

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**СТАВРОПОЛЬСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ПРОТИВОЧУМНЫЙ ИНСТИТУТ**

*На правах рукописи*

**ДЖАНАЕВ Вячеслав Феликсович**

**РАЗРАБОТКА СУСПЕНЗИОННЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЭКС-  
ПРЕССНОЙ ИММУНОДИАГНОСТИКИ СИФИЛИСА**

*03.00.23-биотехнология  
03.00.07 -микробиология*

**ДИССЕРТАЦИЯ**  
на соискание учёной степени  
кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук,  
профессор **И.С.Тюменцева**  
доктор медицинских наук  
**И.А.Базиков**

*Ставрополь - 2004*

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Аг	-	антиген
Ат	-	антитела
БСА	-	бычий сывороточный альбумин
г	-	грамм
дН <sub>2</sub> О	-	дистиллированная вода
ДИА	-	дот-иммуноанализ
ЗППП	-	заболевания , передающиеся половым путём
ЗФР	-	забуференный физиологический раствор
ИФА	-	иммуноферментный анализ
КСР	-	комплекс серологических реакций на сифилис
мг	-	милиграмм
мин	-	минута
МИБП	-	медицинские иммунобиологические препараты
мкг	-	микрограмм
мкл	-	микролитр
мл	-	милilitр
МР	-	микрореакция преципитации
НЛС	-	нормальная лошадиная сыворотка
НЦМ	-	нитроцеллюлозная мембрана
ПААГ	-	полиакриламидный гель
ПАФ	-	полный адъювант Фрейнда
рН	-	отрицательный логарифм концентрации водородных ионов
ПЭГ	-	полиэтиленгликоль
РАЛ	-	реакция агглютинации латекса
РИТ	-	реакция иммобилизации бледных трепонем

РИФ-абс	-	реакция иммунофлуоресценции с абсорбцией
РИФ	-	реакция иммунофлуоресценции
РПГА	-	реакция пассивной гемагглютинации
РСК	-	реакция связывания комплемента
СтавНИПЧИ	-	Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт
°С	-	градус Цельсия
УЗТА	-	ультразвученный трепонемный антиген
ч	-	час
Ig	-	иммуноглобулин

# ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
<b>ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ</b>	5
<b>ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>	
<b>Глава 1. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ЭПИДЕМИОЛОГИИ И ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ СИФИЛИСА</b>	10
1.1. Эпидемиология сифилиса	10
1.2. Методы лабораторной диагностики сифилиса.	17
1.3. Использование коллоидного серебра в конструировании диагностических тест-систем .....	28
<b>СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ</b>	
<b>Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....</b>	31
2.1. Штаммы микроорганизмов, взятые в работу	31
2.2. Питательные среды .....	31
2.3. Основные химические реактивы и сырье .....	31
2.4. Аппаратное оснащение исследований .....	31
2.5. Материалы, полученные из клиник .....	36
2.6. МИБП и биологические препараты .....	36
2.7. Лабораторные животные, использованные в опытах .....	37
2.8. Физико-химические и иммунологические методы	37
2.9. Сублимация МИБП .....	38
2.10. Статистическая обработка материала .....	38
<b>Глава 3. СИФИЛИС В РЕСПУБЛИКЕ СЕВЕРНАЯ ОСЕТИЯ-АЛАНИЯ .....</b>	39
<b>Глава 4. РАЗРАБОТКА ТРЕПОНЕМНОГО АНТИГЕННОГО СУСПЕНЗИОННОГО ДИАГНОСТИКУМА ДЛЯ РЕАКЦИИ АГГЛЮТИНАЦИИ ЛАТЕКСА .....</b>	56
<b>Глава 5. РАЗРАБОТКА ТРЕПОНЕМНОГО АНТИГЕННОГО ДИАГНОСТИКУМА С КОЛЛОИДНЫМ СЕРЕБРОМ ДЛЯ ДОТ-ИММУНО-АНАЛИЗА .....</b>	77
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	90
<b>ВЫВОДЫ .....</b>	98
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	100

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### ***Актуальность проблемы***

Сифилис – болезнь оборотень, хамелеон, грозная с хроническим волнообразным течением, способная проявить себя множеством кожных симптомов, поражающая практически все органы и ткани, в глубоком смысле – нейроинфекция, протекающая без особых ощущений для больного, который, находя массу отговорок и объяснений проявлениям её, не обращается к специалисту. Сифилис способен сбить с толку многих врачей не венерологов и требует к себе отношения по принципу – всякая сыпь на коже считается сифилисом, пока не доказано обратное. Необходимо отметить, что заболевания, передающиеся половым путем (ЗППП), и в частности сифилис, способствуют распространению такого смертельно опасного заболевания как ВИЧ-инфекция.

По статистике Минздрава РФ, в России в 2002 г. зарегистрировано 1,047 млн. случаев ЗППП, в том числе 207 тыс. 157 случаев заболевания сифилисом. Заболеваемость сифилисом в России остается крайне высокой и составляет более 143 случаев на 100 тыс. населения. По сравнению с 1989 г. число заболевших сифилисом выросло более чем в 33 раза. За прошедший год зарегистрировано свыше 52 тыс. больных ЗППП в возрасте до 17 лет. У девочек до 14 лет показатель заболеваемости сифилисом по сравнению с 1990 г. возрос в 85 раз. Проведенный в 37 субъектах России анализ путей заражения сифилисом показал, что в 60 % случаев дети заразились половым путем. В таких условиях большое значение приобретает своевременная диагностика данного заболевания, основанная на высокочувствительных и высокоспецифичных реакциях. Особая роль при этом должна отводиться методам массового профилактического обследования населения (скрининга) с целью раннего выявления инфекции, что также

диктует необходимость повышения требований к чувствительности и специфичности экспрессных тестов на сифилис (Овчинников Н.М., Беднова, В.Н., Делекторский В.В., 1987; Дмитриев Г.А., 1996; Ткачев В.К., 1997; Сухова Л.П., Машеро В.В., Войнова Н.Н., 1999, Онищенко Г.Г., 2002; Johnson P.C., Farnie M.A., 1994; Larsen S.A., Steiner B.M., Rudolf A.N., 1995; Young H., 1998).

В лабораторной практике используют комплекс серологических реакций (КСР), включающий отборочную реакцию микропреципитации (МР) с кардиолипидным антигеном и стандартные серологические реакции – реакцию связывания комплемента (РСК) с кардиолипидным и трепонемным антигенами. Кроме того, ставят специфические реакции - иммунофлуоресценции (РИФ) и её модификации (РИФ- абс, РИФ - 200), реакцию иммобилизации бледных трепонем (РИБТ), иммуноферментный анализ (ИФА). При этом не все вышеуказанные тесты равнозначны по чувствительности и специфичности из-за разных причин: использование неспецифического кардиолипидного антигена, наличия в исследуемом материале антител к общим антигенам спирохет, перекрестные реакции при других заболеваниях и определенных физиологических состояниях организма.

Поэтому в зоне внимания исследователей постоянно находятся проблемы совершенствования существующих и разработки новых методов диагностики сифилиса с целью расширения арсенала диагностикумов и повышения их качества.

### ***Цель и основные задачи исследования***

Цель диссертационной работы – разработка биотехнологии получения новых эффективных специфических трепонемных иммунпрепаратов и оценка их пригодности для использования в диагностике сифилиса.

Для достижения указанной цели предполагалось решить следующие задачи:

- провести анализ заболеваемости и лабораторной диагностики сифилиса в Республике Северная Осетия-Алания;
- получить высокоспецифичный полноценный комплексный трепонемный антиген для использования его при конструировании медицинских иммунобиологических препаратов (МИБП);
- разработать биотехнологию получения трепонемного антигенного диагностикума на основе полимерной матрицы – латекса для экспресс-диагностики сифилиса в реакции агглютинации (РАЛ);
- разработать трепонемный суспензионный антигенный диагностикум с коллоидным серебром для дот-иммуноанализа (ДИА);
- провести лабораторные и клинические испытания разработанных трепонемных иммунодиагностикумов.

### **Научная новизна работы**

Впервые представлены данные об особенностях эпидемиологии сифилиса в Республике Северная Осетия-Алания за последние пять лет. Методом эпидемиологического районирования определены тенденции распространения этой инфекции и причины высокой заболеваемости в отдельных районах Республики, которые выше многих территориальных показателей по Российской Федерации.

Разработана высокоэффективная схема получения комплексного трепонемного антигена, который использован в качестве лиганда при конструировании иммунодиагностикумов.

Получен трепонемный суспензионный антигенный латексный диагностикум, характеризующийся высокой чувствительностью и специфичностью.

Впервые осуществлена разработка биотехнологии получения трепонемного антигенного препарата на основе коллоидного серебра для ДИА.

### ***Практическая значимость диссертации***

Разработанные суспензионные антигенные трепонемные полиакролеиновый диагностикум для РА и иммунодиагностикум с частицами золя коллоидного серебра для ДИА, как показали лабораторные и клинические испытания, обеспечивают высокую специфичность, чувствительность, и демонстративность при проведении иммуноанализов. Сочетание этих двух тестов позволяет серологически верифицировать сифилис практически у 100 % пациентов и рекомендовать их применение в составе нового комплекса реакций на сифилис.

Результаты реакций учитывают визуально, вследствие чего отпадает нужда в дорогостоящем оборудовании. Простота и экономичность реакций, стабильность их компонентов позволяют осуществлять постановку тестов в лабораториях различного уровня. Это обуславливает их преимущества и особую ценность при проведении массовых скрининговых исследованиях на сифилис.

Материалы научных разработок легли в основу следующих методических документов:

1. Методические рекомендации «Получение и применение суспензионных трепонемных антигенных латексного диагностикума и иммунодиагностикума с коллоидным серебром для экспресс-анализа на сифилис», одобрены Ученым советом СтавНИПЧИ (протокол № 8 от 30.09.2004) и утверждены директором СтавНИПЧИ.

2. Информационно-методическое письмо «Характеристика заболеваемости сифилисом с 1999 г. по 2003 г. в Республике Северная Осетия-Алания с учетом региональных особенностей. Совершенствование методов и мер по её снижению», утверждено ЦКМС СОГМА 10.11.2004 г.

### ***Апробация работы***

Основные результаты диссертационной работы были доложены на 8-й научной сессии сотрудников СОГМА «Актуальные проблемы теорети-



ческой и клинической медицины» (Владикавказ, 2001 г.), межлабораторной научной конференции СтавНИПЧИ (Ставрополь, 2004 г.).

### ***Публикации***

Основное содержание диссертации отражено в 7 опубликованных работах.

### ***Структура и объем работы***

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 4-х глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка использованной литературы. Она изложена на 125 страницах, содержит 13 таблиц и 20 рисунков. Список литературы включает 165 отечественных и 82 зарубежных источника.

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### Глава 1. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ЭПИДЕМИОЛОГИИ И ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ СИФИЛИСА

#### *1.1. Эпидемиология сифилиса*

Заболеваемость инфекциями, передаваемыми половым путем (ИППП), продолжает увеличиваться во всем мире и представляет одну из основных социальных и медицинских проблем, обусловленная значительным инфицированием молодых людей. По данным ВОЗ, в мире ежегодно регистрируется более 250 млн. случаев заболевания ИППП, в том числе сифилисом - 3,5 млн. (Мавров Г.И., Гебенко Т.В., 1998; Чеботарев В.В., Земцов М.А. 1999; Еремин В.Ф., Барабанов Л.Г., Гасич Е.Л. и др., 2002; Quinn T.C., 1994; Chermesky M.A., 1999 и др.).

Уровень заболеваемости сифилисом в России достиг беспрецедентных по своим масштабам величин за всю послевоенную историю нашей страны: в 1996 году заболеваемость сифилисом составила 264,6 случая на 100000 населения (Горелова О.В., Аковбян Н.А., Фидаров А.А., 1999), а среди лиц в возрасте 20-29 лет - 900 случаев на 100000 (Young H., 2001), в 1999 г. она достигла 186,7 случаев на 100000 населения (Ломоносов К.М., 2002). Лишь в 1925 году в разгар НЭПа показатель заболеваемости сифилисом был выше – 683 случая на 100000 населения (Волкославская В.Н., 1998; Онищенко Г.Г., 2002). Эпидемия сифилиса наносит в настоящее время в России большой ущерб как здоровью граждан, так и экономике страны (Лосева О.К., 1991; Аравийская Е.Р., 1999; Лосева О.К., Бабкова И.Н., 1999).

Значительный рост заболеваемости сифилисом отмечается во всех республиках бывшего Советского Союза (с увеличением заболеваемости среди подростков, беременных и сельского населения) (Капкаев Р.А., 1998;

Еремин В.Ф., Баранов М.Г., Гасич Л.Е. и соавт., 2002; Юлдашев К.А., Магрунов Б.А., Парпиев З.А. и соавт., 2003).

Как сообщает ряд исследователей, в Российской Федерации в последние годы регистрируется увеличение специфических поражений нервной системы среди всех форм сифилитической инфекции (Лосева О.К., 1999; Олисов А.О., Потекаев Н.С., Дударев А.Ф. и соавт., 1999; Бакулев А.Л., Колоколов О.В., Суворов А.П., 2002; Кулигин В.И., Селицкий Г.Д., Богуш П.Г. и соавт., 2003; Хамидов Ш.А., Валиханов У.А., Балтабаев М.К., 2004).

Одним из ведущих эпидемических факторов, определяющих значительный рост инфекций, передаваемых половым путём (ИППП), в России является активизация способов передачи инфекции (Навроцкий А.П., 1989; Яцуха М.В., Аковбян В.А., 1994; Лосева О.К., Нашхоев М.П., 1999). В реальной жизни это означает появление массивных контингентов лиц, занимающихся коммерческим сексом, гомосексуализмом, наркоманией. Однако это лишь одна из особенностей эпидемиологии сифилиса.

Общепринято, что распространение инфекционных заболеваний регулируется определёнными механизмами: свойствами возбудителя заболевания (вирулентность), иммунной структурой населения (восприимчивость к заболеванию), особенностями механизмов передачи возбудителя (активация, замедление, прекращение) (Лосева О.К., Нашхоев М.П., 1999). Вирулентность относится к фенотипическим характеристикам возбудителя инфекции и может изменяться в определённую сторону под влиянием различных факторов окружающей среды (например, условий культивирования). Патогенность микроба закреплена генетически. Попадая в восприимчивый организм человека, микроорганизм проявляет свою патогенность, которая реализуется в виде комплекса клинических симптомов, характерных для сифилитической инфекции (Лосева О.К., Доля О.В., Чиханатова А.Е., 1997; Гражданцева А.А., Сиволобова Г.Ф., Урманов И.Х., 1998; Ива-

нов В.М., Ломоносов К.М., Стенина М.А., 1998; D'Alessandro G., 1957; D'Alessandro G., Dardanoni L., 1958; D'Alessandro G., Del Carpio C.A., 1958).

В литературе высказываются предположения о том, что наблюдаемая периодизация колебаний заболеваемости сифилисом может быть связана с периодически изменяющейся солнечной активностью (11-14 лет), в результате чего происходят изменения или вирулентности микробов, или иммунного статуса популяции (Роуз Н.Р., 1989; Александров М.В., Пирятинская В.А., Соколовский В.В., 1997; Ометов В.К., Авилов Е.Н., Капустюк Л.П., 1998). В том числе изменения интенсивности магнитных и корпускулярных потоков, достигающих поверхности Земли, воздействуют на психоэмоциональный и соматический статус человека, нарушая его самочувствие и поведение, в том числе сексуальное (Чеботарев, 1999).

Другим важным фактором, способным оказать влияние на распространение сифилиса, является состояние восприимчивости организма, зависящее от иммунной структуры населения. Действительно, при распространении инфекций вначале происходит заражение наиболее восприимчивой части населения, и после периода «эпидемиологического насыщения» инфекционный процесс идёт на убыль (Бухарович А.М., 1989; Тургиев Б.С., 1995; Лузан Н.В., 1999). Однако высказывается также мнение (Тихонова Л.И., 1999), что в силу особенностей сифилитической инфекции, а также особенностей инфекционного иммунитета такая часть населения на самом деле не создаёт «иммунной прослойки», столь характерной для других эпидемий. Так, Г. А. Оксман и соавт. (1996) (Оксман Г.А., Смолковский К., Ноэл Дж., 1996; Крутских Е.С., Яцуха М.В., Шевченко А.А., 1998), моделируя эпидемическое распространение сифилитической инфекции, ввели поправку на иммунность свежееинфицированных лиц, удалив эту группу из числа восприимчивой популяции.

Состояние иммунного статуса организма является одним из существенных факторов патогенеза инфекционного заболевания и, в частности,

определяет основные клинические проявления болезни и объясняет полиморфизм клинических симптомов одного и того же заболевания у разных больных. Этот феномен достаточно изучен и установлен у больных хроническими дерматозами (Скрипкин Ю.К., Резайкина А.В., 1997).

Влияние механизмов передачи инфекций на их распространение может происходить путём активации, замедления или прекращения передачи возбудителя. Половой путь передачи инфекции является по своему уникальным, подверженным и зависящим от целого комплекса не только биологических, но и социальных факторов, а именно: в определённых социальных условиях активность механизма передачи и возможность его реализации могут резко возрасть.

С началом известных социально-экономических изменений в нашем обществе появился новый рынок – интимные услуги. Бесчисленные публикации в газетах предложений приятного досуга, эскорта, эротического массажа, открытая уличная и вокзальная проституция, легальное существование различных секс- и гей-клубов не оставляют сомнений в том, что интимные услуги представляют мощный организованный и криминальный бизнес (Калмыкова Т.Д., 1991; Шакиров М.Т., 1991; Чеботарев В.В., 1999). Количество проституток только в Москве насчитывает от 30 до 50 000. Таким образом, произошла резкая и качественно новая активация специфического механизма передачи возбудителя сифилиса и других инфекций, передающихся половым путём: появились и широко распространились социальные группы – проститутки, гомосексуалисты, наркоманы, для которых «нормой» интимной жизни являются частые половые связи с постоянной сменой половых партнёров. Произошло то, что в классической эпидемиологии определяется как «увеличение интенсивности взаимодействия популяций паразита и его хозяев, а также увеличение числа участвующих в системе элементов».

Реализация эпидемического распространения сифилиса в России происходит по следующей схеме. В эпицентре очага находятся так называемые ядерные группы – проститутки, геи, наркоманы. Именно здесь происходит «хранение» инфекции и «воспроизводство» больных. Следующий уровень – это пользователи (клиенты), которые включают бизнесменов, криминальные элементы, учащуюся молодёжь, лиц с бисексуальной ориентацией. И, наконец, третий уровень представлен их жёнами, мужьями, близкими, детьми, случайными знакомыми и т.д. (Аковбян В.А., Резайкина А.В., Тихонова Л.И., 1998).

Сеть государственных учреждений – кожно-венерологических диспансеров, женских консультаций, родильных домов, поликлиник и т. п. обслуживает контингенты третьего и частично второго уровней заболевших, тогда как эпицентр, т.е. наиболее опасные в эпидемическом плане «ядерные группы», остаются вне зоны досягаемости врачей-специалистов. Очевидно, что ни одна система здравоохранения не способна справиться с эпидемическим распространением сифилиса при отсутствии лечебно-профилактических мероприятий в группах высокого риска поведения. Организация лечебно-профилактической работы среди проституток, гомосексуалистов является весьма важной проблемой во всём мире. Об этом было заявлено на прошедшем в июле 1997г. в Риге под эгидой ВОЗ и программы UNAIDS межгосударственном совещании по проблемам ИППП в странах бывшего СССР.

Один из путей организации первичной и вторичной профилактики сифилиса среди проституток, гомосексуалистов и наркоманов является легализация проституции. В этом случае будет налажен учёт и регулярное медицинское освидетельствование проституток, в результате чего заболеваемость сифилисом среди них удастся взять под контроль. Решение о легализации проституции является весьма ответственным государственным

актом, непосредственно затрагивающим основные этические, моральные, национальные и религиозные устои общества.

Опыт многих стран мира свидетельствует о том, что работа среди проституток и гомосексуалистов должна проводиться постоянно, вне зависимости от решения государственных органов об их легализации. Поскольку и те, и другие избегают контактов с государственными лечебными организациями, данная работа должна проводиться общественными неправительственными организациями типа «Врачи без границ», «Журналисты против СПИД», «Мы и Вы», Ассоциация САНАМ и др. Учитывая их немногочисленность, отсутствие подготовленных специалистов, можно считать, что «ядерные группы» в России остались вне лечебного и профилактического надзора специалистов. Сохранение подобного положения в дальнейшем чревато продолжающимся распространением сифилиса и ВИЧ-инфекции, что в условиях нынешней социально-экономической нестабильности может принять характер национальной катастрофы.

Единые методы и принципы противоэпидемических мероприятий, направленных на борьбу с распространением сифилиса, принятые в России, постоянно совершенствуются и обогащаются новыми организационными формами (Щепеткова Т.В., 1990; Ладейщиков В.Е., 1996; Аковбян В.А., Резайкина А.В., Тихонова Л.И., 1998; Калмыкова Г.Н., 1998). Так, изучена возможность контроля, прогнозирования и управления эпидемическим процессом. Разработана компьютерная модель и её программная реализация для определения эпидемиологической ситуации в стране, прогноза уровня регистрации больных сифилисом до 2005 года и эффективности противоэпидемических мероприятий, направленных на снижение заболеваемости сифилисом в России (Оксман Г.А., Смолковский К., Ноэл Дж, 1996). Изучение деятельности лечебно-профилактических учреждений по активному выявлению больных сифилисом при всех видах профилактических медицинских осмотров выявило снижение этой работы с 80,7% в

1987г. до 61,9% в 1995 г., что привело к накоплению среди населения не-санированных больных сифилисом, продолжавших заражать партнёров, увеличивая число зарегистрированных больных, особенно с наиболее заразными первичными и вторичными свежими формами (Аковбян В.А., Резайкина А.В., Тихонова Л.И., 1998).

По материалам Ростовского кожно-венерологического диспансера, проведено изучение сезонности в распространении сифилиса (Ометов В.К., Авилов Е.Н., Капустюк Л.П., 1998). Используются динамические ряды интенсивных и экстенсивных показателей заболеваемости. Для измерения величин сезонного подъёма и его интенсивности использовали индекс и коэффициент сезонности, показатель сезонности подъёма. Установлено, что сезонность подъёма сифилиса отмечалась на протяжении 5 месяцев с августа по декабрь. Изучение сезонности представляет возможность более углублённого проведения мероприятий по эпидемиологическому контролю за сифилисом.

Среди молодёжи появилась значительная прослойка верующих. Среди больных сифилисом они составляют 17% (Бондаревский Я.И., 1999). Как правило, они знают и называют источник заражения и половые контакты. Формы работы с ними, организован, естественно, не через подписку-предупреждение, а через библейские каноны. Высказывается мнение (Прохоренков В.И., Шергин С.Н., Карачаева Ю.В., 1998), что следует привлечь духовенство, которое имеет сейчас широкие возможности для участия в духовном воспитании детей и формирования «здорового» стереотипа, т.к. воспитание в подростковом возрасте уже не даёт весомого эффекта за счёт сформировавшегося к этому периоду поведенческого менталитета.

Таким образом, современное состояние эпидемиологии сифилиса основано на главенствовании эпидемических факторов, определяющих распространение сифилиса, в первую очередь, активацию путей передачи инфекции, т.е. появление и широкое распространение проституции, гомо-



сексуализма, наркомании, причины которых заключаются в невысоком культурном уровне значительной массы населения, отсутствии моральных принципов, духовности, на фоне социально-экономического состояния России. Эти обстоятельства привели к возникновению эпидемии, начавшейся в нашей стране в последнее десятилетие минувшего века и продолжающейся поныне. Основным её источником послужили больные скрытым сифилисом (Потекаев Н.С., , Потекаев С.Н., 2002). Эта эпидемия по своим масштабам превосходит подъем заболеваемости сифилисом в 1963 и 1978 гг. В 1996 г. заболеваемость сифилисом была почти в 20 раз выше по сравнению с 1991 г. В.В. Чеботаревым и соавт. (Чеботарев В.В, Павлик Л.В., 1996; Чеботарев В.В, Павлик Л.В., Гуджиева О.Д., 1996; Чеботарев В.В, Павлик Л.В., Земцов М.А., 1996) показаны особенности эпидемии на примере Ставропольского края. Авторы установили преобладание манифестных форм над латентными; большое разнообразие вторичных сифилидов с нарастанием среди них везикулезных, пустулезных, симптома Пинкуса и других редких вариантов; частое поражение органов зрения и слуха; рост приобретенного сифилиса (бытового и при половом заражении) у детей и подростков и раннего врожденного сифилиса с активным проявлением и летальным исходом, случаи вторичного рецидивного сифилиса с отрицательными серологическими реакциями. Более частыми стали биполярные и экстрагенитальные шанкры.

### ***1.2. Методы лабораторной диагностики сифилиса.***

Открытие F. Schaudinn и E. Hoffman в 1905 г. возбудителя заболевания сифилисом и выделение Я. Г. Шершевским в 1910 г. его чистой культуры положили начало лабораторной диагностики сифилиса. В 1909 году Coles описал методику микроскопирования *Spirochaeta pallida* в тёмном поле, обратив особое внимание на подвижность микроорганизма. Данный метод используется в диагностике сифилиса и сегодня.

В связи с тем, что трепонемы практически не поддаются культивированию и не окрашиваются обычными лабораторными красителями, были разработаны иные лабораторные методы идентификации возбудителя на различных стадиях заболевания (Беднова В.Н., Лосева О.К., 1985; Дмитриев Г.А., Брагина Е.Е., 1996; Dische Z., 1930; Fromm G., 1954; Vaisman A., Hamelin A., 1958; Cristian C.L., De Simone A.R., Abrusso L., 1965; Deacon W.E., Hunter E.F., 1962; Fostrom L., 1967; Simon M., Milward F., Lefebvre R. et al., 1992). Эти исследования можно разделить на четыре категории: 1) Прямое микроскопическое исследование при наличии видимых повреждений; 2) Серологические нетрепонемные тесты, используемые в скрининговых целях; 3) Серологические трепонемные тесты, являющиеся подтверждающими исследованиями; 4) Тесты прямого обнаружения антигена, в настоящее время используемые в качестве Золотого Стандарта при испытаниях новых тестов в исследовательских целях.

В лабораторной диагностике сифилиса ведущее место занимает серодиагностика (Дмитриев Г.А., 1996; Дмитриев Г.А., Брагина Е.Е., 1996; Пожарская В.О., 1996; Cannefax C.R., Garson W., 1957; Faure M., Pillot J., 1960; Doniach A., 1976; Pucilow K., Zajac W., 1980; Bernard Ph., Souyri N., Bonnetbanc G.M., 1984; Hardi P.H., 1985; Farshy C.E., Hunter E.F., Pope V. et al., 1986; Kell P.D., Barton S.T., Sammerbell C.D., 1991; Bolensen E., Abecht S., Benche W. et al., 1993; Sevars A.H., Schasfoort R.V., Salden M.H., 1993). В нашей стране согласно Приказу Минздрава № 87 от 26.03.2001 г. «О совершенствовании серологической диагностики сифилиса», используются микрореакция преципитации (МР) с кардиолипидным антигеном, метод иммуноферментного анализа (ИФА) - как скрининговые, реакция связывания комплемента (РСК) с трепонемным и кардиолипидным антигенами - диагностический тест; реакция иммобилизации бледных трепонем (РИТ) и реакция иммунофлуоресценции (РИФ) – специфические тесты.

История специфической диагностики сифилиса фактически уходит к началу 20-го века, когда независимо друг от друга отечественные и зарубежные исследователи отметили феномен снижения подвижности бледных трепонем под влиянием сыворотки крови больных сифилисом. Это привело к созданию в 1949 году серологического теста – реакции иммобилизации бледных трепонем (РИТ) для обнаружения специфических антител в организме больных сифилисом. Были предприняты многочисленные попытки стандартизации и упрощения этой реакции (Дмитриев Г.А., Брагина Е.Е., 1996; Дмитриев Г.А., 1996; Goodhort G.L., 1983). Вместе с тем, трудности приготовления препарата, высокая стоимость исследования, необходимость привлечения квалифицированных специалистов значительно ограничили применение РИТ в широкой практике. Кроме того, РИТ, как показано многочисленными авторами (Назарова П.Г., Старченко Е.В., Касаткин Е.В. и др. 1996; Разнатовский А.М., Соколовский Е.В., Красносельских Т.В., 1996; Соколовский Е.В., 1996; Короткий Н.Г., Маркин И.Я., 1997; Цераиди Н.Ф., Мажников А.Г., Коротков Н.В., 1998), долгое время остаётся положительной после окончания адекватной терапии, недостаточно чувствительна при ликвородиагностике сифилиса и в настоящее время используется главным образом при сомнительных результатах других тестов в качестве дополнительного.

В последние годы в России разработана и внедрена в практику РПГА (Дмитриев Г.А., 1996; Дмитриев Г.А., АكوповаЗ.П., 1997; Иванов О.Л., Ломоносов К.М., Стенина М.А., 1998). По сравнению с РИТ и РИФ, она довольно проста в постановке, даёт возможность в течение нескольких часов получить результат, не требует дополнительного оборудования и высокой профессиональной подготовки. РПГА, по мнению исследователей (Ким Э.Г., 1992; Миракян М.Е., Бабаян К.Р., 1998), даёт высокий процент совпадений с РИФ-абс и РИТ, но обладает меньшей специфичностью (Тимченко Г.Ф., 1991; Сидорова Е.В., Ляхов В.Ф., 1995; Аكوпова З.П.,

2000; Фриго Н.В., Комарова В.Д., Обрядина А.П. и соавт., 2000). Имеются сообщения (Тимченко Г.Ф., 1991) о высокой чувствительности РПГА, а также о том, что РПГА становится положительной также рано, как и РИФ. Отмечена важность использования РПГА при нейросифилисе (Миракян М.Е., Бабаян К.Ф., 1998). Однако следует учитывать, что РПГА недостаточно чувствительна при установлении излеченности: положительные результаты регистрируются в отсутствии клинических проявлений сифилиса и при отрицательных результатах КСР.

Неотъемлемой составной частью комплекса серологических исследований на сифилис является реакция микропреципитации или метод микроагглютинации с использованием кардиолипинового антигена (МР, МРП). История создания антигена началась в 40-х годах, когда удалось установить качественный состав действующей субстанции – фосфолипида, а также лецитина и холестерина, способствующих основному компоненту участвовать в реакции. Многолетние исследования отечественных и зарубежных учёных позволили удалить балластные липиды из антигена, снижающие чувствительность и специфичность теста, создать определённые молярные соотношения компонентов кардиолипина, т.е. стандартизировать антиген (Патрушева Н.Б., Рогачей Л.Н., Дегтярева Г.И. и др., 1997). Эта реакция в настоящее время в тех или иных модификациях широко используется во всём мире в качестве отборочной, неспецифической для диагностики сифилиса (Родионов А.Н., 1977; Милич М.В., Антоньев А.А., Блохин Б.А. и соавт., 1983; Дьяченко Л.А., Оловянишников Л.В., 1988; Скрипкин Ю.К., Курбанова А.А., Шарапова Г.Я. и соавт., 1999; Сивак В.В., Чеботарев В.В., Чеботарева Н.В., 2003 и др.).

Однако, как показал ряд исследований, при использовании МР могут быть как ложноотрицательные результаты, особенно у больных с ранним и латентными формами сифилиса (Милич М.В., Антоньев А.А., Блохин Б.А., 1983; Дмитриев Г.А., Галишников Ю.А., Зверева Н.С., 2000), так

и ложноположительные, обусловленные образованием реактинов вследствие разных причин, так называемые «биологические ложноположительные реакции» (Шинский Т.Э., Протоколова Н.Е., Юминова В.В. и соавт., 1983). Ложноположительные результаты серологических реакций на сифилис можно объяснить присутствием в организме возбудителей, имеющих с бледной трепонемой общие антигены (в числе заболеваний - трепанематозы, лептоспироз, возвратный тиф, туберкулез, лепра) (Лямперт И.М., 1972; Милич М.В., 1984; Овчинников Н.М., Беднова В.Н., Дилекторский В.В., 1987; Фриго Н.В., 2001). Ложноположительные результаты встречаются и при изменении липидного и глобулинового обмена, а также при коллагенозах, эндокардитах, инфарктах миокарда и мозга, онкологических заболеваниях, малярии, гепатитах (Ивашкин Т.В., Буеверов А.О., 2001; Фриго Н.В., 2001; Афонин А.В., Молочков В.А., Буеверов А.Л., 2003).

В настоящее время появилось много сообщений об использовании латексов в качестве матриц для приготовления иммунореагентов (Fitzgerald T.J., 1992; Farshy C.E, Hunter E.F., Pope V. et al., 1986). По мнению Ю. В. Лукина (1986), метод латексной агглютинации с использованием окрашенных полиакролеиновых латексов не уступает по чувствительности и наглядности методу гемагглютинации и иммуноферментному анализу. Химические свойства латексных носителей относительно постоянны и поддаются более легкой характеристике по сравнению с поверхностными свойствами наружной мембраны эритроцитов, которые широко варьируют в зависимости от источника выделения. Поэтому латексные микроносители обеспечивают более воспроизводимые результаты по сравнению с эритроцитарными носителями и могут с успехом заменять их в этом иммуноанализе.

Зарубежные тест-системы для экспресс диагностики сифилиса используют в ряде случаев покрытые антигеном латексные частицы (ВДРЛ-латекс – «Санофи» (Франция), RPR-«Human» (Германия), «Organon Tech-

nik” (Голландия) и др., причём иногда применяются цветные латексы, облегчающие учёт результатов реакции. Для получения таких диагностикумов используют полистироловый латекс, несущий на своей поверхности карбоксильные группы. В составе носителя всегда имеется определённое количество ионных или неионных детергентов, гидрофильные группы которых вместе с карбоксильными группами латекса создают общий поверхностный заряд, благодаря чему гранулы латекса спонтанно не агглютинируются. Полиакролеиновый латекс содержит на своей поверхности альдегидные группы, способные вступать в реакцию с первичными аминогруппами, образуя основание Шиффа. В состав полиакролеинового латекса нет необходимости добавлять детергенты, так как однородность суспензии обеспечивается его природой (Воробьева З.Г., Фокина Е.Н., 1992). Реакции с кардиолипидным антигеном при условии строгой стандартизации и контроля препаратов весьма чувствительны, просты в исполнении, занимают считанные минуты, не требуют дорогостоящего оборудования и квалифицированного персонала.

Обширные исследования по изучению диагностической ценности РИФ при сифилитической инфекции проводились неоднократно (Беднова В.Н., 1987; Овчинников Н.М., Беднова В.Н., Делекторский В.В., 1987; Беднова А.Н., Коляденко В.Г., Павлова Е.В., 1992; Дмитриев Г.А., Брагина Е.Е., 1996; Прокопов Н.И., 1996; Petersen C.S., Pedersen N.S., Axelsen N.H., 1982; Oranne G., D’Hallwyn M.A., Larsen S.A., 1993). Были изучены – различные модификации РИФ и установлена высокая чувствительность и специфичность теста практически при всех формах сифилиса (Беднова В.Н., Коляденко В.Г., Павлова Е.В., 1992; Прокопов Н.И., 1996; Beebe G.L., Nouri N.G., 1984; Ito F., Hunter E.F., George R.W. et al., 1992). Вместе с тем, возможность РИФ как и любого серологического теста ограничена: она не может служить критерием излеченности, после полноценной терапии, при негативации стандартного комплекса серореакций (КСР) длительное время

может оставаться положительной из-за наличия в крови специфических иммуноглобулинов класса G (Дмитриев Г.А., 1996). Наибольшую сложность представляет диагностика врождённого сифилиса, которая основывается на обнаружении в крови ребёнка, рождённого от матери, болевшей во время беременности сифилисом, специфических Ig M, так как именно этот глобулин в отличие от других проникает через плаценту и свидетельствует об инфицированности (Красносельских Т.В., 1998). За рубежом (Sanofi diagnostiks Paster, France) пошли по пути создания так называемой тест-системы для РИФ – «Сифилам», основанной на методе непрямой иммунофлуоресценции: специфические антитела, присутствующие в сыворотке пациента, заражённого бледной трепонемой, связываются антигеном и визуализируются при флуоресцентном микроскопировании при добавлении меченого флюоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ) античеловеческого глобулина (анти-Ig G, Ig A, Ig M) (Lefevre G.C., Prere M.F., Abbal M. et al., 1983; Paris-Hamelin A., Loupy G., Vaisman A. et al., 1985; Van der Sluis J.J., Van Reede E.C., Boer M., 1986). Во избежании перекрёстной реакции антителами, вырабатываемыми к непатогенным трепонемам, сыворотка истощается обработанным ультразвуком гомогенатом трепонем штамма Рейтер, неспецифические антитела элиминируются, что значительно повышает специфичность результата (Санофи, 1999). В работе О.В.Пожарской (1998) приводятся данные по применению сорбента, полученного из содержимого цитоплазматического цилиндра культуральных бледных трепонем, при постановке РИФ-абс на сифилис. Приготовленный антиген из клеточных структур культуральных бледных трепонем применялся также в РСК и ИФА.

В последние два десятилетия за рубежом и в России разработаны методики постановки иммуноферментного анализа, который является специфическим тестом на сифилис (Котровский А.В., 1986; Бабий А.В., 1990; Беднова В.Н., Дмитриев Г.А., Бабий А.В. и др., 1994; Беднова В.Н., Дмит-

риев Г.А., Бабий А.В., 1995; Сидорова Е.В., Ляхов В.Ф., 1995; Сафронова А.В., Маликов В.Е., Бурова А.А. и соавт., 1999; Серегин С.В., Белавин П.Б., Бабкина И.И., 2000; Farchy C.E., Hunter E.F., Larsen D.A. et al., 1984; Byrne R.E., Laska S., Bell M. et al., 1992). Метод ИФА – высокочувствителен и специфичен, он рекомендуется для диагностики всех форм сифилиса и распознавания ложноположительных результатов, полученных в других серологических тестах (Дмитриев Г.А., Галишников Ю.А., Зверева Н.С., 2000; Фриго Н.В., Комарова В.Д., Обрядина А.П., 2000; Morrison-Plunier T., Alderte Y.F., Basemon J.B., 1983; Lee Y.B., Farshy C.E., Hunter E.F. et al., 1986; Gasponi A., Nedosant R.P., Fosti A. et al., 1988; Silletti R.P., 1995). Преимуществом ИФА является то, что будучи специфической реакцией, он с успехом может использоваться и как скрининг-тест при массовых обследованиях на сифилис благодаря возможности автоматизации постановки и учёта результатов реакции (Овчинников Н.М., Беднова В.Н., Делекторский В.В., 1987; Van der Sluis J.J., 1992; Larsen S.A., Steiner B.M., Rudolph A.N., 1995). Впервые сифилитические антитела в иммуноферментном анализе были определены в 1975 г. I. Veldcamp, A. Visser фиксировали обработанный ультразвуком антиген из патогенных бледных трепонем на поверхности полистирола и применяли антивидовой конъюгат, меченный щелочной фосфатазой (Овчинников Н.М., Беднова В.Н., Делекторский В.В., 1987). В России ИФА в диагностике сифилиса начали использовать в 1982 г. (Котровский А.Ф., Беднова В.Н., 1982). Широкое применение ИФА стало возможным в 1986 году после разработки тест-системы ИФА с целью дифференцирования ложноположительных результатов, полученных в стандартных серологических реакциях на сифилис, при профилактическом освидетельствовании на сифилис больших групп населения. Оценка эффективности применения ИФА показала, что в 7,2% случаев он является более чувствительным методом по сравнению с РИТ.



При наличии в анамнезе диагноза сифилиса 2-5 летней давности в 1,54 % случаев были обнаружены положительные результаты в ИФА, в то время как результаты РИФ были отрицательные (Ометов В.К., Маргуль М.П., Уразовская Е.В. и др., 1997). Отрицательные результаты ИФА при положительной РИФ регистрировали в 1,04% случаев при туберкулёзе, онкологических заболеваниях, беременности, у больных травматологических и психоневрологических отделений (Paris-Hamellin A., Loupy G., Vaisman A. et al., 1985; Stienstra S. Peeters T., Von der Straaten A.M. et al., 1992; Young H., Moyes A., Millan A. et al., 1992; Nayar R., Campos J.M., 1993), что подтверждает большую чувствительность и специфичность ИФА по сравнению с РИФ и тем более с РИТ, указывая на возможность расширения использования этого теста в серодиагностике сифилиса. Ведущими специалистами в области серологической диагностики сифилиса в России высказывается мнение о возможности замены общепринятого комплекса серологических реакций (КСР) комплексом ИФА с РМП (Киселева Г.А., Беднова В.Н., Дмитриев Г.А., 1998). В этой связи совершенствование этих реакций приобретает особую значимость.

С развитием молекулярных методик, новые, потенциально более чувствительные тесты появились как дополнение к существующей диагностике сифилиса (Фриго Н.Ф., 1997; Фриго Н.Ф., Главинская Т.А., Комарова В.Д., 1998; Молочков В.А., Кириченко И.М., 2004). Так, ПЦР может иметь огромное значение при диагностике врождённого сифилиса (пассивно передающиеся антитела мешают диагностике), нейросифилиса (единственный на сегодняшний день серологический метод имеет чувствительность 50%), раннего первичного сифилиса (в настоящее время доступен только метод микроскопирования) и, наконец, при различении новой инфекции от старой (Суханов Е.С., Сметанина С.Е., Максимов А.А., 1998; Гребенников В.А., Жаров Л.В., Ометов В.К., 1999). Однако при ПЦР невозможно дифференцировать небольшое число жизнеспособных персисти-

рующих трепонем от погибших микроорганизмов, ДНК которых может быть амплифицирована (Короткий Н.Г., Чиненова Е.Г., 1998; Рассказов, 1998).

Результаты исследований в области серодиагностики сифилиса на данный период проанализированы в целом ряде работ как отечественных (Беднова В.Н., Лосева О.К., 1985; Батыршин Р.Ф., 1993; Дмитриев Г.А., Брагина Е.Е., 1996; Каральник Б.В., Денисова Т.Г., Кешилева З.Б., 1999; Сухова Л.П., Машеро В.В., Войнова Н.Н., 1999; Воробьёва З.Г., Блинова Т.В., Бурков А.Н., 2000; Ломоносов К.М., 2002; Сивак В.В., Чеботарев В.В., Чеботарева Н.В., 2003; Петришина С.В., 2004 и др. ), так и зарубежных авторов (Balic-Winter A., Kansky A., 1985; Alderete G.T., Freeman-Shade L., Baseman G., 1985; Backhouse J.L., Hudson B.J., 1995; Larsen S.A., Steiner B.M., Rudolph A.H., 1995; Young H., 1998; Augenbraun M., Rolfs E., Johnson R., 1998; Egglestone S.I., Turner A.J.L., 2004). Полученные данные позволили, с одной стороны, определить комплекс диагностических тестов, предназначенных для массовых обследований на сифилис и диагностики различных клинических форм сифилитической инфекции, а, с другой стороны, обеспечить повышение чувствительности и специфичности за счёт их усовершенствования. В то же время, как указывают многие авторы (Овчинников В.М., Беднова В.Н., Делекторский В.В., 1987), нельзя признать удовлетворительным решение целого ряда проблем серодиагностики сифилиса, в частности, проблемы значительного количества ложноположительных реакций на сифилис с сыворотками крови людей, свободных от сифилитической инфекции, и недостаточной эффективности диагностики ранних и поздних форм заболевания сифилисом. Причины неспецифически положительных реакций с сыворотками крови лиц, свободных от сифилиса, при использовании как неспецифического кардиолипинового, так и специфических трепонемных антигенов проанализированы в работе К.К. Борисенко, В.Н. Бедновой (1990). Показано, что перспективным

направлением для уменьшения числа ложноположительных реакций на сифилис является повышение специфичности диагностических тест-систем, используемых в серологических тестах, а для уменьшения числа ложноотрицательных результатов необходимо повысить чувствительность диагностикумов.

Актуальность дальнейшего проведения исследований в данном направлении подтверждается также результатами работ (Grob J.J., Bonerand Y.J., 1986; Horvath I., Puskas E. Et al., 1994; Vila P., Hernarder M.C., Lopez-Fernandes M.F. et al, 1994), где показано, что значительное число неспецифически положительных результатов реакций с кардиолипином связано с наличием у обследуемых лиц аутоиммунных заболеваний, число которых за последние годы имеет тенденцию к возрастанию. Анализ использования различных трепонемных антигенов в практике серодиагностики сифилиса показывает, что специфическим тестам, обладающим высокой диагностической ценностью, присущи высокие техническая сложность и стоимость их обеспечения (РИФ-абс, ИФА и др.). Более дешевые и менее сложные в техническом обеспечении серологические тесты на сифилис (РСК, РПГА) обладают и меньшей диагностической ценностью.

В качестве одного из направлений совершенствования серодиагностики сифилиса является выделение основных трепонемных антигенов и их характеристики (D'Alessandro G., Oddo F.G., 1946; D'Alessandro G., Oddo F.G., Dardanoni L., 1950; D'Alessandro G., Zaffiro P., 1962; Bailey M.G., Penn C.N., Cockayne A., 1985; Berg R.W., Duncan W.P., Thornton C.G., 1972; Christiansen A.H., 1967; Antoni G., Dal Maso G., Berti B., 1996).

В данном направлении известны проведённые В.О. Пожарской (1986, 1995,) исследования функциональных свойств клеточных структур культуральных бледных трепонем и использование их при производственном выпуске новых диагностических препаратов на сифилис.

В ряде работ изучены биополимеры с различной молекулярной массой, выделенные из фибрилл (Hardi P.H., Fredediricks W.R., Nell E.E., 1975; Wachter M.S., Johnson R.S., 1976; Petersen C.S., Pedersen N.S., Axelsen N.H., 1981) и наружной оболочки (Cox D.L., 1994; Cox D.L., Akins D.P., Porcella S.F. et al, 1995; Radolf J.D., 1995; Radolf J.D., Robinson E.J., Burell K.W. et al., 1995; Antoni G., Dal Maso G., Berti B. et al., 1996) патогенных трепонем. Полученные данные подтвердили высокую антигенность выделенных фракций и перспективность их применения для серодиагностики сифилиса.

Высокая специфичность таких тест-систем, как ИФА, выпускаемых НПО «Рекомби-Бест», обеспечивается за счёт использования в качестве антигена рекомбинантных белков, представляющих мембранный протеин бледной трепонемы. Известно, что липопротеины обуславливают неспецифические реакции, поэтому использование очищенных белковых антигенов является перспективным методом молекулярной биологии, но достаточно трудоёмким и дорогостоящим (Серегин С.А., Белавин П.Б., Бабкина С.Г., 2000).

Успешное решение задачи совершенствования экспрессных методов лабораторной диагностики сифилиса, а также определение перспективных направлений их использования во многом зависит от выбранного научно-методического подхода к объекту исследования.

### ***1.3. Использование коллоидного серебра в конструировании диагностических тест-систем***

Коллоидное серебро является активным катализатором и способно инициировать большое число индикаторных каталитических реакций (Крейнгольд С.У., 1983; Мюллер М. и др., 1983), пригодных для выявления следовых количеств золь. Особо привлекают каталитические реакции восстановления металлов из их растворимых солей. Такие реакции используются в аналитической химии (Файгл Ф., Ангер В., 1976; Мюллер

М. и др. 1983), фотографии (Джеймс Х., 1980), при химической металлизации пластмасс (Шалкаускас М.И., Вашкялис А.Д., 1977) и производстве зеркал (Винокуров В.М., 1950). Сущность их заключается в образовании слоя металла в результате химической реакции, протекающей преимущественно на каталитически активной поверхности, в частности, на поверхности, сенсibilизированной серебром. Эти реакции отличаются очень высокой чувствительностью. Необходимым является автокаталитический характер реакции восстановления. Это обеспечивает как преимущественное осаждение металла на связанный с маркером участок поверхности, так и получение на нем покрытия необходимой толщины. В отсутствие катализа реакция либо не протекает, либо протекает во всем объеме раствора и приводит к выпадению не связанного с поверхностью порошкообразного металла.

Наиболее доступным и надежным способом получения высокодисперсных зольей серебра считается конденсационный, основанный на химическом восстановлении металла из его растворимых солей. Обычно при получении зольей серебра, применяемых в медицинских и химических целях, металл восстанавливают в присутствии защитных коллоидов, белка, полисахаридов или синтетических полимеров (Джеймс Х., 1980; Родионов П.П., Третьяков В.В., 1992). При этом одновременно происходит зародышеобразование, конденсация частиц металлического серебра и блокирование их поверхности защитным полимером, препятствующим дальнейшему росту металлических ядер и стабилизирующим золь (Джеймс, 1980). Однако такой подход не может быть использован для получения золя маркера, поскольку в дальнейшем маркер необходимо сорбционно связать с иммунореагентом, а блокированная поверхность зольей теряет адсорбирующие свойства.

Анализ структур частиц зольей провел А.Г.Полтавченко и соавт. (1998) в соответствии с теорией малоуглового рентгеновского рассеяния

(Свергун Д.И., Фейгин Л.А., 1988). Малоугловые рентгенограммы измеряли на дифрактометре фирмы «Siemens» (Германия) при длине волны используемого излучения 0,154 нм и температуре образцов 18 °С. Известно, что агрегативная устойчивость золя обеспечивается прежде всего наличием на поверхности дисперсных частиц двойных электрических слоев (Лабораторные работы ..., 1986). В основе мицеллы лежит нерастворимый в данной дисперсионной среде агрегат, состоящий из множества атомов серебра. Поверхность агрегата может заряжаться, благодаря избирательной адсорбции ионов из дисперсионной среды или диссоциации молекул в поверхностном слое агрегата. Частица металла с адсорбированными на ней потенциалопределяющими ионами составляет ядро мицеллы. Заряд ядра компенсируется эквивалентным зарядом противоположно заряженных ионов, расположенных в виде двух слоев – адсорбционного и диффузного в объеме среды.

Установлено, что высокодисперсные иммунозоли серебра могут быть использованы в качестве метки специфических реагентов при постановке иммунокаталитического анализа на микротитровальных планшетах (Полтавченко А.Г. с соавт., 1998, 2002).

Несмотря на известные достоинства указанных меток, примеры их систематического применения в микробиологической практике и конкретно - в твердофазных диагностических тест-системах пока, к сожалению, немногочисленны. Это обстоятельство обусловлено прежде всего недостаточной развитостью методологии иммуноанализа с применением коллоидных металлов, хотя потребность в создании новых биомаркеров на основе перспективных зондов, удовлетворяющих запросам исследовательской и клинической практики в области диагностики инфекционных заболеваний, в том числе и сифилиса, велика.

## СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

#### 2.1. Штаммы микроорганизмов, взятые в работу

При выполнении работы были использованы штаммы культуральных бледных трепонем, представители трех иммунологических групп по классификации Р.Р.Гельтцера и Л.В. Зебницкой: I группа – IX штамм «Ставрополь»; II группа – VII и VIII штамм (штаммы выделены из крови больных вторичным активным сифилисом Л.И.Тутовой под руководством Р.Р.Гельтцера (1947, 1949, 1950); III группа – V штамм «Казань», выделенный З.Х. Каримовой и Г.Г. Кондратьевым (1941); патогенные трепонемы – штамм Никольса и непатогенные трепонемы – *T.phagedenis* (штамм Рейтер). Характеристика штаммов микроорганизмов представлена в таблице 1.

#### 2.2. Питательные среды

Для выращивания трепонем использовали печеночную питательную среду (ППС) (Гельтцер, 1936); пептонный бульон из бычьих сердец (ПББС) (Овчинников, Резникова, Сагдеева, 1970); тиогликолевую среду (Сержантова, 1979)

#### 2.3. Основные химические реактивы и биологическое сырье

Биологическое сырье и основные химические реактивы, использованные при проведении исследований, представлены в таблице 2.

#### 2.4. Аппаратное оснащение исследований

При выполнении экспериментальных работ использовано следующее оборудование и аппаратура:

- иономер универсальный рН-150 (завод измерительных приборов, г. Гомель, Белоруссия);
- мешалка магнитная ММ-5 (завод комплектных лабораторий, г. Мукачево, Украина);

**Таблица 1. Характеристика штаммов микроорганизмов, использованных в работе**

№ № пп	Наименование микроорганизмов и обозначение штамма	Характеристика штаммов			
		иммунологическая группа	морфологические и тинкториальные свойства	культуральные свойства	биохимические свойства
1.	<b>Treponema pallidum</b> (подвид pallidum)	III	Спиральные палочки длиной 5-20 мкм, толщиной 0,09-0,05 мкм, образующие тугозакрученные правильные или неправильные спирали. Грамотрицательные, хорошо окрашиваются методом интеграции серебром по Морозову, плохо окрашиваются по методу Романовского-Гимза в бледно-розовый цвет.	Факультативные анаэробы. Растут на МПБ или печеночном бульоне с добавлением кусочков печени или яичек кролика. Можно использовать бульон из бычьего сердца с тиогликонатом Na. Посевы инкубируют в относительно анаэробных условиях при температуре 35 <sup>0</sup> С. На плотных питательных средах на 3-5 день культивирования появляются мелкие колонии	Метаболизм бродильный
	V штамм «Казань»				Не образует индол, H <sub>2</sub> S
2.	VII штамм «Ставрополь»	II			Образует индол , H <sub>2</sub> S
3.	VIII штамм «Ставрополь»	II			Образует индол, H <sub>2</sub> S; разлагает глюкозу, галактозу, сахарозу, мальтозу, манит с образованием кислоты
4.	IX штамм «Ставрополь»	I			Образует индол, H <sub>2</sub> S, разлагает глюкозу
5.	Nichols				
6.	<b>Treponema phagedenis</b> , биотип Reiter		-<<-	-<<-	Образует индол H <sub>2</sub> S (не постоянно), сбраживает глюкозу, лактозу, фруктозу, маннит



**Таблица 2. Химические реактивы, использованные при выполнении исследований**

№ п/п	Наименование сырья и материалов	ГОСТ или ТУ	Квалификация	Основной показатель, определяющий качество сырья (% содержания основных веществ, активность и др.)	Примечание
1	2	3	4	5	6
1.	Азид натрия	импортный			«Fluca», США
2.	Акриламид	импортный	ч		«Реанал», Венгрия
3.	Акролар К	импортный			НИИ Биоорганической химии им. Шемякина, г.Москва
4.	Альбумин бычий сывороточный	ТУ 09-10-342-75	марка А		НПО «Аллерген», Ставрополь
5.	Амидол	ТУ609-3061-73	ч	98,5	«Реахим» Шосткинский завод химреактивов, Украина
6.	Аммония персульфат	импортный	чда	99,0	«Реанал», Венгрия
7.	Аммоний сернокислый	ГОСТ 3769-78	чда	99,0	Каталог хим.реактивов и высокотоксичных хим. веществ, М., Химия, 1990
8.	Боргидрид натрия	ТУ9145-172-4731-297-94	ч	98,5	«Лаверна», Москва
9.	Вода дистиллированная	ГОСТ 6709-72		pH 5,4-6,6 Уд. электропроводность не более 5-10 см/м	ЛПС, СтавНИПЧИ, Ставрополь
10.	Глицинфото	ТУ 609-3525-74	ч		«Реахим» Шосткинский завод химреактивов, Украина

*Продолжение таблицы 2*

1	2	3	4	5	6
11.	Гидрохинон	Из набора «Проявитель УП-5»			«Реахим» Шосткинский завод химреактивов, Украина
12.	Железо треххлорное	ГОСТ 4177-74	чда	99,9	-«-
13.	Калий	ГОСТ 4139-88	чда	99,0	-«-
14.	Калий фосфорнокислый двузамещенный	ТУ 6-09-5324-87	чда	98	«Реахим» Шосткинский завод химреактивов, Украина
15.	Калий бромистый	Из набора «Проявитель УП-5»-			-«-
16.	Калий фосфорнокислый однозамещенный	ГОСТ 4198-75	хч	99,5	-«-
17.	Метол	Из набора «Проявитель УП-5»			-«-
18.	$N_1N_1^1$ – метилен-бис-акриламид	импортный			«Реанал», Венгрия
19.	$N_1 N_1 N_1^1 N_1$ – тетраметил-этилен-диамин	импортный			-«-
20.	Натрий фосфорнокислый двузамещенный	ГОСТ 11773-76	чда	99,0	«Реахим» Шосткинский завод химреактивов, Украина
21.	Натрий фосфорнокислый однозамещенный	ГОСТ 245-76	чда	99,0	-«-
22.	Натрий хлористый	ГОСТ 4233-77	чда	99,9	-«-
23.	Нитроцеллюлозные мембраны	импортные	0,45 мм		«Sigma», США
24.	Реактив Несслера	ТУ 6-09-2-89-77	чда		Каталог хим.реактивов
25.	Полиэтиленгликоль (ПЭГ-6000)	импортный			«Serva», Германия

*Продолжение таблицы 2*

1	2	3	4	5	6
26.	Серебро азотнокислое	ГОСТ 1277-75	чда	99,8	Свердловский завод химреактивов
27.	Сода кальционированная	Из набора «Проявитель УП-5»			«Реахим» Шосткинский завод химреактивов, Украина
28.	Сефадекс G-100	импортный			«Sigma», США
29.	Спирт этиловый ректификат	ГОСТ 51625-00	Rect.20-5	96-96,5	Ставропольский ликеро-водочный завод
30.	Сульфат натрия безводный	Из набора «Проявитель УП-5»			«Реахим» Шосткинский завод химреактивов, Украина
31.	N,N,N,N-тетраэтил- метил- лендиамин (ТЭМЭД)	Импортный			«Serva», Германия
32.	Цетавлон (цетилтриметил- ламмонийбромид	Импортный			«Sigma», США

- термостат электрический суховоздушный ТС-80м (Одесское ПО лабораторной медицинской техники «Медлаборатортехника», Украина);
- микроскоп биологический «Биолам Р1» (ЛОМО, г. Санкт-Петербург);
- морозильное устройство НС-280/75 («Фригера», национальное предприятие Колин, Чехословакия);
- холодильник бытовой (Московское ПО ЗИЛ);
- установка для сублимационной сушки ТГ-5 (г. Дрезден, Германия);
- весы технические ВСМ-20 (г.Нижний Тагил);
- весы электронные Sartorius (Германия);
- центрифуга лабораторная К-24 (Германия);
- спектрофотомер СФ-26 (ЛОМО, г.Санкт-Петербург);
- прибор для встряхивания и инкубирования планшет Thermoshaker ST (Литва);
- регистрирующий спектрофотометр Multiskan (LKB, Швеция);
- хроматографическая система «Minicoldlab» (LKB, Швеция)

## **2.5. Материалы, полученные из клиник**

Клинико-лабораторные исследования проводили с 686 сыворотками больных различными формами сифилиса и 237 – людей контрольной группы (беременные, доноры, больные гонореей, кожные, терапевтические, онкологические и инфекционные больные). Сыворотки крови больных сифилисом разделены по формам заболевания, а контрольной группы – по объединяющим признакам.

При анализе сложных для диагностики случаев с целью уточнения окончательного диагноза заболевания было изучено 65 историй болезней и амбулаторных карт больных сифилисом.

## **2.6. МИБП и биологические препараты**

Акролар К – НИИ Биоорганической химии им. Шемякина, г.Москва.

Антиген трепонемный ультразвуоченный сухой (УЗТА) – ФГУП «Аллерген», г.Ставрополь.

Антиген кардиолипиновый – «Биолек», г.Харьков, Украина.

Люис– РПГА–тест – «Ниармедик плюс», г.Москва.

Иммуноглобулины диагностические трепонемные люминесцирующие – «Bio-Rad», Франция.

Полный адъювант Фрейнда (ПАФ) – «Calbiochem», США.

Тест-система диагностическая люис – антипаллидум для ИФА – «Бест», Новосибирск.

Тималин – завод медицинских препаратов, АО «Самсон», Санкт-Петербург.

## **2.7. Лабораторные животные, использованные в опытах**

В работе использовали 10 здоровых кроликов породы “Шиншилла”, весом 2,5-3 кг из питомника СтавНИПЧИ.

В процессе содержания животных поддерживали рекомендуемый режим питания согласно приказу № 1179 (М., 1983).

Все процедуры по экспериментальным животным, включая эвтаназию, проводили согласно рекомендациям В.В.Карпенко, В.И.Сачкова (1985), С.А. Куфлиной, Т.Н.Павловой (1985).

## **2.8. Физико-химические и иммунологические методы**

Количественное определение белка проводили по методу O.Warburg и W.Christian (1941) сравнением показаний поглощения белка при 280 и 260 нм на спектрофотометре СФ-46 (Практическая химия белка, 1989).

Гельфильтрацию проводили на хроматографической установке «Minicoldlab» (LKB, Швеция).

Золь серебра готовили в соответствии с рекомендациями А.Г.Полтавченко (1998).

Комплексирование частиц серебра с иммунным реагентом (антигеном) проводили по методикам I.Raska (1988), А.Г.Полтавченко (1998).

## **2.9. Сублимация МИБП**

Лиофилизацию антигенов, диагностических препаратов проводили в камере TG-5 (Германия). Жидкие препараты разливали в ампулы ШПВ-6 по 0,5-1 мл, замораживали в низкотемпературном столе типа NZ-280/75 при температуре минус  $(45 \pm 5) ^\circ\text{C}$  в течение 24 часов и и лиофилизировали.

## **2.10. Статистическая обработка материала**

Экспериментальные данные были обработаны методами вариационной статистики, изложенными в работах И.П.Ашмарина и А.А.Воробьева (1962), В.Ю. Урбах (1975), П.И.Сызранцева (1938).

### **Глава 3. СИФИЛИС В РЕСПУБЛИКЕ СЕВЕРНАЯ ОСЕТИЯ-АЛАНИЯ**

Республика Северная Осетия-Алания (РСО-А) является регионом, где наряду с общероссийскими проблемами (увеличение числа социально неадаптированных лиц, более раннее начало половой жизни, рост проституции и др.) имеются и свои особенности, главными из которых являются высокая плотность населения, приближенность к "горячим точкам", наличие большого количества беженцев и вынужденных переселенцев, выраженность миграционных процессов. Численность населения РСО-А 2003 г. составляла 676,319 ч. Из административных районов наибольшая плотность населения в г. Владикавказе и Пригородном районе (1116ч./кв.км.), Правобережном (121 ч./кв.км.), Моздокском (762ч./кв.км.), Ардонском(69 ч./кв./км.). Ниже этот показатель в горных Ирафском (11 ч./кв.км.) и Алагирском (21 ч./кв.км.) районах.

Социально-экономические и военно-политические проблемы 90-х годов на северном Кавказе и в Закавказье обусловили особую демографическую обстановку в РСО-А, имеющую большое значение в эпидемиологии венерических заболеваний. С 1991 года в Республику хлынул поток беженцев из Южной Осетии, Грузии, Таджикистана, Армении, Азербайджана, Чечни и Ингушетии (всего до 50000 человек), которые в недостаточной степени подвергались медицинским осмотрам. Ослабление паспортного режима привело к притоку большого числа лиц без определённого места жительства, ведущих беспорядочную половую жизнь, злоупотребляющих алкоголем и наркотиками. Безработица заставляла постоянных жителей искать временную работу в других регионах страны или же заниматься коммерцией, что также сопряжено с частыми выездами за пределы республики. В миграцию, прежде всего, включаются лица сексуально активные, в основном мужского пола, зачастую не состоящие в браке или же длительное время находящиеся в разлуке с семьёй. Таким образом, бытовые и психологические проблемы, частое среди

мигрантов употребление спиртного порождают лёгкость в выборе половых партнёров. При этом возрастание миграционных процессов идет параллельно увеличению динамики заболеваемости сифилисом.

Показатель заболеваемости сифилисом в Республике в 1979 г. составлял 43,8 на 100 тыс. жителей. В последующие годы вплоть до 1991 г. отмечалась тенденция к снижению (7,5 на 100 тыс. жителей), после чего кривая заболеваемости вновь устремилась вверх, достигнув максимального уровня в 1996 г. (43,5 на 100 тыс. жителей). Некоторое снижение к 1999 году (до отметки 43,5 на 100 тыс. жителей (средне-российский уровень - 165,2 на 100 тыс.) не отражает истинной заболеваемости сифилисом в республике, так как открытые в эти годы негосударственные дерматовенерологические учреждения не ведут статистической отчетности. Соотношение больных сифилисом и гонореей составило в 1999 году 1:1,7, что свидетельствует об издержках регистрации больных сифилисом. (Базаев В.Т., Фидаров А.А., Тургиев М.С. и др., 2001).

Для сравнения можно привести показатели заболеваемости сифилисом по Южному Федеральному округу, которые составили в 2001 году 121,6 на 100 т.н. На прилегающих к РСО-Алания территориях показатель заболеваемости следующий:

Ингушская Республика-15,6;  
 Кабардино-Балкарская Республика-83,8;  
 Республика Дагестан-43,3;  
 Карачаево-Черкесская Республика-117,2;  
 Ставропольский край-137,0;  
 Чеченская Республика отчетности не подаёт.

В 1999 г. зарегистрировано 289 случаев (43,5 на 100 тыс.). Высокая заболеваемость наблюдалась в Ирафском, Моздокском, Дигорском и Алагирском районах (рисунок 1).



2000 г. отмечен ростом количества больных в Кировском, Ардонском, Правобережном, Пригородном районах и в г. Владикавказе. Во всех остальных районах заметно снижение случаев заболевших ( рисунок 2).

2001 год «знаменателен» взлётом заболеваемости (303 случая - 44,7 на 100 тыс.). «Отличились» Алагирский, Ардонский, Ирафский районы и г. Владикавказ. Не изменилась ситуация в Дигорском районе. Снизилась заболеваемость в Кировском, Моздокском, Правобережном и Пригородном районах ( рисунок 3).

В 2002 г. общая заболеваемость населения снизилась до 39,9 на 100 тыс., но продолжала расти в г. Владикавказе, Правобережном, Ирафском, Дигорском районах (в Дигорском почти в 2 раза) ( рисунок 4).

Подъём заболеваемости в 2003 г. (43,0 на 100 тыс.) произошёл за счёт увеличения случаев сифилиса в Пригородном (в 2 раза), Ардонском (в 2,5 раза), Кировском (более чем в 3 раза) и Алагирском (почти в 5 раз) районах. В других районах республики и в г. Владикавказе наблюдалось некоторое снижение заболеваемости (рисунок 5).

Анализируя заболеваемость сифилисом в РСО – А по районам за пять лет (таблица 3, рисунок 6), можно отметить, что она носит циклический характер, во всех районах и в г. Владикавказе наблюдается её нестабильность, со «взлётами» и «падениями». И только в Моздокском районе, несмотря на высокие цифры, идет постоянное, из года в год снижение случаев сифилиса. С 1999 г. по 2003 г. стало заметно изменение удельного веса различных форм сифилиса в сторону увеличения раннего (с 43,5% до 56,0%), появление позднего скрытого сифилиса (5,8%) и врожденного сифилиса (1,7%). С 2001 г. отмечены случаи нейросифилиса (таблица 4, рисунок 7). В структуре заболеваемости преобладают скрытые формы сифилиса, которые характеризуются полным отсутствием симптоматики и выявляются только по положительным серологическим реакциям при обследовании крови в поликлиниках,

**Таблица 3. Заболеваемость сифилисом в РСО-А по районам (с 1999 по 2003 гг.)**

Районы	1999г.		2000г.		2001г.		2002г.		2003г.	
	абс	на100т.	абс	на100т.	абс	на100т.	абс	на100т	абс	на100т.
Алагирский	24	59,9	11	27,8	16	41,1	3	7,9	13	35,1
Ардонский	5	19,0	7	26,3	13	48,7	5	18,8	13	49,6
Дигорский	16	75,8	8	37,7	8	37,7	15	71,1	6	28,3
Ирафский	15	96,2	5	32,0	8	51,3	9	58,1	4	26,0
Кировский	8	31,4	12	46,5	8	30,1	3	11,1	10	36,6
Моздокский	79	96,1	46	54,4	41	49,3	30	36,0	25	30,1
Правобережный	9	16,2	15	27,0	13	23,2	18	32,4	15	26,9
Пригородный	18	24,4	25	30,8	19	22,4	18	20,9	33	38,6
Владикавказ	115	35,5	133	41,1	171	52,5	165	53,0	168	51,7
Иногородние	-		7		6		5		4	
Всего	289	43,5	269	40,1	303	44,7	271	39,9	291	43,0

**Таблица 4. Стадия заболевания (формы) на момент выставления  
диагноза-сифилис (с 1999 г. по 2003 г.)**

Стадия болезни	1999г.		2000г.		2001г.		2002г.		2003г.	
	абс	уд. вес	абс	уд вес	абс	уд вес	абс	уд вес	абс	уд вес
Первичный сифилис	32	11%	53	19,7%	61	20,1%	26	9,6%	43	14,7%
Вторичный сифилис	128	44.3%	80	29.7%	66	21.7%	66	24,4%	60	20.6%
Ранний скрытый сифилис	126	43.5%	130	48.3%	172	56.7%	164	60,5%	163	56.0%
Поздний скрытый сифилис			2	0.7%	2	0.66%	4	1,5%	17	5.8%
Ранний врожд. сифилис	3	1.03%	4	1.5%	1	0.33%	4	1,5%	5	1.7%
Нейросифилис					1	0.33%	7	2,6%	3	1.03%

**Таблица 5. Распределение больных сифилисом по полу (с 1999 по 2003 г.)**

Пол	1999г.		2000г.		2001г.		2002г.		2003г.	
	абс	уд вес	абс	уд вес	абс	уд вес	абс	уд вес	абс	уд вес
Мужчины	119	41,2	111	41,3	125	41,2	123	45,4	128	43,9
Женщины	170	58,8	158	58,7	178	58,7	148	54,6	163	56,1
Итого	289	100	269	100	303	100	271	100	291	100

**Таблица 6. Распределение больных сифилисом в РСО-А  
по возрастам (с 1999- по 2003г.)**

Возраст	1999г.		2000г.		2001г.		2002г.		2003г.	
	абс	уд вес	абс	уд вес	абс	уд вес	абс	уд вес	абс	уд вес
0-14	4	1,4	6	2,2	2	0,7	4	1,5	5	1,7
15-17	10	3,5	12	4,5	7	2,3	7	2,6	2	0,8
18-19	21	7,3	17	6,3	25	8,3	9	3,3	6	2,1
20-29	126	43,6	130	48,3	123	40,6	100	36,9	111	38,1
30-39	82	28,4	64	23,8	84	27,7	87	32,1	89	30,6
40-и ст	46	15,9	40	14,9	66	21,3	64	23,6	78	26,8
итого	289	100	269	100	303	100	271	100	291	100

**Таблица 7. Активность выявления больных**

Обследуемые лица	1999		2000		2001		2002		2003	
	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%
<b>Активно выявленные, из них:</b>	253	100,0	230	100,0	271	89,4	228	100,0	2	100,0
половые контакты	53	21,0	50	21,7	68	22,4	38	16,7	31	15,1
бытовые контакты	3	1,2	5	2,2	19	7,07	4	1,7	7	3,4
акушеры-гинекологи	98	38,7	89	38,7	87	28,7	89	39,0	72	34,9
соматические стационары	41	16,2	57	24,8	54	17,8	51	22,3	51	24,7
доноры	11	4,3	9	3,9	10	3,3	13	5,7	1	0,5
проф. осмотры	40	15,8	12	5,2	11	13,2	27	11,8	12	5,8
смотровые кабинеты	5	2,0	8	3,5	11	3,6	3	1,3	3	1,5
дерматологи					10	3,3			29	14,1
урологи	2	0,8			1	0,3	3	1,1		
<b>Обратились сами</b> (Анонимные кабинеты)	36				7		18		85	

стационарах, при устройстве на работу и различных профилактических осмотрах.

Основную массу больных сифилисом составляют лица обоих полов (таблица 5) в возрасте от 20 до 39 лет (таблица 6, рисунок 8). Однако в последнее время отмечается тенденция к увеличению удельного веса лиц в возрасте свыше 40 лет. По семейному положению основную массу больных составляют холостые – 65 % (из них – разведенные 5 %), состоящие в браке повторно (13,0%) , т.е. семья является одним из сдерживающих факторов в предупреждении случайных половых связей. Анализ социального состава больных сифилисом показал, что основная масса больных (78,9%) представлена нигде не работающими лицами, что в значительной мере затрудняет проведение противоэпидемических мероприятий. Среди причин, влияющих на заболеваемость, необходимо отметить возросшую сексуальную активность подростков, увеличение числа вне- и добрачных половых связей вследствие возросшей сексуальной раскрепощённости населения, коммерциализацию интимных отношений, широкое распространение порнографии, наркомании и т.д.

Анализируя случаи вспышек заболеваемости сифилисом в различных районах РСО-А, можно отметить формирование очагов в большинстве случаев вокруг женщин, чаще приезжих, являющихся первоисточником, так называемое «ядро заболеваемости». Это обычно социально негативные лица, неработающие, ведущие беспорядочную половую жизнь, неженатые или разведённые, неоднократно болеющие ИППП, злоупотребляющие алкоголем и наркотиками, ранее судимые, без определённого места жительства.

Вокруг «ядра» формируется наиболее многочисленная группа лиц, в целом социально адаптированных, семейных, работающих, но, в силу своего низкого культурного и образовательного уровня, неумения организовать свой досуг, они характеризуются бытовым пьянством, ранним началом половой

7,8







жизни, алкогольным опьянением в момент заражения, промискуитетом, многочисленными внебрачными половыми связями, отсутствием целостных сведений о клинике и профилактике венерических болезней. По профессиональному признаку это чаще работники сельского хозяйства, работники общественного питания и торговли. И, наконец, третью группу составляют лица с социально позитивным поведением. Они могут состоять в браке с лицами из первых двух групп. Внебрачные половые связи у них, как правило, не отмечаются. В профессиональном плане эту группу составляют инженерно-технические работники, студенты и служащие. С учётом особой эпидемической значимости лиц первой и второй групп, страдающих алкоголизмом и бытовым пьянством, наличия повторных заражений венерическими заболеваниями, наличия в анамнезе более 4 половых контактов в течение последних 6 месяцев, считаем, что данные группы больных должны находиться на специальном учёте с выделением их в особую диспансерную группу. После окончания лечения при клинико-серологическом контроле этой группе рекомендуем увеличить кратность осмотров (без увеличения срока диспансерного наблюдения), даже после негативации КСР.

В СССР кожно-венерологическая служба, поддерживаемая законодательными актами, достаточно эффективно проводила работу по выявлению и лечению больных ИППП и, в частности, сифилиса, но воспринималась эта деятельность как карательная. В современных условиях изменения, происходящие в стране, коснулись и кожно- венерологической службы, которой необходимо восстановить атмосферу доверия населения.

Есть причины умышленного сокрытия половых контактов: опасение разглашения тайны заболевания, опасение мести, желание оградить партнёра от неприятностей, чувство стыда, большая разность в возрасте между партнёрами, физическая или психическая неполноценность полового партнёра, гомосексуальная связь, инцест, уверенность в невиновности партнёра в силу его семейного положения или принадлежности к декретированным контин-

гентам. Нежелание встречаться с половыми партнёрами в стационаре приводит к тому, что больные дают заведомо ложную информацию о них, а зачастую сообщают о них только по выписке из стационара или находясь на клинико-серологическом контроле в диспансере. Врачам дерматовенерологам необходимо умение вести неоднократные диалоги с любым пациентом, сохраняя уважение к его личности, вызывая его на откровенность. С целью повышения эффективности диспансерной работы по выявлению половых контактов к беседам с пациентами привлекаются заведующий отделением, зав. оргметодотделом, юрист, главный врач. Большое значение имеет создание фототек больных сифилисом, взаимосвязь с администрациями КВД соседних республик и областей.

Для активизации выявления больных сифилисом, наряду с троекратным серологическим обследованием беременных женщин, целесообразным является и двукратное обследование их мужей, в частности, при получении декретного отпуска.

В данное время все мигранты и вынужденные переселенцы, прибывающие в республику или получающие права на прописку, проходят обследование в СОРКВД.

Необходимо обследование на сифилис всех больных с лекарственной непереносимостью, особенно если она сопровождается подъёмом температуры, с эрозивно-язвенными процессами в полости рта и прямой кишки, с паховым лимфаденитом, воспалительными процессами гениталий, эрозиями шейки матки и уретритами.

С работниками МВД проводятся совместные рейды по притонам с выявлением социально-негативных лиц, основных носителей и распространителей сифилитической инфекции.

Поголовная вассерманизация пациентов лечебных учреждений, совместные консультации и консилиумы врачей всех специальностей с дерматовенерологами, профилактические осмотры организованных слоёв населения,

чтение лекции, активное использование средств массовой информации являются теми факторами, с помощью которых и выявляется большинство больных сифилисом. Так, процент активно выявленных больных сифилисом в РСО-А с 1999 года по 2003 год колебался от 84,1% до 89,4%. По Российской Федерации эта цифра за тот же период находилась в пределах от 60% до 70%.

Во всех районных ЦРБ и лечебных учреждениях г. Владикавказа налажено взятие крови на реакцию микропреципитации у всех пациентов. У находящихся в гинекологических, неврологических, офтальмологических, кардиологических стационарах, пациентов женских консультаций, абортари-ев и рожениц родильных домов кровь исследуется на МРП, реакцию Вассермана (КСР). Но при проверке исполнения действующих приказов обнаруживается, что:

- 1) нет 100% вассерманизации в стационарах и поликлиниках республики;
- 2) не полностью (ИФА, ПЦР, культуральная диагностика) обследуются лица, страдающие воспалительными заболеваниями мочеполовых органов, бесплодием;
- 3) не во всех случаях беременные становятся на учёт в первой половине беременности (случаи врождённого сифилиса) и не всегда соблюдается кратность серологических обследований;
- 4) имеет место лечение ИППП специалистами других профилей (гинекологами, урологами и т.д.), без привлечения к обследованию половых партнёров;
- 5) не часто проводятся совместные семинары представителей кафедры дерматовенерологии, врачей дерматовенерологов со специалистами терапевтами, акушер-гинекологами, педиатрами и неонатологами, офтальмологами, кардиологами, рентгенологами, невропатологами и т.д.;
- 6) не все частнопрактикующие врачи заключают договор с СОРКВД

для проведения лабораторной диагностики, подача сведений о количестве пролеченных больных ИППП продолжает вызывать сомнение;

7) остаётся очень низкой цифра выявленных больных сифилисом в смотровых кабинетах, урологами республики и при проф. осмотрах (таблица 7, рисунок 9);

8) недостаточна санитарно-просветительская работа среди разных слоёв населения по профилактике ИППП, половому воспитанию молодёжи и т. д. с привлечением средств массовой информации.

\*\*



В централизованной лаборатории Северо-Осетинского кожновенерологического диспансера во исполнение приказа МЗ № 87 с 2001 г. для исследования на сифилис широко применяются: тест быстрых плазменных реагинов (RPR), метод иммуноферментного анализа (ИФА), как скрининговый, трепонемные подтверждающие тесты - реакция пассивной гемагглютинации (РПГА) и реакция иммунофлюоресценции (РИФ), позволившие выявить



большее количество поздних форм сифилиса: в 2000 г. поздний скрытый сифилис был в 2-х, в 2002 г. – уже в 4-х случаях; в 2000 г. нейросифилис не обнаруживался, а в 2002 г. – уже диагностировали 7 случаев этой тяжёлой формы болезни.

Необходимо отметить, что в 12,4% случаях при установлении диагноза раннего скрытого сифилиса и 50,0% - при нейросифилисе при отрицательной реакции Вассермана ИФА была резко положительной.

Сложившаяся эпидемиологическая ситуация, отдельные политические, демографические особенности нашей республики диктуют органам здравоохранения необходимость активизации мероприятий и совершенствование форм и методов по борьбе с сифилисом и другими ИППП. В любой момент нестабильность в соседних республиках может вылиться в новый поток мигрантов с новым всплеском заболеваемости.

При этом лабораторные методы играют существенную роль в системе этих мероприятий. Расширение арсенала лабораторных методов и особенно за счет экспрессных, с помощью которых возможно исследовать большое количество людей за короткий промежуток времени и получить достоверную информацию о сложившейся ситуации по этой инфекции, даст возможность принимать оперативные меры в борьбе с заболеваемостью сифилисом.

#### **Глава 4. РАЗРАБОТКА ТРЕПОНЕМНОГО АНТИГЕННОГО СУСПЕНЗИОННОГО ДИАГНОСТИКУМА ДЛЯ РЕАКЦИИ АГГЛЮТИНАЦИИ ЛАТЕКСА**

Усиливающаяся в последние годы тенденция использовать в качестве носителей антигенов и антител инертные синтетические материалы привела к оживлению интереса к реакции агглютинации латекса (РАЛ) и широкому изучению возможностей её применения в диагностике. В качестве матриц для приготовления иммунореагентов применяли различные носители: полистироловые, поливинилтолуеновые, полиметакрилатные, полиакролеиновые. На различных моделях бактериальных, грибковых, паразитарных антигенов детально отработаны условия сенсibilизации латекса иммунобиологически активными субстратами, стабилизации суспензий сенсibilизированного латекса и стандартизации латексовых диагностикумов (Лукин Ю.В., Бахарев В.Н., Заиченко А.С. и др., 1985; Лукин Ю.В., Трифонов В.Д., Туркин С.И. и др., 1985; Ерохин Е.П., 1991; Юдицкая Н.М., 1991; Воробьева З.Г., Фокина Е.Н., 1992; Ковалева Л.Н., 1992; Базиков И.А., 2000; Касторная М.Н., 2003; Parks D., Braun W., Oi V., 1979; Kaplan M., Galef T., Bercovici T., 1983; Farchy C.T., Hunter T.F., Larsen S.A. et al., 1984; Margel S., Wiesel T., 1984; Cox D.L., Chang P., Mc Dovall A.M et al., 1992; Matsumoto M., Ishikawa F., Matsubayashi T. et al., 1993; Young H., Moyes A. et al., 1998 и др.).

По мнению Ю.В.Лукина (1986), метод латексной агглютинации с использованием окрашенных полиакролеиновых микросфер не уступает по чувствительности и наглядности методу гемагглютинации и иммуноферментному анализу. Химические свойства латексных микроносителей относительно постоянны и поддаются более легкой и точной характеристике по сравнению с поверхностными свойствами наружной мембраны эритроцитов, которые широко варьируют в зависимости от источника выделения. Поэтому латексные микроносители обеспечивают более воспроизводимые



результаты по сравнению с эритроцитарными и могут с успехом их заменять в этом виде иммуноанализа.

К латексам, используемым для приготовления диагностических препаратов, предъявляют достаточно высокие требования. У них должно отсутствовать неспецифическое связывание с клетками, они должны иметь активные функциональные группы для связывания биологических лигандов, быть монодисперсными и стабильными в физиологическом растворе. Кроме того, для расширения областей их биохимического применения в такие латексные системы можно вводить специальные добавки (Rembaum A., Dreuer W., 1980). Преимущество полиакролеиновых систем перед другими микросферами обеспечивается наличием альдегидных групп на поверхности латексных частиц, легкообразующих ковалентную связь с аминогруппами белков, а также низкий уровень неспецифических взаимодействий с клеточными мембранами. В состав полиакролеинового латекса нет необходимости добавлять детергенты, так как однородность суспензии обеспечивается его природой (Воробьева З.Г., Фокина Е.Н., 1992).

В данном разделе работы изложена биотехнология приготовления трепонемного суспензионного латексного антигенного диагностикума для реакции агглютинации и дана оценка его диагностической ценности. Изготовление препарата осуществляли в соответствии с методикой, разработанной И.А.Базиковым (2000), в нашей модификации, используя в качестве полимерной матрицы акролар К, полученный из института биоорганической химии им. Шемякина. Гомогенные частицы латекса правильной сферической формы, окрашенные в розовый цвет, имели средний диаметр  $(1,2 \pm 0,1)$  мкм.

Лигандом служил комплексный антиген, полученный по разработанной нами биотехнологической схеме, состоящий из коммерческого ультразвученного трепонемного антигена (УЗТА) для РСК производства ФГУП «Аллерген» (г.Ставрополь), подверженного специальной очистке, и

цетавлонового супернатанта, представляющего собой поверхностные антигены трепонем, извлеченные нами по методике М.С.Blake, Е.С.Gotschlich (1982), в соотношении 2:1. При производстве УЗТА используют штаммы культуральных бледных трепонем, которые относятся к трем иммунологическим группам по классификации Р.Р.Гельтцера и Л.В.Зебницкой (1950). Для извлечения антигена применяют водно-солевую экстракцию и ультразвуковую дезинтеграцию. Водно-солевые экстракты обладают наиболее сложным макромолекулярным составом, и в них обнаруживаются в тех или иных количествах все выявляемые у того или иного микроба антигены (Бельская Н.А., Митина В.С., Вейнблат В.И., 1970, 1972; Вейнблат В.И., Бельская Н.А., Митина В.С., 1971; Вейнблат В.И., Каминский В.В., Орлова Л.С., 1972; Вейнблат В.И., 1974; Афанасьев Е.Н., 1984, 2000; Тюменцева И.С., 1996 и др.). Механизм разрушения микробной клетки ультразвуковым дезинтегратором заключается в процессе образования и захлопывания кавитационных полостей, сопровождающихся чередованием высоких давлений и разрежений (Эльпинер И.Э., 1955, 1975; Гуревич Г.А. Кудрявцев Н.А., Фихте Б.А. и др., 1972). Под воздействием ультразвуковых волн прежде всего наступает разрушение клеток микробов, а действие ультразвука на химические вещества, находящиеся в клетках, проявляется гораздо медленнее, и это обеспечивает возможность получения различных активных комплексов микробной клетки в наименее измененном виде (Благовещенский В.А., Степанчук-Рудник Г.И., Жулина Л.В. и др., 1961). УЗТА, являясь поливалентным антигеном, состоит из протеинового, полисахаридного и липоидного антигенов (Овчинников, Н.М. Беднова В.М., Делекторский В.В., 1987).

В связи с тем, что УЗТА содержит в своем составе групповые антигены (его используют для удаления из исследуемых сывороток групповых антител, например, при постановке РИФ-абс), для повышения его

специфичности мы подвергали этот антиген очистке по схеме, представленной на рисунке 10.

Этап иммуносорбции перекрестно-реагирующих антигенов *T.pallidum* из УЗТА проводили с помощью твердофазного полиакриламидного сорбента, полученного на основе иммуноглобулинов сыворотки донорской крови человека и специфических иммуноглобулинов, выделенных из гипериммунной кроличьей сыворотки против корпускулярного антигена, полученного из биомассы *T.phagedenis* (штамм Рейтера) (рисунок 11). Указанную сыворотку получали гипериммунизацией кроликов-продуцентов по схеме, представленной в таблице 8. Способ иммунизации заключался в следующем: животным трехкратно с интервалом в 7 дней в увеличивающихся дозах ( $5 \times 10^9$  м.к.,  $5 \times 10^{10}$  м.к.,  $5 \times 10^{12}$  м.к в 1 мл физиологического раствора) вводили 0,5 мл антигена внутривенно и одновременно в подколенные лимфоузлы, подушечки задних лап, подушечки передних лап (по 0,5 антигена с 0,5 мл полного адъюванта Фрейнда (ПАФ)). В эти же сроки кроликам внутримышечно инъецировали по 0,5 мг иммунокорректор – тималин. Через 7 дней после последнего введения антигена проводили тотальное кровопускание

Иммуноглобулины из полученных сывороток крови выделяли с помощью ПЭГ-6000 по A.Polson, G.M.Potgieter, J.T.Largier et al. (1964).

Приготовление твердофазного иммуносорбента и процесс сорбции проводили следующим образом. Иммуноглобулины инсолубилизировали путем механического включения их в решетку полиакриламидного геля: в  $(9 \pm 0,1)$  мл Ig ( на каждый вид иммуноглобулинов иммуносорбент готовили отдельно) растворяли  $(600 \pm 1)$  мг акриламида,  $(200 \pm 1)$  мг N, N<sup>1</sup> – метиленбисакриламида и 0,2 ТЕМЕД. К полученной смеси добавляли  $(5 \pm 0, 1)$  мг персульфата аммония, растворенного в  $(1 \pm 0, 05)$  мл Ig. Указанную операцию проводили при температуре  $(4 \pm 1) ^\circ\text{C}$ , тщательно перемешивая. Блоки

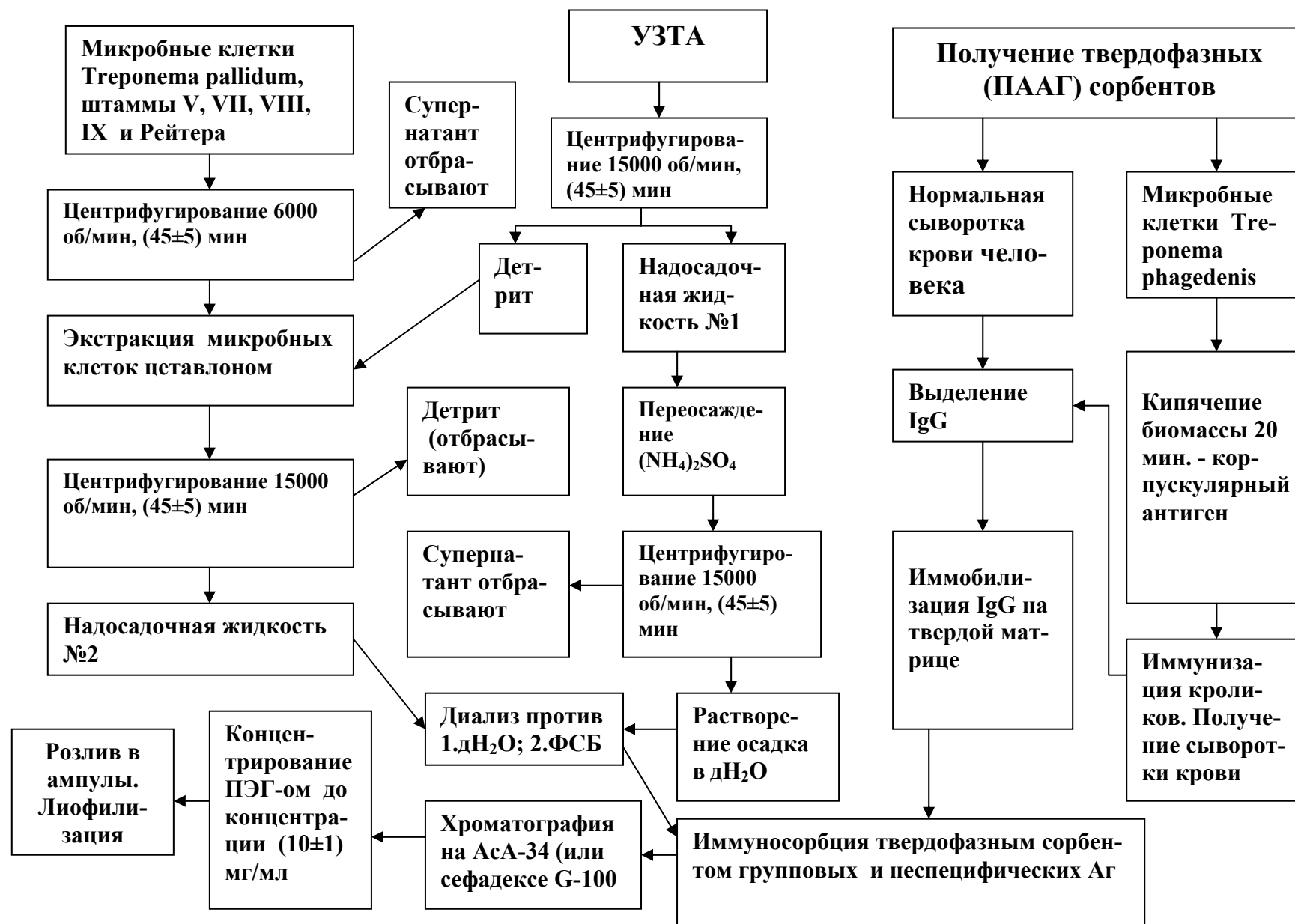
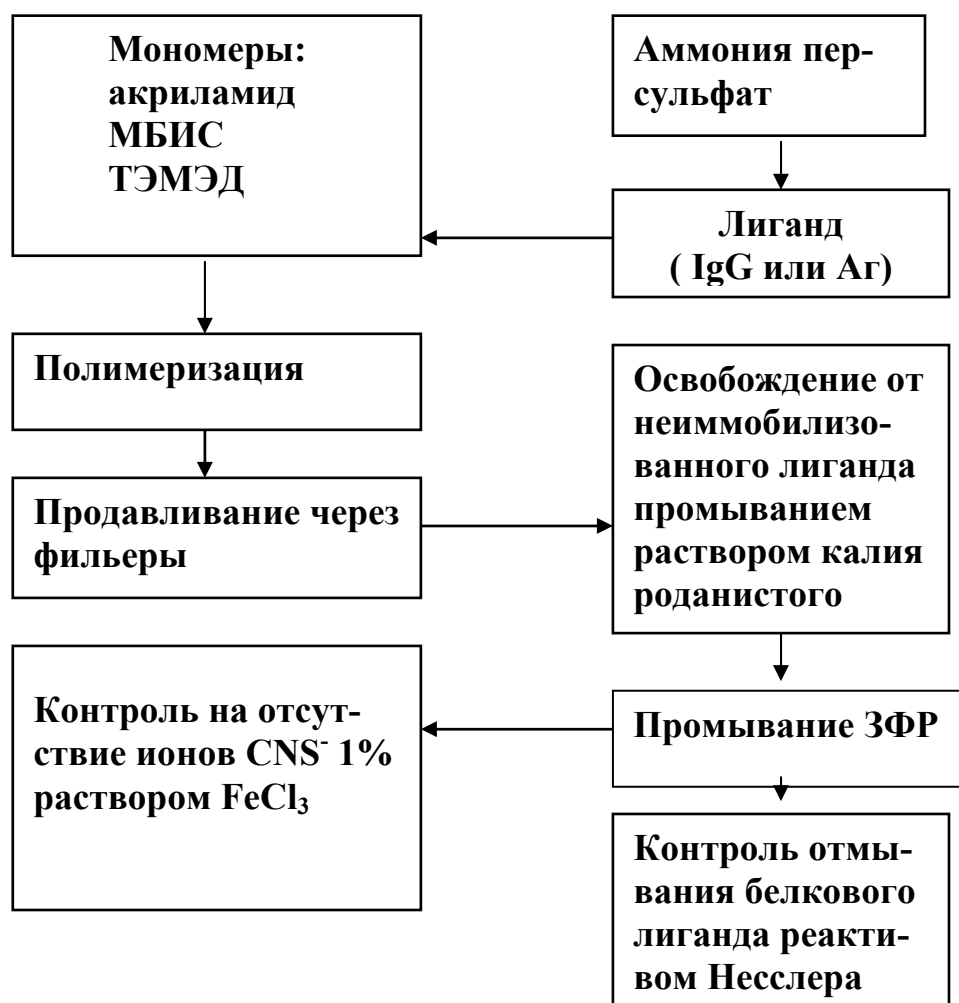


Рисунок 10. Схема получения комплексного трепонемного антигена



**Рисунок 11. Схема получения твердофазного полиакриламидного иммуносорбента**

**Таблица 8. Схема иммунизации кроликов**

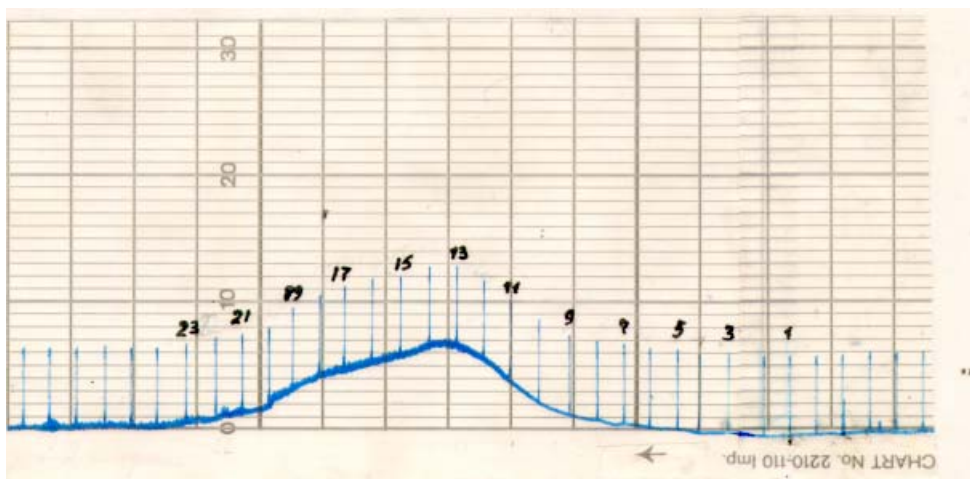
№№ инъ- ек- ций	Интервалы между инъ- екциями, сут.	Кон- центра- ция ан- тигена, м.к.	Способ введения антигена				Иммуномодуля- торы	
			в/в	подко- ленные лимфо- узлы	поду- шечки перед- них лап	поду- шечки задних лап	Способ введения – в/м	
							ПАФ, мл	тима- лин, мг
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	-	$5 \times 10^9$	+	+	-	-	0,5	5
2	7	$5 \times 10^{10}$	+	-	-	+	0,5	5
3	4	$5 \times 10^{12}$	+	-	+	-	0,5	5
4	7	тотальное кровопускание						

**Обозначения:** м.к. – микробные клетки; в/в - внутривенно; в/м - внутримышечно  
ПАФ – полный адъювант Фрейнда

полиакриламидного геля, соответствующие каждому Ig, измельчали, продавливая через фильтры, получая мелкие гранулы сорбента одинаковой величины. После этого сорбент промывали 10-кратным объемом раствора калия роданистого в концентрации 0,3 моль/л путем центрифугирования при 3000-4000 g в течение 5 мин. Для удаления несвязавшегося белка и роданистого калия иммуносорбенты отмывали 10-кратным объемом забуференного 0,9 % раствора хлорида натрия путем центрифугирования при указанном режиме. Исчезновение ионов CNS определяли качественной реакцией 1 % раствором треххлорного железа. Иммуносорбенты, смешанные в равных количествах, добавляли в УЗТА из расчета 10 мл сорбента на 20-40 мл антигена и инкубировали при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 20 ч и при температуре  $22^\circ\text{C}$  4 ч. Антиген отделяли центрифугированием. Для повторного использования иммуносорбента проводили его регенерацию 3 М раствором роданистого калия или натрия, обеспечивающую диссоциацию комплекса «иммобилизованный антиген – антитело», с последующим отмыванием физиологическим раствором. Сорбент хранили при температуре плюс  $4^\circ\text{C}$  с добавлением тимеросаля в концентрации 1:10000. Такой сорбент, регенерируя, можно использовать до 20 раз.

Белковый компонент переосаждали  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  до 80 % насыщения и очищали на колонке с сефадексом G-100 с последующим элюированием 0,1 М фосфатным буферным раствором. Белковый компонент очищенного антигена выходил одним пиком (рисунок 12). Фракции 8-21 собирали, концентрировали до 5 мг/мл белка с помощью ПЭГ-6000 в диализной трубке «Visking».

Для извлечения поверхностных антигенов из культуральных бледных трепонем штаммов V, VI, VII, VIII IX и Рейтера применяли цетилтриметиламмонийбромид (цетавлон)- катионное поверхностно-активное вещество, обладающее не только экстрактивными, но и антисептическими



**Рисунок 12 . Хроматограмма очищенного УЗТА**

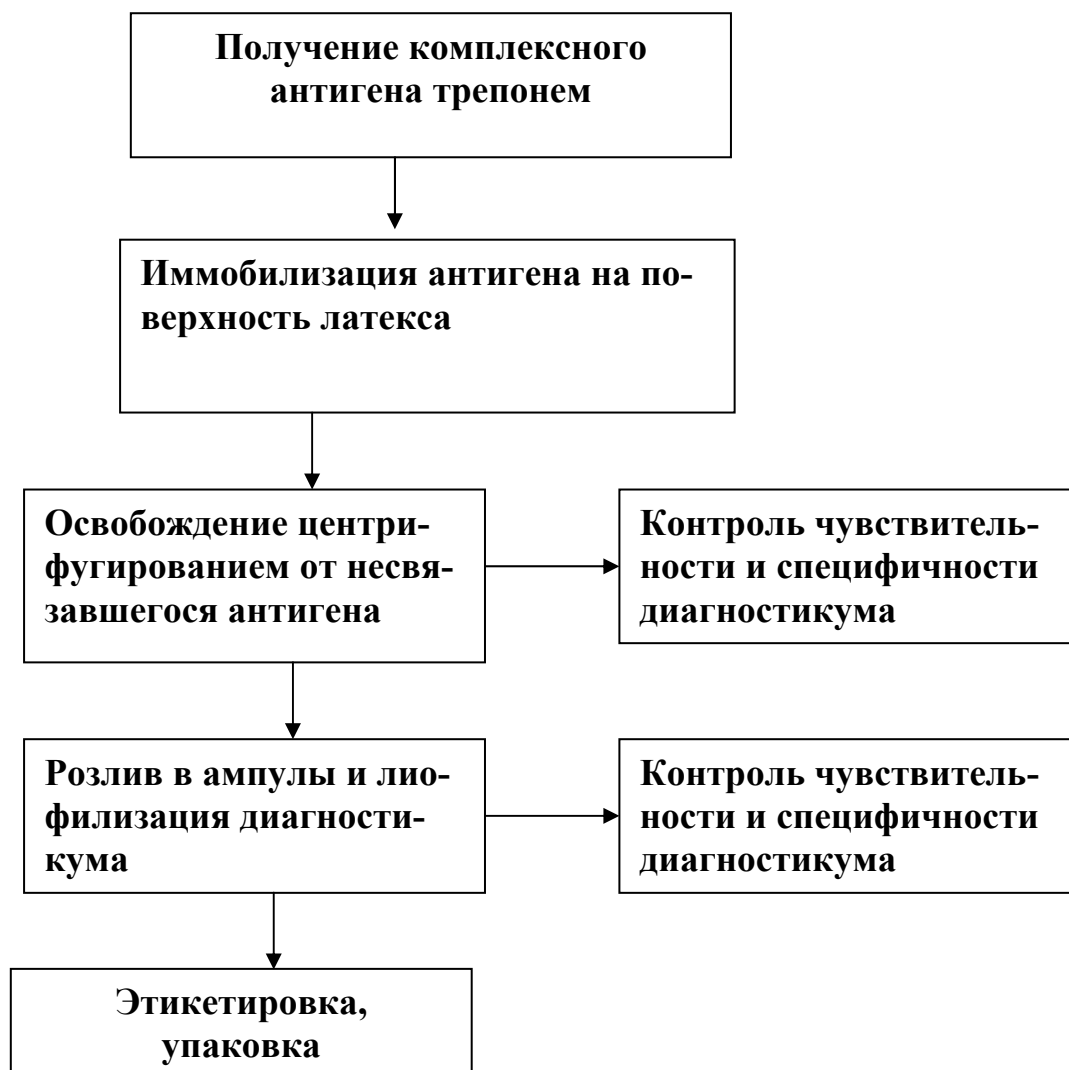
*Примечание:* колонка  $h - 650$  мм,  $r - 12,5$  мм,  $V$  пробы – 5 мл, элюэнт 0,1 М ФСБ, pH 7,2.

свойствами, используя методику М.С.Blake, Е.С.Gotschich (1982). Для комплексного трепонемного антигена (см.рисунок 10) использовали супернатант, который в отличие от осадка является наиболее специфическим антигенным полимерным комплексом, включающим липид, полисахарид в сочетании с протеинами и нуклеиновыми кислотами (Rossettim O.L., Arese N.L., Boschioli M.L. et al., 1996).

Для получения качественного латексного диагностикума по биотехнологической схеме, представленной на рисунке 13, необходимо было подобрать эмпирическим путем оптимальные условия сенсibilизации матрицы.

При отработке концентрации лиганда в работу брали следующие дозы комплексного трепонемного антигена: 0,05 мг; 0,1 мг; 0,15 мг; 0,20 мг; 0,30 мг.

В процессе работы изучена зависимость взаимодействия лиганда с частицами латекса от экспозиции (1 ч, 1,5 ч, 3 ч, 5 ч). Для эффективной сенсibilизации латекса с антигеном необходима экспозиция, равная 3 ч, при постоянном перемешивании на магнитной мешалке. При изучении



**Рисунок 13 . Принципиальная технологическая схема изготовления суспензионного трепонемного диагностикума для РАЛ**

роли температурного фактора, влияющего на связывание лиганда, мы использовали следующие параметры:  $22^{\circ}$ ,  $37^{\circ}$ ,  $45^{\circ}$ . Установлено, что температура  $22^{\circ}\text{C}$  является оптимальной для взаимодействия латекса с антигеном.

В процессе выполнения работы апробированы различные диапазоны pH среды: 4,0; 5,0; 6,0; 7,2, 7,4. Прочное связывание лиганда с матрицей происходит при pH 7,2.



Таким образом, нами отработаны оптимальные условия сенсibilизации латексных микросфер комплексным трепонемным антигеном: 0,20 мг лиганда соединяли с 2 мл 2 % полимерного носителя. К смеси добавляли 2 мл 0,9% раствора натрия хлорида, рН 7,2. Сенсibilизацию проводили в течение 3 ч при температуре 22 °С на магнитной мешалке. Далее суспензию осаждали центрифугированием при 4000 g в течение 3-4 мин и дважды отмывали от несвязавшегося антигена.

Для стабилизации трепонемного полимерного латексного диагностикума мы использовали метод лиофилизации, который широко применяется для практических целей как наиболее надежный (Бланков Б.И., Клебанов Д.Л., 1961; Тинкер А.И., 1971; Голубев Л.Г., Сажин Б.Е., Валашек Е.Р., 1978; Мирошниченко А.И., Лопаткин О.Н., Жарникова И.В. 1987; Жарникова И.В. 2003,2004).

Процесс лиофилизации заключается в следующем: готовый препарат со стабилизирующей жидкостью (защитная среда) замораживается при температуре минус 40-70° С. После чего препарат помещают в сушильную камеру, где создается вакуум при помощи вакуумного насоса, при этом влага испаряется, минуя переход в жидкую фазу, непосредственно из льда, в результате чего структура препарата не нарушается. При высушивании методом сублимации создаются условия, при которых вещество претерпевает минимальные биохимические изменения. Возможность денатурирования биологически активных веществ этим методом сводится к минимуму, благодаря тому, что замораживание блокирует растворение веществ. При высушивании под вакуумом скорость окислительных процессов значительно снижается в высушиваемом материале, а интенсивность процесса высушивания определяется разностью давлений пара над препаратом.

Применяют различные среды высушивания, защищающие диагностикумы при замораживании и лиофилизации, обеспечивающие их мелко-

пористую плотную структуру и сохраняющие активность препаратов: сахарозо-декстрановые, сахарозо-поливинилпирролидоновые, лактозные, желатиновые и др. Защитные среды подразделяются на две группы: к первой группе относятся среды, в которых снижается интенсивность обезвоживания в период лиофилизации в связи с увеличением концентрации веществ. В эту группу входят: глутамат натрия, лактоза, сахароза. Ко второй группе относят среды, которые не изменяют скорость отдачи воды при высушивании. Этими свойствами обладает крахмал, декстран, желатин, поливинилпирролидон и другие. Но наилучшими средами считают среды, полученные при комбинировании веществ 1 и 2 групп.

Подготовку препарата к лиофилизации осуществляли следующим образом. Отмытый диагностикум суспендировали в половине первоначального объема стерильной защитной среды, в состав которой входили по 5 г желатины и сахарозы, растворённые в 100 мл дистиллированной воды. Препарат разливали в ампулы ШПВ-6 по 1 мл. Для замораживания использовали лиофильное устройство НС 700/50 «Friger»<sup>0</sup>, ЧССР. Ампулы с диагностикумом выдерживали в морозильной камере при температуре минус  $(40 \pm 1)^{\circ}\text{C}$   $(19 \pm 1)$  ч. Лيوфилизацию проводили на установке для сублимационной сушки ТГ-5 (ГДР).

Время режима сублимационного высушивания составляло  $(24 \pm 2)$  часа, при котором температура конденсатора была доведена до минус  $40^{\circ}\text{C}$ . При рабочем давлении в сублимационной камере 35- 40 Па, когда температура препарата достигала  $5-10^{\circ}\text{C}$ , через 14- 16 часов включали подогрев и досушивали препарат до температуры  $25^{\circ}\text{C}$ , выдерживали при этой температуре 4-5 часов для достижения величины остаточной влажности 2- 4 % (рисунок 14).

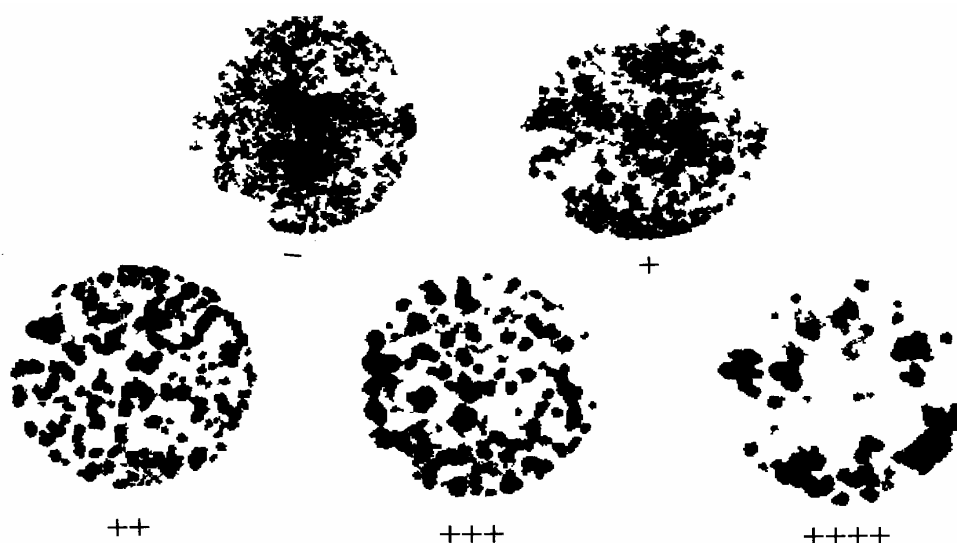


Ампулы запаивали на газокислородной горелке. Контроль качества препарата (растворимость, цветность, потеря в массе при высушивании, герметизация) осуществляли в соответствии с методиками, изложенными в ГФ СССР, XI изд., том 1 и МУК 4.1/4.2.588-96.

При изучении чувствительности и специфичности диагностикума использовали два варианта постановки РАЛ: на стекле, как скрининг на сифилис (качественный тест), и титрование сывороток в микропланшетах (количественный тест). Для этого использовали 96-луночные микропланшеты для иммунологических реакций из полистирола отечественного и импортного производства.

Исследуемые сыворотки инактивировали на водяной бане ( $30 \pm 2$ ) мин при температуре  $(56 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ . На обезжиренное стекло наносили сыворотки в следующих дозах - 0,04 мл; 0,02 мл; 0,01 мл и 0,03 мл – контроль сыворотки. К первым трем дозам сыворотки добавляли по одной капле диагностикума. К последней дозе сыворотки добавляли 0,03 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Сыворотки осторожно смешивали с диагностикумом стеклянной палочкой, начиная с минимальной дозы сыворотки. Через 5 мин учитывали результаты реакций. При наличии в пробе специфических антител к трепонемам антиген взаимодействовал с ними, что приводило к агглютинации, которая становилась видимой, благодаря присутствию окрашенных латексных частиц (положительный результат). Реакция учитывалась невооружённым глазом или с помощью микроскопа (рисунок 15).

Результат выражался числом плюсов от 1 до 4 в зависимости от интенсивности микроагглютинации. Появление крупных агрегатов расценивали как положительный результат (4+; 3+), средней величины и мелких – как слабopоложительный результат (2+; 1+). В сомнительных случаях ориентировались на контроль – суспензия оставалась гомогенной – равномерное распределение латексных частиц.



**Рисунок 15. Учет результатов реакции агглютинации латекса на стекле**

Методика постановки РАЛ в планшетах заключалась в следующем: в каждую лунку вносили по 50 мкл раствора белкового стабилизатора, который специально готовили для постановки РАЛ. Технология его изготовления состояла в следующем: 25 мл белка куриного яйца смешивали на магнитной мешалке с 75 мл 1,6 % раствора карбоната натрия до получения гомогенного раствора. Смесь фильтровали через 8 слоев марли, смоченной дистиллированной водой, помещали на водяную баню и выдерживали при периодическом помешивании 10-12 мин с момента закипания воды. Смесь охлаждали и нейтрализовали 1Н соляной кислотой до pH 7,0-7,2, фильтровали через 8 слоев марли, повторно выдерживали на кипящей водяной бане в течение 10-12 минут, разливали по 1 мл в ампулы и лиофильно высушивали. Перед употреблением белковый стабилизатор разводили 1:100 забуференным физиологическим раствором, pH 7,2.

Анализируемый образец сыворотки вносили в первую лунку планшета и раститровывали шагом 1:2. В две последние лунки каждого ряда не вносили исследуемый материал. Они служили контролем оседания сус-

пензии в растворе. Далее в каждую лунку планшета вносили по 1 капле диагностикума. Микропланшеты встряхивали до равномерного распределения суспензии и оставляли на столе при температуре 22 °С. Учет проводили через 3-6 часов. В случае положительной реакции суспензия диагностикума равномерно устилала дно лунки в виде «зонтика». При отрицательном результате реакции и в опыте, и в контроле – суспензия диагностикума выпадала в виде «пуговки» или узкого кольца с ровным краем (рисунок 16).

#### **Рисунок 16. Учет результатов РАЛ в микропланшетах**

По вышеописанной технологии нами изготовлено 10 серий диагностикума. Оценка их диагностической ценности проводилась на базе централизованной лаборатории Северо-Осетинского РКВД (акт о внедрении от 23.09.2004 г.). Для исследования были взяты сыворотки крови 416 стационарных больных до лечения и после лечения с различными диагнозами: сифилис первичный серопозитивный (*Lues premaria seropositiva*), сифилис вторичный свежий (*Lues secundaria recens*), сифилис вторичный рецидив-

ный (*Lues secundaria recidive*), сифилис скрытый ранний (*Lues latens praecox*), сифилис скрытый поздний (*Lues latens tarda*), нейросифилис ранний (*Neurosyphilis praecox*) в сравнении с КСР (микрореакция преципитации, реакции Вассермана, ИФА, РНГА, РИФ). Контрольной группой служили сыворотки крови 167 лиц, свободных от сифилитической инфекции.

На основании проведенных испытаний установлено, что изготовленный по разработанной нами технологии трепонемный суспензионный антигенный диагностикум позволяет проводить реакцию агглютинации латекса по чувствительности, сопоставимую с такими трепонемными тестами, как РПГА, ИФА, РИФ, в то же время РАЛ превосходит реакции Вассермана и МР по этому показателю (таблицы 9,10). При сравнительном изучении специфичности РАЛ и МР (таблица 11) достоверно установлена его высокая специфичность.

Таким образом, простота постановки, демонстративность реакции, низкая стоимость анализа свидетельствуют о целесообразности его применения в практическом здравоохранении, особенно при проведении массовых обследований больных на сифилис.

**Таблица 9. Чувствительность РАЛ с сыворотками крови больных сифилисом до лечения в сравнении с КСР**

Реакции	Серологические тесты	Число сывороток крови					
		12	8	51	124	7/2*	6/2*
		Сифилис первичный серопозитивный	Сифилис вторичный свежий	Сифилис вторичный рецидивный	Сифилис скрытый ранний	Сифилис скрытый поздний	Нейросифилис ранний
1	2	3	4	5	6	7	8
РАЛ	4+	12/100	8/100,0	51/100,0	122/98,4	6/85,7	6/100,0
	3+	-	-	-	2/1,61	1/14,0	-
	2+	-	-	-	-	-	-
	1+	-	-	-	-	-	-
МР	4+	10/83,3	7/87,5	50/98	107/86,2	4/57,1	1/16,6
	3+	2/16,7	1/12,5	1/1,9	10/8/06	1/14,0	-
	2+	-	-	-	7/5,6	2/28,6	3/50,0
	1+	--	-	-	-	-	2/33,3
РВ	4+	11/91,6	7/87,5	51/100,0	110/88,7	-	-
	3+	1/8,3	1/12,5	-	8/6,45	2/28,6	-
	2+	-	-	-	6/4,83	2/28,6	3/50,0
	1+	-	-	-	-	1/14,0	1/16,6
РПГА	4+	12/100,0	8/100,0	51/100,0	-123/99,1	7/100,0	6/100,0
	3+	-	-	-	1/0,8	-	-
	2+	-	-	-	-	-	-
	1+	-	-	-	-	-	-
ИФА	4+	12/100,0	8/100,0	51/100,0	121/97,5	6/85,7	6/100
	3+	-	-	-	3/2,41	1/14,0	-
	2+	-	-	-	-	-	-
	1+	-	-	-	--	-	-



*Продолжение таблицы 9*

1	2	4	5	6	7	8	9
РИФ	4+	12/100,0	8/100,0	51/100,0	124/100,0	7/100	6/100,0
	3+	-	-		-	-	-
	2+	-	-			-	-
	1+	-	-			-	-

*Примечание:* числитель – положительные результаты;

знаменатель - процентное соотношение;

\* знаменатель - отрицательные результаты в РВ

**Таблица 10. Сравнительные данные по чувствительности РАЛ и других серологических тестов с сыворотками крови больных сифилисом после лечения**

Реакции	Серологи- ческие тесты	Число сывороток крови					
		12	8	51	124	7	6
		Сифилис пер- вичный серопо- зитивный	Сифилис вторичный свежий	Сифилис вторичный рецидивный	Сифилис скрытый ранний	Сифилис скрытый поздний	Нейросифилис ранний
1	2	3	4	5	6	7	8
РАЛ	4+	9/75,0	8/100,0	42/82,3	83/66,9	3/42,8	4/66,6
	3+	2/16,6	-	9/17,6	20/16,1	2/28,5	2/33,3
	2+	1/8,3	-	-	19/15,3	2/28,5	-
	1+	-	-	-	2/1,61	-	-
	Отр.	-	-	-	-	-	-
МР	4+	-	4/50,0	27/52,9	42/34,8	-	-
	3+	-	2/25,5	10/19,6	2/1,61	1/14,2	1/16,6
	2+	3/25,0	1/12,5	7/13,7	58/46,7	5/71,4	2/33,3
	1+	2/16,6	1/12,5	7/13,7	18/14,5	1/14,2	2/33,3
	Отр.	7/58,3	-	-	4/3,22	-	1/16,6
РВ	4+	-	5/65,5	5/11,7	36/30,0	-	-
	3+	2/16,6	3/37,5	10/19,6	21/16,9	2/28,5	-
	2+	6/50,0	-	15/29,4	58/46,7	1/14,2	1/16,6
	1+	3/25,0	-	8/15,6	8/6,45	3/42,8	3/50,0
	Отр.	1/8,3	-	13/25,4	1/0,8	1/14,2	2/33,3
РПГА	4+	10/83,3	8/100,0	51/100,0	124/100	7/100	6/100
	3+	2/16,6	-	-	-	-	-
	2+	-	-	-	-	-	-
	1+	-	-	-	-	-	-

*Продолжение таблицы 10*

	<b>Отр.</b>	-	-	-	-	-	-
<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
<b>ИФА</b>	<b>4+</b>	<b>9/75,0</b>	<b>8/100,0</b>	<b>33/64,7</b>	<b>92/74,1</b>	<b>4/57,1</b>	<b>4/66,6</b>
	<b>3+</b>	<b>2/16,6</b>	-	<b>18/35,3</b>	<b>18/14,5</b>	<b>1/14,2</b>	<b>2/33,3</b>
	<b>2+</b>	<b>1/8,3</b>	-	-	<b>6/4,83</b>	<b>1/14,2</b>	-
	<b>1</b>	-	-	-	<b>8/6,45</b>	<b>1/14,2</b>	-
	<b>Отр.</b>	-	-	-	-	-	-
<b>РИД</b>	<b>4+</b>	<b>12/100,0</b>	<b>8/100,0</b>	<b>51/100,0</b>	<b>124/100,0</b>	<b>7/100</b>	<b>6/100</b>
	<b>3+</b>	-	-	-	-	-	-
	<b>2+</b>	-	-	-	-	-	-
	<b>1+</b>	-	-	-	-	-	-
	<b>Отр.</b>	-	-	-	-	-	-

**Примечание:** числитель – положительные результаты;  
знаменатель -процентное соотношение

**Таблица 11. Сравнительные данные специфичности РАЛ и МР с сыворотками крови людей, свободных от сифилитической инфекции**

№ п/п	Обследуемые	Число сыворо- ток	Совпа- дение результатов	Расхождение результатов			Специфичность, %		Эффектив- ность, % РАЛ
				число случаев	РАЛ	МР	РАЛ	МР	
1.	Беременные	120	113	7	1	6	99,2	95	4,2
2.	Доноры	16	16	-	-	-	100	100	-
3.	Больные гонореей	4	4	-	-	-	100	100	-
4.	Кожные больные	12	12	-	-	-	100	100	-
5.	Терапевтические больные	10	10	-	-	-	100	100	-
6.	Онкологические и инфекционные больные	5	5	-	-	-	100	100	-
7.	Всего	167	100	7	1	6	99,9	99,2	0,7
8.	Процентное соотношение	100	95,8	4,2	0,6	3,6	99,9	99,2	0,7 p < 0,01

## **Глава 5. РАЗРАБОТКА ТРЕПОНЕМНОГО АНТИГЕННОГО ДИАГНОСТИКУМА С КОЛЛОИДНЫМ СЕРЕБРОМ ДЛЯ ДОТ-ИММУНОАНАЛИЗА**

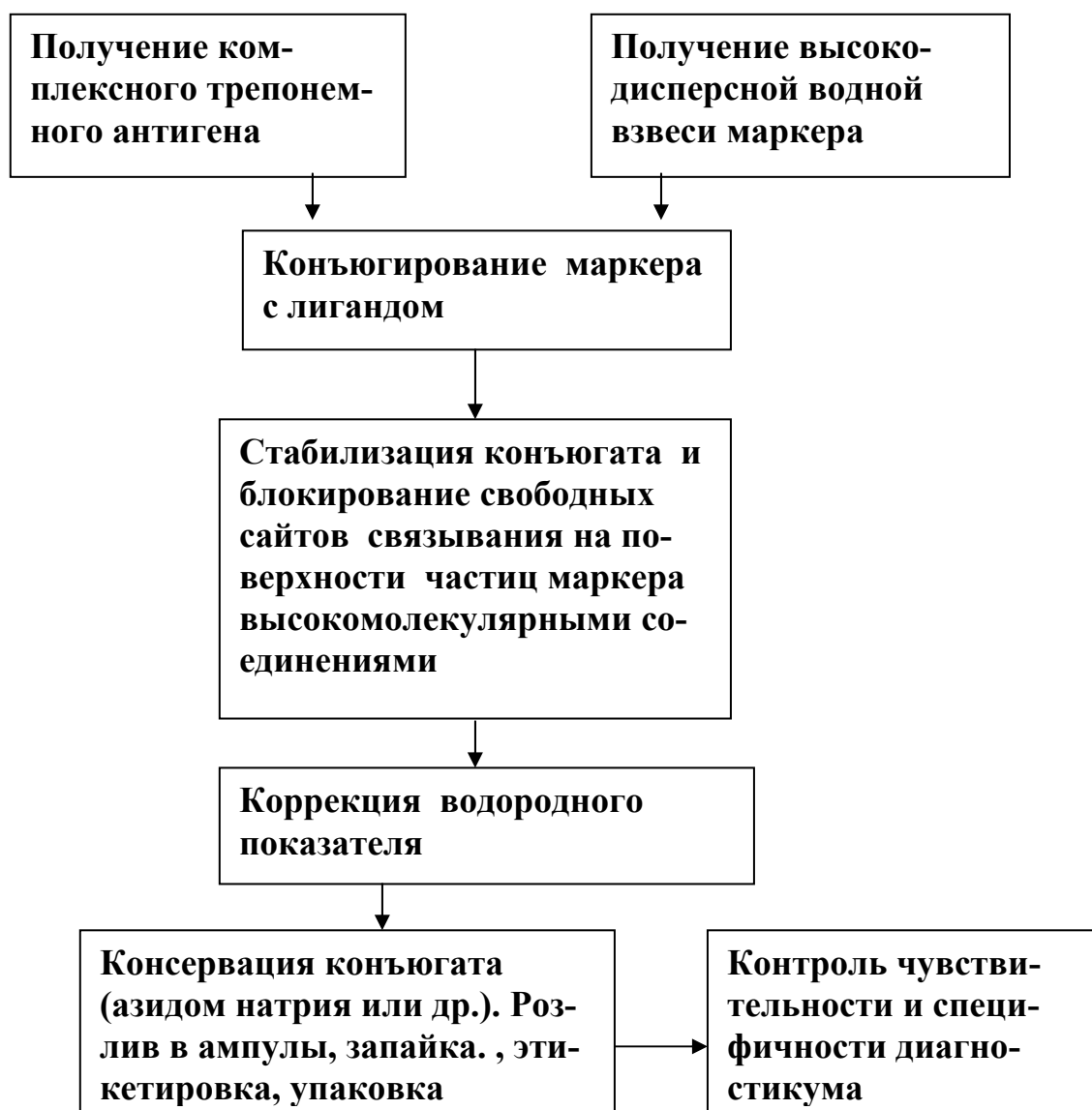
В последние годы в иммунодиагностике четко просматриваются подходы, направленные на расширение круга маркеров, повышающих специфичность и чувствительность определения, сокращающих время анализа, обеспечивающих продолжительность сохранения свойств иммунодиагностикумов и снижение себестоимости тест-систем (Коллинз У.П., 1991). Во многом эти задачи могут решаться подбором более эффективных меток, поскольку наиболее часто используемый ферментный маркер – пероксидаза хрена - имеет ряд недостатков, среди которых: относительно сложная процедура выделения и очистки функционально активного фермента и обусловленная этим значительная стоимость полученного маркера и, соответственно, - диагностикума на его основе; значительная (30-50 %) потеря активности фермента и лиганда в процессе получения конъюгата путем ковалентного связывания этих реагентов (Кривеня В.Я., Елигулашвили Р.К., 1983); необходимость обеспечения в процессе анализа строгих физиологических условий для нормального функционирования фермента (Кривеня В.Я., Елигулашвили Р.К., 1983; Березин И.В., Угарова Н.Н. Киршенгольц Б.М., 1975). Отмеченные недостатки послужили основанием для развертывания работ по изысканию хромогенных маркеров для иммунохимических реакций.

Поиски доступных, дешевых каталитически активных металлов, способных с высокой чувствительностью выявляться «физическим проявлением» обратили внимание на серебро. Имеющиеся единичные работы в доступной литературе свидетельствуют, что золь коллоидного серебра обладает рядом положительных характеристик, позволяющих использовать его в качестве маркеров специфических иммунных реагентов в иммунохимическом анализе (Патент RU №2092853, 1997; Загоскина Т.Ю., Марков Е.Ю., Калиновский А.И., 2001; Загоскина Т.Ю., Калиновский А.И., Меринов С.П. и др.,

2002; Полтавченко А.Г., Полтавченко Д.П., 2002; Полтавченко А.Г., Полтавченко Д.П., Загоскина Т.Ю., 2002; Загоскина Т.Ю., Голубинский Е.П., Меринов С.П., 2004).

Нами впервые разработана биотехнология изготовления серебросодержащего антигенного трепонемного диагностикума для дот-иммуноанализа (ДИА), которая включает следующие этапы: получение водной взвеси частиц маркера с заданной дисперсностью; конъюгирование маркера со специфическим к определяемому лиганду иммунореагентом; стабилизация конъюгатов и блокирование свободных сайтов связывания на поверхности частиц маркера высокомолекулярными биополимерами; коррекция водородного показателя водной взвеси иммунодиагностикума до параметров, необходимых для осуществления иммунохимической реакции (рисунок 17).

Получение высокодисперсной водной взвеси маркера может быть осуществлено восстановлением нитрата серебра цитратом или боргидридом (предпочтительнее) натрия. В процессе получения золь серебра мы учли рекомендацию М.И. Шалкаускаса, А.Ю. Вашкялиса (1977) и А.Г.Полтавченко с соавт. (1998) о том, что для восстановления азотнокислого серебра боргидридом натрия необходимо брать избыток последнего, поскольку только 20-30 % боргидрида участвуют в восстановлении металла, остальной за время реакции подвергается гидролизу. Кроме того, избыток боргидрида гарантирует полное восстановление ионов серебра из раствора, что предотвращает на последующих этапах приготовления иммунозоля связывание с иммунореагентами и негативное влияние на их специфическую активность (Розовский Г.И., 1971). Как показал А.Г.Полтавченко с соавт. (1998, 2002), наиболее перспективным для использования в качестве маркера является золь, полученный из 0,02% водного раствора нитрата серебра (средний размер частиц около 9 нм). Он стабилен, содержит сферические частицы с поверхностью около  $300 \text{ нм}^2$ , способен обеспечивать высокую чувствительность выявления «физическими проявителями» со значительным



**Рисунок 17. Схема получения антигенного трепонемного иммунодиагностикума с частицами коллоидного серебра**

диапазоном линейной зависимости оптической плотности от концентрации золя и сразу после приготовления имеет рН около 9,0, оптимальный для сорбции белкового лиганда.

Конъюгирование маркера со специфическим к определяемому лиганду иммунореагентом может быть осуществлено физической сорбцией или с использованием промежуточных связующих реагентов. Вследствие значительной площади поверхности частиц маркера (с поверхностью частиц золя серебра размером 1-2 мкм могут связываться сотни тысяч молекул типа

IgG) могут быть использованы иммунореагенты с относительно невысокой специфической активностью, поскольку достаточный уровень активности иммунодиагностикума может быть достигнут адсорбцией на частице маркера от нескольких сотен до нескольких тысяч активных молекул специфического иммунореагента. Большой уровень специфической нагрузки не дает выигрыша в чувствительности анализа и, более того, в ряде случаев повышает неспецифический фон определения. При отработке процедуры конъюгирования хорошие результаты получаются в процессе связывания маркера с иммунореагентом путем его дробного введения в смесь.

Важной характеристикой серебряных иммунозолей (золей, частицы которых сорбционно связаны с иммунореагентами) является их агрегативная устойчивость в процессе хранения и при проведении анализа. Агрегацию (коагуляцию) вызывают любые электролиты, но с заметной скоростью. Она начинается лишь при достижении определенной пороговой концентрации – так называемого «порога быстрой коагуляции».

В качестве стабилизаторов, предотвращающих агрегацию частиц и защищающих их от коагулирующего действия электролитов, используют высокомолекулярные природные или синтетические соединения и поверхностно активные вещества. Они связываются с поверхностью частиц посредством нековалентных связей, в основном, электростатической и гидрофобной природы, и образуют стабильные комплексы (Batteiger B., Newhall W.J., Jones R.B., 1982; Raska I., 1988).

Стабилизацию полученного конъюгата и блокирование свободных сайтов связывания на поверхности частиц маркера производят одним из известных высокомолекулярных соединений или их комбинацией.

Известно, что ионы серебра обладают бактериостатическим действием, основанным на образовании нерастворимых комплексов. Это приводит к изменению вторичной структуры белковой молекулы, что вызывает необратимую денатурацию белка. В реакцию вступают карбоксильные



группы кислых – кислотных остатков: чем больше ионизированных карбоксильных групп на молекуле белка, тем активнее она денатурируется ионами серебра. С учетом вышеизложенного при работе с серебряными иммунозолями вытекают два практически важных следствия. Во-первых, поскольку в коллоидном растворе всегда присутствуют свободные ионы серебра, они могут денатурировать молекулы иммунореагента. Чтобы избежать этого, стабилизирующий раствор должен содержать более кислый белок. Во-вторых, надежды на бактериостатические свойства серебряного золя при хранении иммунодиагностикума не всегда бывают оправданы, поскольку следовые количества ионов серебра, достаточные для инактивирования микроорганизмов в чистой воде, в иммунозоле расходуются на взаимодействие с кислыми белками стабилизирующего раствора. В связи с этим для длительного хранения необходимо вводить в состав диагностикума консервант, например, азид натрия.

Связывание белков с частицами золя тяжелых металлов в значительной степени является необратимым, однако следует учитывать, что разные участки поверхности коллоидных частиц металла обладают неодинаковой связующей способностью, а некоторые участки поверхности золь серебра вообще не связываются с белками (Джеймс Х., 1980; Raska I., 1988). Отсюда часто при выборе дозы иммунореагента исследователи ориентируются не на теоретические расчеты, а на эмпирически найденные значения.

Золи серебра мало контрастны и с увеличением размеров частиц от 5 до 100 нм изменяют окраску от светло-желтой до темно-бурой. Окраску, обусловленную непосредственно накоплением частиц золя, удастся визуальное обнаружить только при значительных скоплениях крупных частиц, дающих более интенсивный цвет на белых подложках. Высокодисперсные золи даже при их значительном накоплении на нитроцеллюлозной мембране (НЦМ) трудно визуальное зарегистрировать, поэтому для учета результатов иммуноанализа необходимо усиление сигнала.

Учитывая упомянутые выше методические приемы, мы провели ряд исследований по отработке биотехнологии изготовления трепонемного иммунодиагностикума с частицами золя серебра.

Золь серебра получали восстановлением азотнокислого серебра боргидридом натрия. Для этого к 5 мл 0,05% водного раствора боргидрида натрия одномоментно приливали равный объем 0,02% водного раствора азотнокислого серебра. Перемешивали на магнитной мешалке при комнатной температуре в течение 15 мин.

При конструировании диагностикума использовали комплексный трепонемный антиген ( глава 4).

Прежде чем комплексовать золь с лигандом, необходимо было определить количество последнего, способного стабилизировать золь, используя флоккуляционный тест. Для расчета минимального количества антигена в 10 лунок планшета для РПГА вносят по 50 мкл дистиллированной воды и титруют в них (с шагом 2) белковую суспензию. Затем в каждую лунку добавляют по 250 мкл золя, перемешивают и через 5 мин вносят по 250 мкл 10 % раствора натрия хлорида. Спустя 2-3 минуты визуально, по цвету золя, учитывают результат. Даже слабое отклонение цвета от соломенно-желтого свидетельствует о нестабильности комплекса. Для расчета оптимального количества препарата мы следовали рекомендациям I.Raska (1988). Например, в случае изменения цвета в 6-й лунке микропланшета при добавлении раствора хлорида натрия считаем, что это разбавление образца 1:32. При этом объем белковой суспензии 50 мкл/32 будет стабилизировать 250 мкл золя. Таким образом, для приготовления 10 мл диагностикума необходимо  $50/32 \times (10000 \text{ мкл}/250 \text{ мкл}) = 62,5 \text{ мкл}$ . Для большей надежности увеличиваем объем белка на 20 %, добавляя таким образом в 10 мл золя  $62,5 + 20 \% = 75 \text{ мкл}$  белка. Для длительного хранения комплекса необходима его консервация азидом натрия.

Наиболее эффективно стабилизировал золь серебра антиген в количестве 375 мкг на 10 мл золя. Исходя из этого, для приготовления диагностикума к 1 мл антигена (375 мкг белка) при постоянном интенсивном перемешивании добавляли 5 мл золя серебра. После 10-минутного перемешивания на магнитной мешалке при комнатной температуре в раствор добавляли следующую порцию золя – 3 мл, а спустя 10 мин – еще 2 мл золя и 2 мл 10 % водного раствора БСА (для блокирования свободных сайтов связывания на поверхности частиц маркера). Через 30 мин перемешивания диагностикум стабилизировали внесением равного объема 0,02 М фосфатного буфера pH 7,2, содержащего 1 % БСА, 10% НЛС и 0,04% азида натрия. Приготавливаемый препарат дополнительно интенсивно встряхивали в течение 30 минут, разливали в ампулы ШПВ-6 по 2 мл. Срок хранения диагностикума – 6 месяцев.

### ***Подбор условий постановки и учет реакции***

Постановку реакции осуществляли традиционным для дот-иммуноанализа способом. Сыворотки крови перед исследованием инактивировали при 56 °С в течение 30 мин, разводили забуференным физиологическим раствором (ЗФР) pH 7,2 с 0,5% БСА в 200 раз и титровали путем двукратного разведения до необходимой концентрации в планшете для иммунологических реакций. Каждое разведение сывороток наносили на твердофазный носитель в объеме 1 мкл в виде линейно расположенных точек. В качестве такового мы апробировали НЦМ для электрофореза «Bio-Rad», «Millipor», «Serva» и мембранные фильтры «Amicon», «Millipor», «Sinpor» и «Владипор» с различным размером пор, исходя из того, что прочность связывания ими антител и их сорбционная емкость может быть неоднозначна.

Проведенные испытания показали, что наименее пригодными оказались мембранные фильтры «Amicon», «Millipor» и «Владипор». Хорошими характеристиками обладали НЦМ и мембранные фильтры «Sinpor» (достаточная сорбционная емкость и прочность связывания наносимого материала).

После нанесения исследуемого материала (1 мкл) на мембрану мы испытывали несколько режимов иммобилизации: 20,30,40 мин при  $(20\pm 1)^\circ\text{C}$ , 10,15,20 мин при  $37^\circ\text{C}$ . Для ускорения высыхания капли можно использовать вентилятор. Все режимы сорбции были приемлемы, для дальнейшей работы нами избран режим: 10 мин при  $37^\circ\text{C}$ .

Мембрану после фиксации материала помещали в чашку Петри и однократно промывали ЗФР. Затем подложку заливали ЗФР, содержащим 1 % БСА, блокируя таким образом на ней свободные участки связывания в течение 10-15 мин при комнатной температуре. После двукратного промывания ЗФР мембрану помещали на 5-10 мин в раствор диагностикума, затем тщательно (трехкратно по 2-3 мин) промывали ЗФР и однократно - дистиллированной водой. Визуализацию результатов реакции проводили погружением мембраны в раствор проявителя на 5-8 мин.

При выполнении настоящей работы мы опробовали 14 составов проявителей для каталитического усиления сигнала серебряного золь.

Проявитель выбирали по проявляющему веществу: амидол, гидрохинон, глицин, метол, фенидон в разных сочетаниях (таблица 12).

Химические ингредиенты проявителей растворяли при температуре воды от 0 до  $5^\circ\text{C}$  (для проявителя №6 воду брали с более низкой температурой  $-18-22^\circ\text{C}$ , так как при растворении щелочи выделяется большое количество тепла).

При приготовлении раствора по рецепту нужно добавлять следующее по порядку вещество только после растворения предыдущего. При приготовлении проявителей сначала следует растворить сохраняющее вещество, затем проявляющее. Метол - исключение из этого правила, так как он труднее растворяется в растворе сульфита. В этом случае сначала растворяют в воде небольшое количество сульфита, затем метол, далее - основное количество сульфита, гидрохинон и дальнейшие составные части после того, как каждое предыдущее вещество растворилось.

Таблица 12 . Состав проявителей

№№ пп	Название химического реактива	Номера проявителей													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1.	Амидол														+
2.	Борная ки- слота кри- сталличе- ская								+	+					
3.	Бура								+	+					
4.	Гидрохинон	+		+		+	+		+	+	+	+		+	
5.	Глицин		+								+		+		
6.	Едкое кали						+								
7.	Калий бро- мистый	+		+	+	+			+		+	+		+	
8.	Краситель анилиновый									+					
9.	Метилфени- дон								+	+	+				
10.	Метол	+			+	+		+				+		+	
11.	Поташ		+			+						+			
12.	Сахар									+					
13.	Сода каль- цинирован- ная	+		+	+						+		+	+	
14.	Сульфат на- трия без- водный	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15.	Фенидон								+		+				

Результаты испытаний показали, что проявители, содержащие метол, развивали высокую оптическую плотность: исследуемые сыворотки крови, содержащие специфические антитела, проявлялись в виде серо-коричневых пятен различной интенсивности в зависимости от количественного содержания антител. В то же время остальные проявители давали светлые мало-контрастные отложения (рисунок 18).

### **Рисунок 18. Общий вид НЦМ с результатами ДИА**

*1-10 – положительные результаты в сыворотках крови  
с разным содержанием Ат  
к - отрицательный контроль;*

Картина проявления сохраняется и после небольшой передержки (более 7 мин) проявителя – диффузное серебро, восстановленное в растворе, легко отмывалось, тогда как восстановленное на сорбированных частицах золя на твердой матрице удерживалось прочно. В связи с этим в экспериментах мы использовали проявитель, содержащий метол.

Используя сконструированный иммунодиагностикум, исследовано в ДИА с коллоидным серебром 215 проб сывороток крови больных различными формами сифилиса, 55 – обследуемых на сифилис. Контрольной группой служили сыворотки крови 70 лиц, свободных от сифилитической инфекции. Эти же сыворотки параллельно оценивались в МР. Результаты испытаний, представленные в таблице 13 и рисунках 19, 20, несомненно свидетельствуют о высокой чувствительности разработанного диагностикума. Так, у 157 (73%) больных обнаруживались антитрепонемные Ат в титрах 1:400, у 58 (27%) человек – 1:800, в то же время как из 215 больных, обследованных в МР, лишь у 165 (77,3 %) больных отмечен положительный результат. Из 55 обследуемых на сифилис у 40 (72%) титр сывороток в ДИА был равен

**Таблица 13. Сравнительное исследование сывороток крови  
людей на сифилис в ДИА и МР (выборочно)**

№№ пп	№ сы- вороток	Диагноз	Результаты исследования	
			ДИА разведения сыворо- ток/ средний геомет- рический титр	МР
1	2	3	4	5
1.	6	Сифилис вторичный свежий	1:400/8,62	2+
2.	12	Сифилис первичный серопо- зитивный	1:800/9,63	4+
3.	15	-«-	1:800/9,63	4+
4.	21	-«-	1:400/8,62	3+
5.	35	-«-	1:400/8,62	4+
6.	42	Сифилис вторичный реци- дивный	1:400/8,62	4+
7.	50	-«-	1:400/8,62	Отр.
8.	57	-«-	1:400/8,62	2+
9.	64	Сифилис вторичный свежий	1:400/8,62	3+
10.	70	-«-	1:400/8,62	3+
11.	74	-«-	Отр.	Отр.
12.	75	Сифилис первичный серопо- зитивный	1:800/9,63	3+
13.	92	-«-	1:400/8,62	3+
14.	101	-«-	1:800/9,63	4+
15.	109	Сифилис вторичный свежий	1:400/8,62	Отр.
16.	115	-«-	1:400/8,62	3+
17.	120	-«-	1:400/8,62	3+
18.	125	-«-	1:800/9,63	3+
19.	131	Сифилис вторичный реци- дивный	1:400/8,62	3+
20.	135	-«-	1:400/8,62	4+
21.	145	-«-	1:800/9,63	4+
22.	159	-«-	1:800/9,63	3+
23.	172	Сифилис первичный серопо- зитивный	1:400/8,62	3+
24.	180	-«-	1:400/8,62	3+
25.	195	-«-	1:400/8,62	3+
26.	127	Сифилис вторичный свежий	1:800/9,63	4+
27.	200	-«-	1:400/8,62	Отр.
28.	210	-«-	1:400/8,62	3+
29.	212	Сифилис вторичный реци- дивный	1:400/8,62	3+
30.	215	-«-	1:800/9,63	4+
31.	256	Обследованные	1:400/8,62	Отр.
32.	265	-«-	1:400/8,62	3+
33.	275	-«-	1:400/8,62	3+
34.	286	-«-	1:800/9,63	4+
35.	290	-«-	1:400/8,62	Отр.





1:400, у 5 (9 %) – 1:800, и лишь у 10 (18,2 %) – отрицательный результат. Реакция микропреципитации с кардиолипидным антигеном у 45,7% обследуемых (25 человек) была отрицательной. Специфичность иммунодиагностикума на основе коллоидного серебра подтверждена при исследовании 70 сывороток крови лиц, свободных от сифилитической инфекции (Акт испытаний от 26.09.2004).

Таким образом, золь серебра является достаточно стандартным и легко воспроизводимым препаратом, пригодным для применения в качестве маркера иммунных реагентов. Нами впервые сконструирован высокочувствительный и высокоспецифичный иммунодиагностикум для ДИА с использованием комплексного трепонемного антигена, меченного частицами коллоидного серебра. Этот тест, в сравнении с традиционными серологическими реакциями на сифилис, более чувствителен, экспрессен, экономичен и свидетельствует о перспективности ДИА со специфическим антигеном трепонем, меченным коллоидным серебром, в качестве экспрессного ультрамикрометода лабораторной диагностики сифилиса.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последнее время насчитывается более 20 инфекций, передаваемых половым путем, среди которых сифилис занимает значительное место. Заболеваемость сифилисом в России остается крайне высокой и составляет более 143 случаев на 100 тыс. населения. По сравнению с 1989 г. число заболевших сифилисом выросло более чем в 33 раза, причем её подъем имеет многие признаки эпидемии: преобладают в структуре свежие формы; происходит рост числа детей с врожденным и приобретенным бытовым сифилисом; появились территории с показателями заболеваемости, значительно превышающими статистические показатели по стране (Аковбян В.А., Прохоренков В.И., Машкилайсон А.Л. и др. 1995; Адаскевич В.П., 1999; Родионов А.Н., 2000).

Республика Северная Осетия-Алания является регионом, где наряду с общероссийскими проблемами (увеличение числа социально неадаптированных лиц, более раннее начало половой жизни, рост проституции и др.), имеются и свои особенности, главными из которых являются высокая плотность населения, приближенность к "горячим точкам", наличие большого количества беженцев и вынужденных переселенцев, выраженность миграционных процессов.

Анализируя заболеваемость сифилисом в РСО – А по районам за пять лет, можно отметить, что она носит циклический характер, во всех районах и в г. Владикавказе наблюдается её нестабильность, со «взлётами» и «падениями». Так, подъем заболеваемости в 2003 г. (43,0 на 100 тыс.) произошёл за счёт увеличения случаев сифилиса в Пригородном (в 2 раза), Ардонском (в 2,5 раза), Кировском (более чем в 3 раза) и Алагирском (почти в 5 раз) районах. В других районах Республики и в г. Владикавказе наблюдалось некоторое снижение заболеваемости.

С 1999 г. по 2003 г. стало заметно изменение удельного веса различных форм сифилиса в сторону увеличения раннего (с 43,5% до 56,0%), появления позднего скрытого сифилиса (5,8%) и врожденного сифилиса (1,7%). С 2001 г. отмечены случаи нейросифилиса. В структуре заболеваемости преобладают скрытые формы сифилиса, которые характеризуются полным отсутствием симптоматики и выявляются только по положительным серологическим реакциям при обследовании крови в поликлиниках, стационарах, при устройстве на работу и различных профилактических осмотрах.

Основную массу больных сифилисом составляют лица обоих полов в возрасте от 20 до 39 лет. Однако в последнее время отмечается тенденция к увеличению удельного веса лиц в возрасте свыше 40 лет. По семейному положению основную массу больных составляют лица разведённые (5%), состоящие в браке повторно (13,0%) и холостые (60%), т.е. семья является одним из сдерживающих факторов в предупреждении случайных половых связей. Анализ социального состава больных сифилисом показал, что основная масса больных (78,9%) представлена нигде не работающими лицами, что в значительной мере затрудняет проведение противоэпидемических мероприятий. Среди причин, влияющих на заболеваемость, необходимо отметить возросшую сексуальную активность подростков, увеличение числа вне- и добрачных половых связей вследствие возросшей сексуальной раскрепощённости населения, коммерциализацию интимных отношений, широкое распространение порнографии, наркомании и т.д.

Таким образом, анализ заболеваемости сифилисом в Республике Северная Осетия-Алания свидетельствует о высокой тенденции распространения этого заболевания. Это обуславливает необходимость разработки и интенсивного проведения противоэпидемических мероприятий как в неблагополучных районах, так и в целом по Республике. При этом лабораторные методы играют существенную роль в системе этих мероприятий.

В централизованной лаборатории Северо-Осетинского кожновенероло-

гического диспансера во исполнение приказа МЗ № 87 с 2001 г. для исследования на сифилис широко применяются: тест быстрых плазменных реактивов (RPR), метод иммуноферментного анализа (ИФА), как скрининговый, трепонемные подтверждающие тесты - реакция пассивной гемагглютинации (РПГА) и реакция иммунофлюоресценции (РИФ), позволившие выявить большее количество поздних форм сифилиса: в 2000 г. поздний скрытый сифилис был в 2-х, в 2002 г. – уже в 4-х случаях; в 2000 г. нейросифилис не обнаруживался, а в 2002 г. – уже диагностировали 7 случаев этой тяжёлой формы болезни. Необходимо отметить, что в 12,4% случаях при установлении диагноза раннего скрытого сифилиса и 50,0% - при нейросифилисе при отрицательной реакции Вассермана ИФА была резко положительной.

Дальнейшее расширение арсенала лабораторных методов, и особенно за счет экспрессных, с помощью которых возможно исследовать большое количество людей за короткий промежуток времени и получить достоверную информацию о сложившейся ситуации по этой инфекции, дает возможность принимать оперативные меры в борьбе с заболеваемостью сифилисом.

Нами разработана биотехнология приготовления трепонемного суспензионного антигенного диагностикума для реакции агглютинации и дана оценка его диагностической ценности. Изготовление препарата осуществляли в соответствии с методикой, разработанной И.А.Базиковым (2000), в нашей модификации, используя в качестве полимерной матрицы акролар К, полученный из института биоорганической химии им. Шемякина. Гомогенные частицы латекса правильной сферической формы, окрашенные в розовый цвет имели средний диаметр  $(1,2 \pm 0,1)$  мкм.

Лигандом служил комплексный антиген, полученный по разработанной нами биотехнологической схеме, состоящий из коммерческого ультразвученного трепонемного антигена (УЗТА) для РСК производства ФГУП «Аллерген» (г.Ставрополь), подверженного специальной очистке, и цетавлонового супернатанта, представляющего собой поверхностные антигены тре-

понем, изолированные нами по методике M.C.Blake, E.C.Goschliech (1982), в соотношении 2:1. Коммерческий антиген и поверхностные антигены извлекали из культуральных бледных трепонем штаммов V, VI, VII, VIII, IX и Рейтера.

УЗТА предварительно подвергали очистке, которая заключалась в иммунсорбции неспецифических антигенов, переосаждении сульфатом аммония, гelfильтрации, стабилизации методом сублимации.

Для извлечения поверхностных антигенов использовали цетавлон, позволяющий изолировать полимерный комплекс, включающий липид, полисахарид в сочетании с протеинами и нуклеиновыми кислотами. Комплексный антиген явился в дальнейшем высококачественным сырьем при конструировании препаратов для иммунодиагностики сифилиса.

Нами получен трепонемный суспензионный диагностикум на основе полиакролеиновой матрицы. При этом отработаны оптимальные условия сенсibilизации латексных микросфер комплексным трепонемным антигеном: 0,20 мг лиганда соединяли с 2 мл с 2 % полимерного носителя. К смеси добавляли 2 мл 0,9% раствора натрия хлорида, pH 7,2. Сенсibilизацию проводили в течение 3 ч при температуре 22 °C на магнитной мешалке. Далее суспензию осаждали центрифугированием при 4000 g в течение 3-4 мин и дважды отмывали от несвязавшегося антигена. Для стабилизации трепонемного полимерного латексного диагностикума отработан оптимальный режим его лиофильного высушивания.

По вышеописанной технологии изготовлено 10 серий диагностикума. Оценка их диагностической ценности проводилась на базе централизованной лаборатории Северо-Осетинского РКВД. Для исследования были взяты сыворотки крови 416 стационарных больных до лечения и после лечения с различными диагнозами: сифилис первичный серопозитивный; сифилис вторичный свежий, сифилис вторичный рецидивный, сифилис скрытый ранний, сифилис скрытый поздний, нейросифилис ранний в сравнении с

КСР (микрореакция преципитации, реакции Вассермана, ИФА, РНГА, РИФ). Контрольной группой служили сыворотки крови 167 лиц, свободных от сифилитической инфекции.

При изучении чувствительности и специфичности диагностикума использовали два варианта постановки РАЛ: на стекле, как скрининг на сифилис (качественный тест), и титрование сывороток в микропланшетах (количественный тест). Для этого использовали 96-луночные микропланшеты для иммунологических реакций из полистирола отечественного и импортного производства.

На основании проведенных испытаний установлено, что изготовленный по разработанной нами технологии трепонемный суспензионный антигенный диагностикум позволяет проводить реакцию агглютинации латекса, по чувствительности, сопоставимую с такими трепонемными тестами, как РПГА, ИФА, РИФ, в то же время РАЛ превосходит реакции Вассермана и МР по этому показателю. При сравнительном изучении специфичности РАЛ достоверно установлена его высокая специфичность.

В последние годы в иммунодиагностике широко развиваются направления, связанные с иммунохроматографическими, иммунофильтрационными и так называемыми «дот-блот» методиками, в которых в качестве твердой фазы используют пористые мембраны, а в качестве маркера - ферменты, красители или золи металлов. В поисках доступных и дешевых каталитически активных металлов, способных выявляться «физическим проявлением», мы обратили внимание на коллоидное серебро. Золи серебра достаточно стандартны и легко воспроизводимы, а сконструированные с их участием тест-системы по чувствительности практически не уступают твердофазным методам.

Нами отработаны методические подходы при конструировании диагностикума с применением коллоидного серебра в качестве маркера трепонемного антигена для детекции в ДИА специфических антител.

Золь серебра получали восстановлением азотнокислого серебра боргидридом натрия. Для этого к 5 мл 0,05% водного раствора боргидрида натрия одномоментно приливали равный объем 0,02% водного раствора азотнокислого серебра. Перемешивали на магнитной мешалке при комнатной температуре в течение 15 мин. При конструировании диагностикума использовали комплексный трепонемный антиген.

Наиболее эффективно стабилизировал золь серебра антиген в количестве 375 мкг на 10 мл золя. Исходя из этого, для приготовления диагностикума к 1 мл антигена (375 мкг белка) при постоянном интенсивном перемешивании добавляли 5 мл золя серебра. После 10-минутного перемешивания на магнитной мешалке при комнатной температуре в раствор добавляли следующую порцию золя – 3 мл, а спустя 10 мин – еще 2 мл золя и 2 мл 10 % водного раствора БСА (для блокирования свободных сайтов связывания на поверхности частиц маркера). Через 30 мин перемешивания диагностикум стабилизировали внесением равного объема 0,02 М фосфатного буфера pH 7,2, содержащего 1 % БСА, 10% НЛС и 0,04% азида натрия. Приготавливаемый препарат дополнительно интенсивно встряхивали в течение 30 минут, разливали в ампулы ШПВ-6 по 2 мл. Срок хранения диагностикума – 6 месяцев.

Постановку реакции осуществляли традиционным для дот-иммуноанализа способом. Сыворотки крови разводили забуференным физиологическим раствором (ЗФР) pH 7,2 с 0,5% БСА в 200 раз и титровали путем двукратного разведения до необходимой концентрации в планшете для иммунологических реакций. Каждое разведение сывороток наносили на твердофазный носитель в объеме 1 мкл в виде линейно расположенных точек. В качестве такового мы апробировали НЦМ для электрофореза «Bio-Rad», «Millipor», «Serva» и мембранные фильтры «Amicon», «Millipor», «Sinpor» и «Владипор» с различным размером пор, исходя из того, что прочность связывания ими антител и их сорбционная емкость может быть неоднозначна.

Проведенные испытания показали, что наименее пригодными оказались мембранные фильтры «Amicon», «Millipore» и «Владипор». Хорошими характеристиками обладали НЦМ и мембранные фильтры «Sinpor» (достаточная сорбционная емкость и прочность связывания наносимого материала).

После нанесения исследуемого материала (1 мкл) на мембрану мы испытывали несколько режимов иммобилизации: 20,30,40 мин при  $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$ , 10,15,20 мин при  $37 ^\circ\text{C}$ . Все режимы сорбции были приемлемы, для дальнейшей работы нами избран режим: 10 мин при  $37 ^\circ\text{C}$ .

Мембрану после фиксации материала помещали в чашку Петри и однократно промывали ЗФР. Затем подложку заливали ЗФР, содержащим 1 % БСА, блокируя таким образом на ней свободные участки связывания в течение 10-15 мин при комнатной температуре. После двукратного промывания ЗФР мембрану помещали на 5-10 мин в раствор диагностикума, затем тщательно (трехкратно по 2-3 мин) промывали ЗФР и однократно - дистиллированной водой. Визуализацию результатов реакции проводили погружением мембраны в раствор проявителя на 5-8 мин.

Проявитель выбирали по проявляющему веществу: амидол, гидрохинон, глицин, метол, фенидон в разных сочетаниях. Всего нами было апробировано 14 составов проявителей для каталитического усиления сигнала серебряного золя. Результаты испытаний показали, что проявители, содержащие метол, развивали высокую оптическую плотность: исследуемые сыворотки крови, содержащие специфические антитела, проявлялись в виде серо-коричневых пятен различной интенсивности в зависимости от количественного содержания антител. В то же время остальные проявители давали светлые, малоконтрастные отложения. В связи с этим в экспериментах мы использовали проявитель, содержащий метол.

Используя сконструированный иммунодиагностикум, исследовано в ДИА с коллоидным серебром 215 проб сывороток крови больных различными формами сифилиса, 55 – обследуемых на сифилис. Контрольной группой



служили сыворотки крови 70 лиц, свободных от сифилитической инфекции. Эти же сыворотки параллельно оценивались в МР. Результаты испытаний несомненно свидетельствуют о высокой чувствительности разработанного диагностикума. Так, у 157 (73%) больных обнаруживались антитрепонемные Ат в титрах 1:400, у 58 (27%) человек – 1:800, в то же время как из 215 больных, обследованных в МР, лишь у 165 (77,3 %) больных отмечен положительный результат. Из 55 больных обследуемых на сифилис у 40 (72%) титр сывороток в ДИА был равен 1:400, у 5 (9%) – 1:800, у 10 (18,2%) - отрицательный результат. Реакция микропреципитации с кардиолипидным антигеном у 45,7% обследуемых (25 человек) была отрицательной. Специфичность иммунодиагностикума на основе коллоидного серебра подтверждена при исследовании 70 сывороток крови лиц, свободных от сифилитической инфекции.

Таким образом, нами сконструирован высокочувствительный и высокоспецифичный иммунодиагностикум для ДИА с использованием комплексного трепонемного антигена, меченного частицами коллоидного серебра. Этот тест, в сравнении с традиционными серологическими реакциями на сифилис, более чувствителен, экспрессен, экономичен и свидетельствует о перспективности использования ДИА со специфическим антигеном трепонем, меченным коллоидным серебром, в качестве экспрессного ультрамикрометода лабораторной диагностики сифилиса.

## ВЫВОДЫ

1. Впервые представлен многолетний анализ заболеваемости сифилисом в Республике Северная Осетия-Алания, выявивший её высокий уровень и тенденцию к распространению в отдельных районах Республики, что диктует необходимость проведения массовых, скрининговых профилактических обследований населения с привлечением надежных экспрессных методов лабораторной диагностики.
2. Подобран эффективный комплекс последовательных манипуляций, позволивший получить высокоспецифичный комплексный трепонемный полноценный антиген, явившийся высококачественным сырьем при конструировании препаратов для иммунодиагностики сифилиса.
3. Получен трепонемный суспензионный диагностикум на основе полиакролеиновой матрицы и комплексного антигена, обеспечивающий высокую чувствительность, специфичность, демонстративность, воспроизводимость реакции агглютинации латекса.
4. Впервые отработаны методические подходы для конструирования диагностикума с применением коллоидного серебра в качестве маркера трепонемного антигена и детекции в ДИА специфических антител. ДИА пригоден для исследования на сифилис клинического материала, характеризуется высокой чувствительностью, специфичностью, экспрессностью, простотой выполнения, демонстративностью.
5. Лабораторные и клинические испытания разработанных суспензионных антигенных диагностикумов для РАЛ и дот- иммуноанализа показали по ряду параметров свое превосходство над традиционными серологическими реакциями и перспективность их использования в качестве скринирующих тестов на сифилис.

6. Сочетание РАЛ и дот-иммуноанализа позволяет серологически верифицировать сифилис практически у 100 % пациентов и рекомендовать их применение в составе нового комплекса реакций на сифилис.