

Иммунодиагностика токсокароза

П.Д. Новиков, Ю.Т. Никулин, Ж.В. Хотетовская, Д.К. Новиков

Витебский государственный медицинский университет, Витебск, Беларусь

Immunodiagnosics of toxocarosis

P.D. Novikov, Yu.T. Nikulin, J.V. Hotetovskaya, D.K. Novikov

Vitebsk state medical university, Vitebsk, Belarus

Аннотация

Из личинок токсокар получены экскреторно-секреторные антигенные фракции. В концентрации 5-50 мкг/мл белка эти фракции сорбировали на лунки иммунологических планшет при pH 9,6. В лунки вносили разведенные сыворотки крови 60 больных, у которых по клиническим признакам могли быть проявления токсокароза. Сыворотки отмывали и добавляли антииммуноглобулин, меченый пероксидазой и субстрат-хромогенную смесь. Реакцию оценивали на иммуноферментном анализаторе. Отобраны 11 сывороток, реагировавших с антигенами токсокар резко положительно.

Разработана реакция выброса лейкоцитами миелопероксидазы (РВМ) под влиянием антигенов токсокар. После инкубации гранулоцитов с антигенами токсокар в надосадочной жидкости определяется прирост активности миелопероксидазы с помощью субстрат-хромогенной смеси, что позволяет диагностировать наличие или отсутствие сенсibilизации гранулоцитов.

Проведены испытания реакции на специфичность с лейкоцитами 60 больных (30 детей и 30 взрослых) с признаками бытовой и пищевой аллергии, 18 из которых были серопозитивными, а 42 серонегативными в отношении антигенов токсокары.

Суммарное количество положительных и отрицательных ИФА-реакций практически совпадало в обеих группах с их количеством в реакции выброса миелопероксидазы гранулоцитами у серопозитивных больных ($r=0,92$).

Ключевые слова

Антигены токсокар, иммунологические тесты

Summary

Extractable antigen fractions of larva of toxocarae were obtained. This fractions were placed in the immunological plank by pH 9,6. Serum of 60 patients with toxocarosis were examined, using reaction of ejection myeloperoxidase from leukocytes. Increase of quantity and activity myeloperoxidase certificates about the presence of sensibilization to toxocaraes-antigen.

Keywords

Toxocaraes-antigen, immunological tests

Одним из наиболее широко распространенных, но сравнительно малоизученных паразитарных заболеваний человека является токсокароз. Его возбудителями служат нематоды, которые в половозрелом состоянии паразитируют в кишечнике представителей семейств псовых и кошачьих и, соответственно,

получившие название *Toxocara canis* и *Toxocara cati*. Заражение людей, преимущественно детей, происходит путем заглатывания яиц, выделяемых этими животными во внешнюю среду.

Паразитируя в мягких тканях человека, который является неспецифическим хозяи-

ном, лишь в личиночной стадии, токсокары способны вызывать тяжелые полиорганные поражения вплоть до летальных. Отмечается высокая поражаемость населения, особенно детей, токсокарозом. Оценочные расчеты показали, что уровень заболеваемости висцеральным токсокарозом в России близок к цифре 380 на 100 тыс. населения и в некоторых регионах принимает эндемо-эпидемический характер. По данным Республиканского центра гигиены и эпидемиологии процент серопозитивных по токсокарозу лиц среди обследованного на территории Беларуси контингента составил 30.2 в 2000-м году, 31.8 – в 2001-м и 32.7 – в 2002-м [3]. В 2005-м г. в целом по республике данный показатель составил 19.6%, однако в Брестской, Гродненской и Гомельской областях он достигал 31.4, 32.5 и 54.5%, соответственно [1, 2].

Ведущую роль в патогенезе токсокароза играют иммунологические и иммунопатологические реакции [2]. С патоморфологической точки зрения токсокароз представляет собой диссеминированный эозинофильный гранулематоз. Клиника токсокароза крайне полиморфна. Она зависит от интенсивности инвазии, иммунного статуса хозяина, характера распределения личинок гельминта в его органах и тканях, их метаболической активности [2, 3]. Обычно, в зависимости от локализации личинок, различают системный, или висцеральный (ВТ), и местный, или глазной (ГТ), токсокароз. Наиболее постоянными признаками ВТ являются высокая эозинофилия вплоть до лейкомоидной реакции эозинофильного типа [2], рецидивирующая лихорадка, легочный синдром, гепатомегалия, гиперглобулинемия [2, 3, 4].

Для установления окончательного диагноза желательна обнаружение личинок гельминта в биоптатах тканей, в частности печени. Однако практически это удается крайне редко в связи с трудностью нахождения мигрирующих личинок и их идентификации на гистологических срезах. Поэтому ведущее значение приобретают иммунологические методы диагностики токсокароза. В настоящее время используются различные серологические тесты. Однако многие из них недостаточно чувствительны (РИД, РИФ), малоспецифичны (РИД, РНГА с цельным экстрактом), непригодны для применения в широкой клинической практике. Тотальные экстракты взрослых особей или личинок

токсокар содержат значительное количество перекрестно реагирующих компонентов не только с другими видами гельминтов, но и с субстанцией группы крови А(II) и С-реактивным белком сыворотки. Наилучшие же результаты обеспечивает иммуноферментный анализ (ИФА) с экскреторно-секреторным антигеном личинок токсокар [4, 5]. В настоящее время в России выпускается коммерческая тест-система «Тиаскар-стрип» для ИФА. Титры специфических антител от 1:200 до 1:400 свидетельствуют о токсокароносительстве с благоприятным течением инвазии, а титр 1:800 и выше – о болезни. Однако уровень антител не всегда отражает степень активности паразитарного процесса, поскольку он зависит не только от комплекса вышеупомянутых патогенетических факторов, но также может быть результатом множественной инфекции или реинвазии. Кроме того, метаболиты личинок токсокар, используемые в качестве антигенов для ИФА, представляют собой смесь белков [4], гликопротеидов, липидов [4, 5]. Не все из них обладают видовыми свойствами. Поэтому возможны перекрестные реакции с другими видами гельминтов. Для повышения специфичности в ИФА рекомендуют использовать антигены с низким молекулярным весом. Считается, что ИФА обеспечивают высокую степень чувствительности (порядка 78%) при титре больше чем 1:32 [4, 5]. В последние годы проведены исследования, связанные с использованием рекомбинантных антигенов, продуцируемых личинками токсокар второй стадии. В этом случае специфичность ИФА повышается до 92%. Наиболее специфичен иммуноблот к паттерну из 7 антигенов: 24, 28, 30, 35, 132, 147, 200 kd. Однако этот метод значительно повышает стоимость диагностики.

Клеточные тесты иммунодиагностики для диагностики токсокароза до сих пор не применялись. Между тем сенсibilизация лейкоцитов к антигенам личинок токсокар возникает уже на ранних стадиях инвазии. Причем не только к экскреторно-секреторным, но и к кутикулярно-мембранным антигенам (АГ). Поэтому для полной иммунодиагностики, основанной на выявлении всех факторов иммунитета (антител, сенсibilизированных лимфоцитов и гранулоцитов), необходимо испытание с ними различных фракций антигенов.

Материал и методы

Получение яиц токсокар

Основной задачей являлось получение материала для продукции антигена личинок II стадии токсокар. Проведен поиск инвазионного материала. Так как практически инвазированными токсокарами являются щенки собак 3-4-месячного возраста, а в государственных питомниках их не было, то проводился подворный обход в частном секторе города Витебска. Всего было посещено 147 подворий. В тех случаях, когда было получено согласие хозяев, проводили исследование фекалий щенков на предмет обнаружения яиц токсокар. В итоге было получено большое количество экземпляров токсокар. Паразитов разделяли по полу, в результате чего были отобраны самки. После препарации у них извлекались отрезки матки гельминтов, содержащие яйца. После их перетирания в специальных ступках с добавлением 0,5 N раствора NaOH, полученный раствор переливали в центрифужные пробирки и дважды центрифугировали при 3000 g в течение 10 минут с последующим удалением супернатанта. Затем осадок трижды центрифугировали при тех же условиях в 0,9-процентном растворе NaCl.

После того осадок растворяли в растворе Барбагалло (2-процентный раствор формалина в 0,9-процентном растворе NaCl) и разливали в чашки Петри. В подобных условиях личинки, находящиеся в яйцах, достигают инвазионного состояния при комнатной температуре в течение 3-4-х недель. После этого часть яиц использовали для заражения подопытных мышей с целью получения у них иммунной сыворотки. Предварительно осуществлялся подсчет яиц, содержащих жизнеспособные личинки гельминта.

Мышей линии СВА массой до 18-20 грамм разделяли на 4 группы. Всех их заражали путем введения в полость желудка инвазионных яиц токсокар в количестве 100, 400, 1000 и 2000 штук, соответственно. На 4, 7, 14, 21, 30, 45, 75, 90, 120 и 150-е сутки после заражения мышей умерщвляли путем дислокации шейных позвонков, затем декапитировали и забирали кровь. На каждый день наблюдений при каждой дозе заражения использовали по 5 мышей. Степень инвазированности мышей проверяли путем подсчета количества личинок в печени, легких и головном мозге.

Получение антигенов личинок токсокар

Полностью прошедшие эмбриональное развитие и инвазионные яйца *Toxocara Canis* (1×10^4) были подвержены вылуплению *in vitro*. Суспензия личинок промывалась 3 раза в Hanks Balanced Salis Solution (HBSS) со 100 ед/мл пенициллина и 250 мкг/мл стрептомицина и оставлялась на ночь в HBSS при 37° в аппарате Бермана, состоящем из 5-8 слоев бумаги. Наиболее жизнеспособные личинки мигрировали через бумагу, тогда как невылупившиеся яйца, остатки вылупившихся и поврежденные личинки удерживались на слоях бумаги. Для этой цели использовали папиросную бумагу, ватман №12 или ЕД-512, фильтровальную бумагу. Эти личинки не требовали дальнейшего промывания и помещались в среду для культивирования НМЕМ (Eagle's Minimal Essential Medium with Hank's Sals), содержащую 100 ед/мл пенициллина и 250 мкг/мл стрептомицина в стандартных центрифужных пробирках (18 на 15,0 мм), закрытых силиконовыми пробками. Каждая пробирка содержала 5 мл НМЕМ с концентрацией личинок 1×10^4 мл. Пробирки инкубировали при 37°С. Каждые 7 дней пробирки извлекали и проверяли на жизнеспособность личинок. Пробирку с жизнеспособностью менее 25% удаляли. В остальных пробирках личинки осаждали, и надосадочную жидкость асептически отсасывали. В пробирки помещали свежую стерильную среду и пробирки возвращали в инкубатор. Истощенную среду центрифугировали, чтобы извлечь все личинки, которые могли быть отсосаны. Эту среду диализировали и концентрировали в объеме до 30 мл, используя ультрафильтрационную систему (Amicon H1CP10) перед лиофилизацией.

Личинки в среде выживали без значительной смертности по крайней мере 18 мес *in vitro*, продуцируя экскреторный антиген. Личинки оставались на II ст. Личинки, содержащиеся в HBSS, фосфатнобуферном растворе или физиологическом растворе не выживали дольше 21 дня. От 1×10^7 личинок, содержащихся в 500 мл НМЕМ получали примерно 0,5-1 мг лиофилизированного экскреторно-секреторного продукта токсокар в неделю. Концентрация белка в нем была 1-2 мг/мл. Электрофорез в полиакриламидном геле продемонстрировал как минимум 3 белковых компонента. Полученную экскреторно-секреторную фракцию использовали в тестах для серодиагностики висцерального токсокароза у человека и зараженных мышей.

Разработка тест-системы, для определения антител классов IgE, IgG к антигенам токсокар в сыворотке крови

В концентрации 5-50 мкг/мл белка фракции антигенов личинок сорбировали на лунки иммунологических планшет в карбонат-бикарбонатном буфере (рН 9,4) пипетировали по 200 мкл в каждый ряд микропланшета и инкубировали при комнатной температуре в течение 18-24 часов. После инкубации микропланшет отмывали 3 раза ФСБ раствором (рН 7,2) с 0,05% содержанием твина, после чего промывали чистым ФСБ без твина и высушивали при комнатной температуре.

Техника постановки реакции при выявлении антител к АГ токсокар была аналогичной для методов твердофазного гетерогенного иммуноферментного анализа с разделением компонентов:

1. Кровь забирали из вены в пробирку и получали сыворотку. Сыворотку разводили в 1:1-20 раза (для определения IgE-антител) и/или в 20-1000 раз (для определения IgG-антител человека) забуференным физиологическим раствором (ФРФ) рН 7,2. Сыворотки замораживали при -20°C .
2. В лунки с сорбированным АГ и контрольные лунки вносили по 150 мкл разведенной сыворотки (в дубле) и инкубировали 45 мин при 37°C в термостате.
3. Из лунок микропланшета удаляли сыворотку и отмывали не менее 3 раз ФСБ раствором с рН 7,2 с 0,05% содержанием твина. Время экспозиции промывающего раствора 4-5 мин.
4. После промывки вносили анти-IgE-антитела или анти-IgG-антитела, меченные пероксидазой хрена по 100 мкл в каждую лунку микропланшета и инкубировали 5 мин при 37°C в термостате.
5. Из лунок микропланшета удаляли конъюгат и отмывали не менее 3 раз ФСБ раствором с рН 7,2 с 0,05% содержанием твина. Время экспозиции промывающего раствора 4-5 мин.
6. Внесение проявляющего раствора. Во все лунки планшеты, добавляли по 150 мкл хромоген-субстратной смеси (0,015% H_2O_2 и ТМБ, разведенной фосфат-цитратным буфером с рН 5,0). Проявляющий раствор готовился непосредственно перед внесением.
7. Инкубировали при комнатной температуре в течение 15-25 мин до появления

выраженного окрашивания синего цвета (при использовании ТМБ).

8. Останавливали реакцию внесением 50 мкл 4% серной кислоты, цвет раствора изменялся на желтый.

Учет результатов проводился соответственно с правилами иммуноферментного анализа. Кроме этого контроль не был окрашен, либо слабо окрашен. (При замере на фотометре оптическая плотность в отрицательной лунке не должна превышать 0,300 е.д. оптической плотности).

Результаты исследования

Результаты ИФА. Использовали сыворотки крови 30 больных детей и 30 взрослых, у которых по клиническим признакам могли быть проявления токсокароза. Сыворотки разводили 1:10 – 1:1000 для постановки ИФА.

Для выбора разведений исследуемых сывороток крови была проведена статистическая обработка кривых титрования экспериментально найденных 8 положительных проб сывороток для IgE-антител и 18 положительных проб для IgG-антител к антигенам токсокар (рис. 1). На основании обработки кривых титрования мы определили разведение, при котором значения исследуемого параметра с известной вероятностью попадают на средний участок кривой титрования ($a=95\%$, $p<0,05$), где измерение наиболее достоверно. Такими разведениями в нашей иммуноферментной системе стали для IgE-антител 1:4, для IgG-антител 1:200.

Исследовано 60 сывороток крови. Отобраны 18 сывороток, реагирующих с антигенами токсокар резко положительно (1:200-1:1000).

Для оценки специфичности системы мы протестировали 12 проб положительных сывороток (по 6 в отношении антител к 2-м образцам антигенов токсокар) в парных постановках с блокировкой и без блокировки антигенами токсокар связывания антител сывороток на сорбированном в лунках микропланшет. Для блокировки связывания на первом этапе иммуноферментного анализа исследуемые сыворотки крови инкубировали с добавлением свободного антигена в конечной его концентрации в лунке микропланшета 50 мкг/мл, для обеспечения конкуренции между свободным и связанным с планшетом за антитела. После этого ИФА проводилось в обычном режиме. Снижение оптической плотности после блокировки антигеном составляло 55-78%, что указывает на специфичность системы.

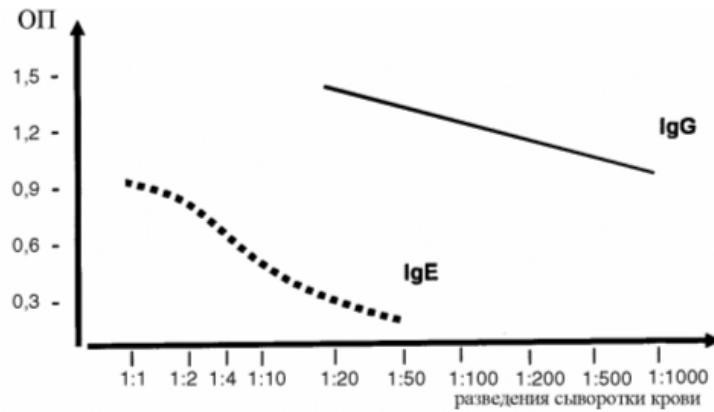


Рис. 1. Кривые титрования IgE- и IgG-антител к антигенам токсокар

Разработка метода определения сенсibilизации гранулоцитов к токсокарам

Миелопероксидаза является специфическим и доступным для клинического исследования маркером гранулоцитов [4]. Наибольшее ее содержание обнаружено в азурофильных секреторных гранулах нейтрофилов. По данным литературы, встраивание секреторных гранул в плазматическую мембрану гранулоцитов с последующей секрецией миелопероксидазы может запускаться хемоаттрактантами (например, N-формил-метионил-лейцил-фенилаланином (fMLP)) или же при взаимодействии иммуноглобулинов, связанных Fc-рецепторами с соответствующими антигенами, причем активность фермента миелопероксидазы повышается до секреции ее из гранул [5,6]. На поверхности всех лейкоцитов имеются Fc-рецепторы, которые связывают Fc-фрагменты иммуноглобулинов различных классов (IgG, IgE, IgA), в том числе обладающие специфичностью антитела. Поэтому, с одной стороны, лейкоциты с помощью этих антител могут специфично взаимодействовать с антигенами-аллергенами, с другой – концентрация антител в крови снижается и нередко из-за этого они не выявляются в сыворотке крови.

Для определения сенсibilизации лейкоцитов к антигенам токсокар нами разработана реакция выброса миелопероксидазы (РВМ) под влиянием антигенов токсокар. Сущность ее заключается в том, что определяется прирост активности миелопероксидазы после инкубации гранулоцитов с антигенами в над-

садочной жидкости с помощью субстрат-хромогенной смеси (ортофенилендиамина или тетраметилбензидина и перикиси водорода) по интенсивности окраски субстрат-хромогенной смеси, что позволяет диагностировать наличие или отсутствие сенсibilизации гранулоцитов *in vitro* визуально или оценить степень сенсibilизации гранулоцитов человека к антигенам токсокар на фотометре.

Подготовка клеток больного для постановки реакции выброса миелопероксидазы:

1. Получение лейкосуспензии. Кровь берут из вены в пробирку с гепарином (20 ед. на 1 мл крови). В зависимости от количества проб с аллергеном достаточно от 3 до 10 мл крови. Кровь отстаивают в узких пробирках до момента четкого отделения эритроцитов от плазмы (не переставивать – осадят лейкоциты). Плазму с лейкоцитами отсасывают, центрифугируют при 1000 об/мин 5 мин. Плазму отсосасывают. К осадку лейкоцитов добавляют лизирующий эритроциты раствор (0,84% теплый (37°C) раствор хлористого аммония) до 8-10 мл. Ресуспензируют и снова центрифугируют. Затем, полученную лейкосуспензию отмывают не менее трех раз стерильным физиологическим раствором на фосфатном буфере с рН 7,2 (ФРФ) содержащим 0,2% глюкозу и 0,0025% CaCl₂.
2. Разведение суспензии. Разведение клеток в лейкосуспензии должно быть: при содержании 6-9. x 10⁹ кл/л - 1/3 от объема крови, например, из 10 мл крови выделяют суспензию и доводят объем до 3,3 мл стериль-

ным физиологическим раствором на ФРФ, содержащим 0,2% глюкозу и 0,0025% CaCl_2 . При более низком содержании лейкоцитов разведение лейкосуспензии должно составлять 1/4-1/5 от объема крови, при высоком содержании – более 12×10^9 – 1/2,5- 1/2 от объема крови. Оптимальное концентрация клеток в лейкосуспензии 1,5-2 млн./мл.

Подготовка антигена.

В реакции использовались экскреторно-секреторная фракция личинок токсокар (АГ-токсокары), предварительно очищенные от эндогенных пероксидаз.

Выбор концентрации антигена подбирался эмпирически путем статистической обработки кривых титрования 20 положительно реагирующих лейкосуспензий на антигены токсокар, которые были отобраны от серопозитивных больных. На основании полученных результатов мы определили концентрацию аллергена в мкг/мл, при котором значения оптической плотности попадают на средний участок кривой титрования, где измерение наиболее достоверно (в диапазоне 1-100 мкг/мл).

Ход реакции

– В круглодонные лунки иммунологических планшет или микропробирки вносят 0,100 мл (100 мкл) АГ-токсокары и добавляют равный объем лейкосуспензии. Пробы дублируют. Параллельно ставятся холостые пробы лейкосуспензии каждого больного со

стерильным физиологическим раствором (отрицательный контроль).

- Смесь инкубируют 45 мин при 37°C.
- Центрифугируют (если планшеты то на планшеточной центрифуге) в течении 10 мин при 1500 об/мин.
- Перенос надосадочной жидкости из микропробирок и/или круглодонной планшеты и/или микропробирки осторожно (чтобы не отсосать клетки) забирается 50 мкл надосадочной жидкости и переносится в лунку (под тем же номером) плоскодонной планшеты для иммуноферментного анализа и/или другую микропробирку.
- Внесение проявляющего раствора. Во все лунки планшеты для ИФА и/или микропробирки к надосадочной жидкости добавляется по 150 мкл хромоген-субстратной смеси (0,015% H_2O_2 и тетраметилбензидин (ТМБ) или ортофенилендамин (ОФД), разведенными фосфат-цитратным буфером с рН 5,0) Проявляющий раствор готовится непосредственно перед внесением.
- Инкубация при комнатной температуре в течении 15-25 мин до появления выраженного окрашивания синего цвета (при использовании ТМБ).
- Остановка реакции внесением 50 мкл 4% серной кислоты, цвет раствора изменяется на желтый.

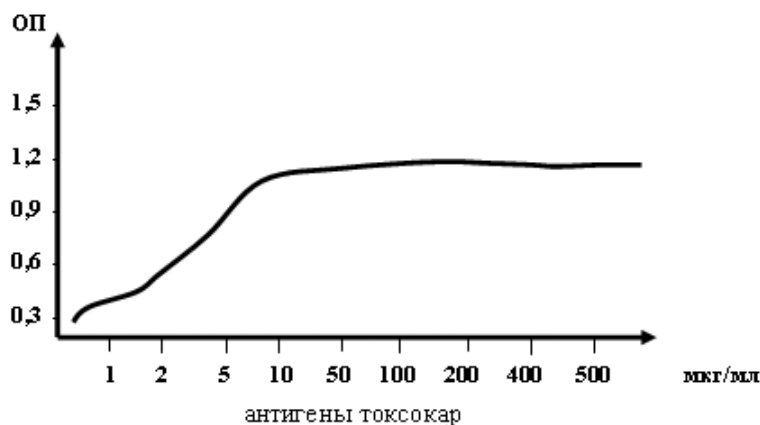


Рис. 2. Кривая титрования доза/эффект по антигенам токсокар в РВМ

Учет результатов

Оценку реакции проводят визуально, либо на фотометре при длине волны 450 нм.

Примечание: отрицательный контроль – не должен быть окрашен, либо слабо окрашен. (При замере на фотометре оптическая плотность в отрицательной лунке не должна превышать 0,300 е.д. оптической плотности).

Положительной реакция считается:

- А. При визуальной оценке результатов – окраска опытной пробы более желтая, чем пробы отрицательного контроля и легко различима. По окрашенной шкале - оценка от «+» до «+++». В других случаях реакция трактуется как сомнительная.
- Б. При фотометрической оценке результатов: оптическая плотность опытной пробы превышает оптическую плотность пробы отрицательного контроля не менее чем вдвое и она не меньше 0,600. При превышении оптической плотности опытной пробы по сравнению с пробой отрицательного контроля менее чем в 2 раза, а также в других случаях результат считается сомнительным.

Возможные ошибки проведения реакции:

- А. Интенсивное окрашивание в лунке отрицательного контроля:
1. Взбалтывание при переносе надсадочной жидкости.
 2. Несвоевременная остановка реакции.
 3. Очень густая лейкосуспензия (в этом случае все лунки опытных проб будут окрашены, но неодинаково).
 4. Возможна нестабильность клеточных мембран лейкоцитов больного и их повреждение (в этом случае все лунки опытных проб будут одинаково окрашены).

Б. Другие:

1. Неправильно приготовлен или неактивен проявляющий раствор.
2. Сильно разведена лейкосуспензия.

Оценка специфичности реакции выброса миелопероксидазы

Для апробации метода мы провели испытания реакции на специфичность с лейкоцитами 60 больных (30 детей и 30 взрослых) с признаками бытовой и пищевой аллергии, 18 из которых были серопозитивными, а 42 серонегативными в отношении АГ-токсокары.

Как видно из табл. 1, суммарное количество положительных и отрицательных ИФА-реакций практически совпадало в обеих группах с их количеством в реакции выброса миелопероксидазы гранулоцитами у серопозитивных больных ($r=0,92$). Несколько большее количество положительных результатов в РВМ объясняется тем, что РВМ выявляет не только IgG-зависимую сенсибилизацию, но и IgE-зависимую.

Необходимо отметить, что предлагаемый метод – реакция выброса миелопероксидазы (РВМ) является наиболее доступным для клинической лаборатории, простым в исполнении, экономически выгодным, может использоваться, как для разовых так и для массовых скрининговых исследований, по времени проведения анализа (1,5-2,0 часа) является более быстрым, чем классический твердофазный ИФА, характеризуется достаточно высокой достоверностью и простотой постановки. Результаты РВМ должны рассматриваться в комплексе с данными других клинико-лабораторных исследований.

Таблица 1
Результаты РВМ и содержание IgG-антител в сыворотке у больных в группе предварительной апробации

Группы больных	РВМ		Антитела IgG в сыворотке	
	Количество / %			
	положительные реакции	отрицательные реакции	положительные реакции	отрицательные реакции
1. Аллергия к бытовым аллергенам (n =30)	10 / 33,3	20 / 66,7	8 / 26,6	22 / 73,4
2. Аллергия к пищевым аллергенам (n =30)	11 / 36,7	19 / 63,3	10 / 33,3	20 / 66,7

Выводы

1. Из личинок особей получены суммарные экстракты антигенов в фосфатно-солевом буфере. Из личинок токсокар получены экскреторно-секреторные антигенные фракции. В концентрации 5-50 мкг/мл белка эти фракции сорбировали на лунки иммунологических планшет при рН 8,0. Исследовано в ИФА 60 сывороток крови на наличие IgG- и IgE-антител. Отобраны 18 сывороток, реагирующих с антигенами токсокар резко положительно. Эти сыворотки крови использованы в дальнейшем для анализа антигенного состава секреторных фракций с целью получения образцов очищенных антигенов.
2. Разработана реакция выброса миелопероксидазы (РВМ) под влиянием антигенов токсокар. Сущность ее заключается в том, что определяется прирост активности миелопероксидазы после инкубации гранулоцитов с антигенами в надосадочной жидкости с по-

мощью субстрат-хромогенной смеси (ортофенилендиамина или тетраметилбензидина и перикиси водорода) по интенсивности окраски субстрат-хромогенной смеси, что позволяет диагностировать наличие или отсутствие сенсibilизации гранулоцитов *in vitro* визуально или оценить степень сенсibilизации гранулоцитов человека к антигенам токсокар на фотометре.

3. Для апробации метода мы провели испытания реакции на специфичность с лейкоцитами 60 больных (30 детей и 30 взрослых) с признаками бытовой и пищевой аллергии, 18 из которых были серопозитивными, а 42 серонегативными в отношении АГ-токсокары. Суммарное количество положительных и отрицательных ИФА-реакций практически совпадало в обеих группах с их количеством в реакции выброса миелопероксидазы гранулоцитами у серопозитивных больных ($r=0,92$).

Литература

1. Гельминтозы, протозоозы, трансмиссивные зоонозные, заразные кожные заболевания и инфекции, передаваемые преимущественно половым путем в Республики Беларусь (Информационно-аналитический бюллетень за 2002 год). Мн.: 2003.
2. Адаменко Г.П., Никулин Ю.Т. Токсокароз – актуальная проблема здравоохранения. Мед. новости 2005; №1: 31-35.
3. Irigoyen J.A., Sanchez C.J.S. Toxocarasis: a cause of hyper IgE and eosinophilia. Invest. Aallergol. Clin. Immunol. 1995; 5: 232-234.
4. Malafiej E., Spiewak E. The significance of the level of antibodies in the evaluation of the effects of treatment of toxocarasis. Wiad. Parazytol. 2001; 47(4): 805-810.
5. Jacquier P., Gottstein B., Stingelin Y. et al. Immunodiagnosis of toxocarosis in humans: evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay kit. J. of clinical microbiol. Sept. 1991: 1831-1835.

Работа выполнена при поддержке ГНТП «Инфекционные заболевания и микробиологические биотехнологии»