato falso - positivo allergia concomitante. Contabilità per la reazione viene effettuata in 48-72 ore.

Attualmente conducendo attivamente la ricerca volta a sostituire prova di allergia invasivo sui metodi più sicuri in vitro [5,6,7,8,9,13].

L'analisi della letteratura ha mostrato che l'oggetto promettente della ricerca, in termini di identificazione e la valutazione del grado di allergia sensibilizzazione sono basofili, che svolgono un ruolo centrale nelle reazioni di ipersensibilità immediata. A contatto con le molecole di IgE allergene specializzati su cellule effettrici basofili c'è una cascata di reazioni enzimatiche che portano alla degranolazione e il rilascio di mediatori da granuli citoplasmatici. Queste reazioni portano anche alla sintesi e la secrezione di leucotrieni, citochine, mediatori infiammatori che causano sintomi di allergia. [4]

Sulla base delle caratteristiche di risposta specifici di interazione basofili con allergeni fine XX secolo è stato sviluppato e brevettato un metodo per la valutazione in vitro dei basofili attivazione. La tecnologia si basa sulla determinazione sulfidoLT(LTC₄, LTD₄, LTE₄), secreti IL-innescato 3 basofili attivati allergeni in vitro. È anche chiamato un test di provocazione in vitro. Successivamente, la società è stata anche Buhlmann Laboratories ha sviluppato la versione citometria della stimolazione di prova dei basofili(FLOW - CAST ®), una variante, invece sLT citometria nella terza fase di FLOW- CAST ® determinare il numero di basofili attivati esprimono l'antigene di superficie CD63(gp53)in risposta alla stimolazione con allergene. Il test è altamente sensibile e specifico, in particolare quando l'ipersensibilità farmaco [10,11,12].

Così, il problema è stato risolto sostituendo allergotestov invasivo per metodi sicuri, altamente sensibili e altamente specifici in vitro. Tuttavia, l'analisi della letteratura nazionale ed estero ha dimostrato che non è in precedenza stati condotti studi sulla possibilità e l'efficacia del test di attivazione dei basofili con i risultati rilevazione della reazione mediante citometria a flusso per rilevare "allergia infettivo".

Lo scopo dello studio. Esplora la prospettiva di tecnologia di applicazione

antigenica stimolazione delle cellule per la diagnosi di brucellosi.

Materiali e Metodi: Abbiamo studiato il sangue di 157 persone, tra cui 26 pazienti con acuta e 47 - con la brucellosi cronica, 12 persone vaccinati con *Brucella abortus* ceppo 19 BA(30-35 giorni dopo l'immunizzazione). Al fine di determinare la specificità e sensibilità del metodo esaminato il sangue di donne in gravidanza - 7 persone(31-33 settimane di gestazione), 43 persone di età compresa tra 2-57 anni, con le allergie, il gruppo di controllo era costituito da 12 persone che non hanno una storia di sintomi di allergia, non riprendersi da brucellosi non sono vaccinati contro questa infezione.

Espressione di CD63 sui basofili è stata determinata mediante citometria di flusso FACSCalibur(USA), utilizzando un set di due anticorpi monoclonali flusso CAST Buhlmann laboratori(Svizzera). Come un allergene specifico utilizzato brucellina produzione, Stato federale unitario Enterprise "Microgen"(Russia).

Disinfezione del materiale di prova da pazienti umani brucellosi svolta secondo JV № 1.3.1285-03 aggiungendo al dosaggio di thimerosal sodio ad una concentrazione finale di 1:10.000, seguita da riscaldamento a 56 ° C per 30 min [1].

I risultati ottenuti sono stati elaborati statisticamente utilizzando Statistica 6.0., Utilizzando un t-test.

Risultati dello studio.

Quando si imposta basofili test di attivazione con brucellina differenze significative in termini di donne in gravidanza, le persone con una storia di allergia, e il gruppo di controllo sono stati trovati in questo senso, erano uniti nel gruppo di controllo.

Gli studi hanno dimostrato che i pazienti con la forma acuta della brucellosi nel numero di basofili attivati brucellina sia in prima dal 10 al 17% e la media era di 13,75 ± 1,65 %. Nei pazienti affetti da brucellosi cronica identificato 38-47 % degranulati basofili valore medio di 39,7 ± 3,84 %. Nel gruppo immunizzato contro la brucellosi, il

numero di cellule rilevate variava 9-27 %, in media, pari a $20,0 \pm 3,95$ %. Nel gruppo di controllo indice analizzati variava 0-5 % con una media di $2,22 \pm 0,36$ %.

Nello studio trovato che nei pazienti con grave numero brucellosi acuta di basofili attivati Brucellina 4,7 volte il valore del gruppo di controllo. Nel caso di un decorso cronico della malattia nei pazienti immunizzati, e l'aumento è stato rilevato in cellule identificate 9 e 18 volte, rispettivamente, rispetto al livello di controllo. Nei pazienti con brucellosi acuta e figura analizzato vaccinati era 3,7 e 2 volte più bassa rispetto ai pazienti con malattia cronica.

Conclusione: I risultati indicano la prospettiva di applicazione in test di allergia vitro per brucellosi allergodiagnostic e possono essere utilizzati come alternativa al processo Burne.

Metodo di valutazione reazione allergica in vitro in confronto con test intradermico Burne ha una serie di vantaggi:

- L'uso di citometria a flusso con rilevamento stimolato brucellina, degranolazione dei basofili con anticorpi monoclonali contro CD63 e il flusso usato citometria CAST Flow ® tecnologia permette di mantenere la reazione in termini quantitativi, elimina risultato falso -positivi e falsi negativi;

- A causa del fatto che il metodo proposto per la stima ipersensibilità a Brucellina, un metodo hardware di contabilità con un citometro a flusso FACScalibur(BD, USA), minimizza l'errore umano e aumenta notevolmente l'obiettività dei risultati;

- Formulazione e registrazioni dei risultati della reazione secondo il metodo dell'invenzione viene effettuata per 1 ora;

- Dichiarazione della reazione avviene in condizioni in vitro, che elimina sensibilizzazione ulteriori brucellina corpo e lo sviluppo della reazione sotto forma di febbre, brividi, cefalea, linfangite, artralgia, necrosi nel sito di allergene, ecc;

- Dopo aver preso sangue per l'analisi del metodo proposto il paziente può

ricevere il farmaco necessario, che non ha alcun effetto sui risultati dello studio.

Così, questo metodo di valutazione in vitro del grado di sensibilizzazione dell'antigene organismo gente brucella è promettente e può essere implementato in pratica gli studi clinici e di laboratorio di brucellosis.

References:

1. Safe handling of microorganisms I-II pathogenicity groups(hazard). 03.01.1285 SP - 03.Byulleten normative and methodical documents SSES. - Issue 3(13), Moscow. 2003. pp.67 -144.
2. Bogachyova N.V., 2011. Modern laboratory methods for assessing the effectiveness of immunization against dangerous and especially dangerous infections. Bogachyova N.V. and others. Clinical laboratory diagnostics. - # 6. Pp. 39-41.
3. Kishkun A.A., 2009. Immunological studies and methods of diagnosis of infectious diseases in clinical practice. - Moscow. LLC " Medical Information Agency " with.712.
4. Lawlor, G. 2000. Klinicheskaya immunology and allergologiya.G. Lawlor, T. Fisher, D. Adelman, Gamaleja N.B., Moscow, "Practice", 347 p.
5. Patsula, YI 2000. Immunomonitoring in experimental brucellosis in cattle and laboratory mice: the candidate of veterinary sciences. Omsk, 14 p.
6. Saidov B.M., 2002. Allergodiagnosics brucellosis. Saidov B.M., Akhmedov D.R., Saidov M.S.ZH. Clinical laboratory diagnostics # 3. pp.16-17.
7. Fedoskova T.G., Ilina N.I., Luss L.V. 2002. Principles diagnosis of allergic diseases. Consillium medicum. Volume. Volume 2. # 2
8. Schukovskaya T.I., 2007. Evaluation of acquired immunity against anthrax on the extent of damage of blood leukocytes in vitro antraksinom. Problems especially dangerous infections. 93:81-84
9. De Weck, A.L. 2002. Flow cytometric cellular allergen stimulation test. Technical

and clinical evaluation of a new diagnostic test in allergy and pseudo-allergy. *ACI International*; 4(5):204–215

10. De Weck, A.L. 2008. Diagnostic tests based on human basophils: more potentials and perspectives than pitfalls. De Weck AL, Sanz ML, Gamboa PM, Aberer W, Bienvenu J, Blanca M, Demoly P, Mayorga L, Monneret G, Sainte-Laudy J. *Int Arch Allergy Immunol*.146(3):177-89.

11. Sainte-Laudy, J. 2009. Use of basophil sensitivity not reactivity as a good marker for allergy diagnosis J. Sainte-Laudy, Touraine F. *Inflamm Res. Suppl 1*:28-9.

12.Sarrat, A. 2013. For an efficient and reasonable accreditation of allergen specific IgE.Sarrat, A.et all- Groupe de travail du Réseau des biologistes de l'allergie des centres hospitaliers AllergoBioNet. *Ann. Biol. Clin.*;71(3):325-32.

13.Zheludkov, M.M. 1992. Specific IgE antibodies in brucellosis M.M. Zheludkov et all. *Russ Med Zh.* (5-12):17-9