

*На правах рукописи*

ЧЕПУРЧЕНКО

Наталья Валерьевна

РЕКОМБИНАНТНЫЕ АНАЛОГИ ИММУНОДОМИНАНТНЫХ БЕЛКОВ  
ТРЕПОНЕМА PALLIDUM КАК ОСНОВА ГЕМАГГЛЮТИНАЦИОННОГО  
ДИАГНОСТИКУМА

03.00.07. - микробиология

03.00.04. - биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Нижний Новгород, 2006

Работа выполнена в ООО НПО «Диагностические системы»,  
г. Н. Новгород

Научный руководитель: доктор медицинских наук  
**Блинова Т.В.**

Официальные оппоненты: доктор биологических наук  
**Воробьева З.Г.**

доктор биологических наук  
**Анастасиев В.В.**

Ведущая организация: Нижегородская государственная  
медицинская академия

Защита состоится “ 26 ” декабря \_\_\_\_\_ 2006 г. в 13 часов  
на заседании диссертационного совета К.212.166.06. при ФГОУ ВПО  
Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского  
(603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23).

**e-mail:** [dec@bio.unn.ru](mailto:dec@bio.unn.ru)

**fax:** (8312) 65-85-92

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Нижегородского  
университета им. Н.И. Лобачевского.

Автореферат разослан “ 25 ” ноября \_\_\_\_\_ 2006 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

кандидат биологических наук

И.Ф. Александрова

### Основные сокращения и обозначения

ИФА – иммуноферментный анализ, КСР – комплекс серологических реакций, КЭ – контрольные эритроциты, ЛПР – ложноположительный результат, РИБТ – реакция иммобилизации бледных трепонем, РИФ – реакция иммунофлюоресценции, РМП – реакция микропреципитации, РПГА – реакция пассивной гемагглютинации, РСК – реакция связывания комплемента, СЭ – сенсibilизированные эритроциты.

### Общая характеристика работы

**Актуальность проблемы.** В настоящее время сифилис является важной проблемой здравоохранения во всем мире. По оценкам ВОЗ, в мире ежегодно регистрируется 12 млн. новых случаев заболевания (Hook et al., 2004). Последнее десятилетие XX века охарактеризовалось в России вспышкой заболеваемости сифилиса с максимумом в 1997 году - 277 случаев на 100 тыс. населения. Рост общей заболеваемости сифилисом вызвал значительное увеличение случаев нейросифилиса. За последние пять лет (1999-2005) число зарегистрированных случаев нейросифилиса в РФ увеличилось в 10,5 раз - с 51 до 538 (Лосева, Аншуков, 2006). Среди них отмечено преобладание стертых и скрытых форм инфекции, что затрудняет диагностику данной стадии сифилиса. В последние годы наметилась тенденция к снижению заболеваемости сифилисом, но среднероссийский показатель заболеваемости еще слишком высок – 68,6 случаев на 100 тыс. населения в 2005 году (Иванова и др., 2006). В связи с этим возрастает необходимость совершенствования лабораторной диагностики сифилиса, внедрение в практику новых диагностических тестов.

Прямая детекция возбудителя сифилиса (*Treponema pallidum subsp. pallidum*) на некоторых стадиях заболевания затруднена. Культивирование бледных трепонем на искусственных питательных средах сопряжено с большими трудностями и связано, как правило, с потерей патогенности (Овчинников и др., 1987). Использование рекомбинантных антигенов – один из способов изучения полной аминокислотной последовательности белков патогенных штаммов *T. pallidum*. Кроме того, рекомбинантные аналоги иммунодоминантных белков бледной трепонемы стандартны и безопасны.

Основную роль в постановке диагноза при сифилисе играет серодиагностика. Социальная значимость данного заболевания предъявляет ряд требований к современным иммунологическим тестам. Данные препараты должны иметь высокие показатели диагностической эффективности на всех стадиях заболевания. Диагностикумы должны быть просты в постановке, иметь короткое время проведения анализа, что дает возможность быстрого получения результата. Ценность диагностикума значительно возрастает, если с его помощью можно осуществлять контроль за проводимой терапией. В этом случае динамика титров специфических антител, выявляемых с помощью диагностикума, должна четко коррелировать с клиническими и лабораторными данными, свидетельствующими об эффективности терапии. Отвечающего всем этим

требованиям теста в диагностике сифилиса в настоящее время не существует, поэтому серодиагностика сифилиса носит комплексный характер (Дмитриев, Брагина, 1996).

Широко применяемая для диагностики сифилиса реакция пассивной гемагглютинации (РПГА) обладает одновременно качествами отборочного и подтверждающего теста: высокие показатели чувствительности, специфичности и воспроизводимости, простота постановки, возможность автоматизации, быстрота получения результатов. Используемые в настоящее время во всем мире гемагглютинационные диагностикумы для серодиагностики сифилиса созданы на основе лизатов сапрофитных и патогенных трепонем. Однако, отличаясь высокой специфичностью и чувствительностью при позднем сифилисе, РПГА тесты, основанные на трепонемных лизатах, уступают в чувствительности при первичном сифилисе тестам РИФ и ИФА (Johnston, 1972, Alessi, Scioccati, 1977, Jaffe et al., 1978, Luger et al., 1981, Pope et al., 1982). Известно, что после успешно проведенной терапии результаты РПГА, ИФА и РИФ диагностикумов длительное время остаются положительными, поэтому данные тесты не используют для оценки эффективности проводимого лечения и при посттерапевтическом контроле (Chambon et al., 1978, Hunter, 1979, Monsiorska-Borowska, 1983).

Накоплен большой опыт по повышению диагностической эффективности иммуноферментных тест-систем и иммуноблоттинга путем использования рекомбинантных аналогов антигенов возбудителя сифилиса (Гражданцева и др., 1980, Zrein et al., 1995, Каур и др., 1998, Young et al., 1998, Иванов, 2000, Sambri et al., 2001, Rostopira et al., 2003, Sato et al., 2004). Высокие показатели чувствительности и специфичности отмечены для диагностикума на основе реакции агглютинации латекса с применением рекомбинантных аналогов протеинов бледной трепонемы (Young et al., 1998).

Данные, касающиеся изучения РПГА на основе рекомбинантных антигенов для выявления антител в сыворотке крови и спинномозговой жидкости больных сифилисом в литературе отсутствуют. Появление альтернативного серологического теста, пригодного для серо- и ликвородиагностики, обогатит возможности клиницистов и иммунологов для постановки точного диагноза заболевания.

Перспективным представляется изучение динамики титров специфических антител, определяемых гемагглютинационным диагностикумом, и оценка возможности использования данного теста для контроля эффективности терапии.

**Цель и задачи исследования.** Целью работы явилось изучение иммунохимических свойств рекомбинантных аналогов основных иммунодоминантных белков TmpA, 47 кДа, 17 кДа, 15 кДа *T. pallidum* в реакции пассивной гемагглютинации на разных стадиях сифилиса, выбор рекомбинантных белков с высокой антигенной активностью и создание на их основе гемагглютинационного диагностикума.

Для достижения поставленной цели ставились следующие задачи:

1. Провести сравнительный анализ антигенных свойств рекомбинантных белков – аналогов основных мембранных протеинов TmpA, 47 кДа, 17 кДа, 15 кДа *T. pallidum* в РПГА и ИФА на разных стадиях сифилитической инфекции;

2. Выбрать рекомбинантные аналоги белков *T. pallidum* с высокой антигенной активностью и разработать на их основе технологию получения стабильного гемагглютинационного диагностикума для выявления специфических антител;

3. Провести сравнительный анализ гемагглютинационных диагностикумов на основе рекомбинантных и лизатных трепонемных антигенов на разных стадиях сифилиса;

4. Сравнить динамику титров антител к кардиолипину и к белку TmpA *T. pallidum* в процессе проведения противосифилитической терапии;

5. С использованием рекомбинантных белков методами РПГА и ИФА исследовать особенности антителопродукции в образцах ликвора и определить возможность использования гемагглютинационного теста для диагностики нейросифилиса.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Методом РПГА в образцах сывороток крови больных сифилисом определяются в основном антитела к рекомбинантному аналогу антигена TmpA *T. pallidum*, а в образцах ликвора больных нейросифилисом - к белкам TmpA и Tr17.

2. Рекомбинантные антигены - аналоги иммунодоминантных белков *T. pallidum* обладают высокой диагностической значимостью, что позволяет использовать их для создания иммунодиагностикумов.

3. Высокая корреляция динамики титров специфических и антикардиолипиновых антител позволяет использовать гемагглютинационный диагностикум на основе рекомбинантного TmpA антигена для мониторинга проводимого противосифилитического лечения и контроле в посттерапевтический период.

#### **Научная новизна исследования.**

Впервые методом РПГА исследованы иммунохимические свойства четырех рекомбинантных антигенов – аналогов иммунодоминантных белков TmpA, 47, 17 и 15 кДа *T. pallidum*.

Установлено, что гемагглютинационными диагностикумами в образцах сывороток крови больных сифилисом на разных стадиях инфекции определяются преимущественно антитела к белку TmpA.

Показано, что гемагглютинационный диагностикум, основанный на использовании рекомбинантного белка – аналога иммунодоминантного эпитопа TmpA антигена *T. pallidum*, может использоваться для ликвородиагностики при нейросифилисе.

Впервые показана возможность использования гемагглютинационного диагностикума на основе рекомбинантного аналога белка TmpA для оценки эффективности противосифилитического лечения и при контроле в посттерапевтический период.

**Практическая значимость.** На основе формализированных куриных эритроцитов, сенсибилизированных рекомбинантным антигеном TmpA, сконструирован РПГА тест для диагностики сифилиса. Разработанная тест-система «ДС-РПГА-анти-Люис» может применяться в комплексной диагностике заболевания в качестве скринингового и подтверждающего теста. Данный гемагглютинационный диагностикум адаптирован для тестирования образцов ликвора, что позволяет использовать его для выявления поражений ЦНС при сифилисе. Созданный гемагглютинационный диагностикум может использоваться для подтверждения динамических изменений титров антикардиолипиновых иммуноглобулинов, определяемых РМП, при проводимом лечении и в посттерапевтический период.

Разработан проект научно-технической документации на гемагглютинационный диагностикум для определения специфических антител к *T. pallidum* «ДС-РПГА-анти-Люис». В ООО НПО «Диагностические системы» налажен выпуск производственно-экспериментальных серий данной тест-системы.

Подана заявка № 2006112226 на патент РФ на изобретение.

**Апробация работы.** Результаты работы доложены на Научно-практической конференции «Актуальные вопросы инфекционной патологии», Барнаул, 1999 г., на VIII Всероссийском съезде дерматовенерологов, Москва, 2001 г., на Первом Российском конгрессе дерматовенерологов, Санкт-Петербург, 2003 г., Всероссийской конференции дерматовенерологов «Современные направления диагностики, лечения и профилактики ИППП и дерматозов», Нижний Новгород, 2004 г., на 15-м Европейском Конгрессе клинической микробиологии и инфекционных заболеваний, Копенгаген, Дания, 2005 г., на IX Всероссийском съезде дерматовенерологов, Москва, 2005 г., на Курсах информации для врачей курируемой зоны по лабораторной диагностике ИППП, Нижний Новгород, 2005 г., на Областной научно-практической конференции «Итоги деятельности дерматологической службы Нижегородской области в 2005 г.», Нижний Новгород, 2006 г., на Областной научно-практической конференции «Актуальные вопросы дерматологии», Тюмень, 2006 г., на V съезде дерматологов и венерологов Республики Беларусь, Минск, 2006 г., на VI Научно-практической конференции «Социально значимые заболевания в дерматовенерологии. Диагностика, терапия, профилактика», Москва, 2006 г.

**Структура и объем диссертации.** Материал диссертации изложен на 132 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, характеристики материалов и методов исследования, глав результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, содержащего 226 источников на русском языке и на иностранных языках. В текст включены 22 таблицы и 10 рисунков.

По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, в том числе одна в центральной печати.

## Материалы и методы исследования

### **Рекомбинантные аналоги иммунодоминантных белков *T. pallidum*.**

Для конструирования гемагглютинационного диагностикума использовались рекомбинантные антигены – аналоги иммунодоминантных белков 42-44,5 кДа (TnpA), 15 кДа (Tp15), 17 кДа (Tp17) и 47 кДа (Tp47) *T. pallidum*, полученные в ООО НПО «Диагностические системы». Каталожные номера трепонемных рекомбинантных антигенов: Tp17 - ASIF 101; TnpA - ASIF 102; Tp47 - ASIF 103; Tp15 – ASIF 105.

**Исследуемый материал.** Для исследования иммунохимических свойств рекомбинантных белков в рамках двух методов диагностики сифилиса РПГА и ИФА и для оценки чувствительности гемагглютинационных тестов были использованы 643 образца сывороток крови больных сифилисом разных стадий и 233 образца сывороток крови пациентов, получивших специфическое лечение по поводу сифилиса, любезно предоставленные Нижегородским научно-исследовательским кожно-венерологическим институтом – НИКВИ (зав. лаборатории к.б.н. Комарова В.Д.), Сормовским кожно-венерологическим диспансером, г. Н.Новгорода (зав. лаборатории Моржина Е.В.), Областной больницей для осужденных при ГУИН МЮ Нижегородской области (зав. лаборатории Серпухова О.Н.). На наличие противотрепонемных антител были исследованы образцы сывороток крови 87 человек, направленных на обследование на сифилис.

Образцы сывороток крови больных активными формами заболевания включали 150 образцов от больных первичным сифилисом (23,3%), 252 образца от больных вторичным сифилисом (39,2%), 221 – от больных скрытым сифилисом (34,4%), 20 – от больных поздним сифилисом (3,1%). Группу больных поздним сифилисом в свою очередь составили 10 больных с поздним скрытым сифилисом, 1 больной сифилисом сердечно-сосудистой системы и 9 больных нейросифилисом. Диагноз «сифилиса» у всех больных был установлен на основе анамнеза, данных клинического и лабораторного обследования, а также подтвержден положительными реакциями в стандартных серологических тестах (РМП, РСК с кардиолипидным и трепонемным антигенами, РИБТ, РИФ). Возраст больных составил от 14 до 69 лет. Значительная часть больных (69,2%) находилась в возрасте наибольшей половой активности (до 30 лет). Среди обследованных больных было 326 мужчин и 317 женщин.

У 44 пациентов исследовалась динамика титров специфических антител в сыворотке крови в процессе проводимого лечения (23 больных с диагнозом сифилис вторичный, 13 - сифилис скрытый и 8 – сифилис поздний). Лечение больных сифилисом проводилось с использованием бензилпенициллина по рекомендованным МЗ РФ схемам. Титры противотрепонемных антител также определялись в парных сыворотках 4 больных с диагнозом серорезистентность, получающих дополнительное лечение. Первый образец сыворотки у каждого больного брался перед

началом терапии, а второй – через 2 - 8 недель после начала лечения. Динамика титров специфических антител была изучена у 5 пациентов, находящихся на сероконтроле после проведенной противосифилитической терапии, с периодичностью взятия образца сыворотки крови через 1-5 месяцев.

Для оценки возможности использования гемагглютинационного теста на основе рекомбинантных антигенов для диагностики нейросифилиса были исследованы предоставленные Нижегородским НИКВИ 13 парных образцов (сыворотка – ликвор) от больных сифилисом с поражением нервной системы, 9 парных образцов от больных сифилисом без поражения нервной системы и 2 парных образца от лиц, получивших лечение по поводу нейросифилиса и находящихся на сероконтроле. Кроме того, анализировались 3 образца ликвора от больных сифилисом с поражением нервной системы, 4 образца ликвора от больных сифилисом без поражения нервной системы и 1 образец ликвора от пациента, получившего лечение по поводу нейросифилиса. Диагноз нейросифилиса устанавливался на основе клинических данных и результатов серологических тестов РИФ, ИФА, РМП, РСК с кардиолипидным и трепонемным антигенами. Для проверки специфичности РПГА тестов использовались 2478 образцов сывороток крови от лиц, не страдающих сифилитической инфекцией, среди них: образцы сывороток 1918 здоровых доноров (предоставлены Нижегородской областной станцией переливания крови, зав. отделением Кошечева Н.А. и Дзержинской станции переливания крови, Нижегородская обл., зав. отдела заготовки крови Окатышева Н.А.), 96 больных ВИЧ-инфекцией, 54 больных острым гепатитом А, 47 больных гепатитом В, 143 больных гепатитом С (коллекция сывороток крови НПО «Диагностические системы»), 48 больных лейкозом детей (предоставлены Областной детской больницей, г. Н.Новгород, зав. кафедрой детских инфекций д.м.н. Краснов В.В.), 8 больных клещевым энцефалитом (предоставлены Алтайским краевым центром СПИД, г. Барнаул, зав. лабораторией Белых С.И.), 52 беременных (предоставлены Семеновской районной больницей, Нижегородская обл., зав. лаб. Комарова О.А.), образцы сывороток 54 лиц с неспецифическими результатами тестирования в КСР и ИФА тестах, 48 больных хламидиозом, 10 больных половым герпесом (предоставлены Сормовским КВД и Нижегородским НИКВИ). Все образцы сывороток здоровых доноров не содержали антител к *T. pallidum*, к ВИЧ -1,2, к вирусу гепатита С и HBsAg.

**Тест-системы сравнения.** Сравнение диагностической эффективности гемагглютинационного теста проводилось со следующими тест-системами:

1. «Syphilis TRNA test» - «Human», Германия, кат. № 50101; с. 2348, годен до 10.2006;
2. «Serodia-TR-PA» - «Fujirebio Inc.», Япония, кат. № 6391, с. 51207, годен до 12.2006.
3. «Люис РПГА тест» - ООО «Ниармедик Плюс», г. Москва, кат. № 7-02-3, с. 230704, годен до 06.2005;



4. «Сифилис РПГА-тест» - ЗАО «ЭКОлаб», г. Электрогорск, кат. № 0306, с.8, годен до 06.2005;

5. «ИФА-АНТИ-ЛЮИС-GM» - НПО «Диагностические системы», г. Н.Новгород, кат. № L – 154, с.5, годен до 18.11.06;

6. «ЛЮИС-ТЕСТ» - НПО «Диагностические системы»; г. Н.Новгород, кат. № L – 332, с.4, годен до 06.06.07;

Результаты РИФ, РИБТ, РСК с трепонемным и кардиолипидным антигенами, РМП любезно предоставлены Нижегородским НИКВИ.

**Гемагглютинационный тест, основанный на рекомбинантных антигенах.** При разработке технологии производства гемагглютинационного теста были использованы куриные эритроциты, полученные из крови бойлеров Линдовской птицефабрики Нижегородской обл. Реакция проводилась на круглодонных планшетах фирмы ВНИИМедПолимер, г. Санкт-Петербург.

Применялись методы:

1. Стабилизация эритроцитов формалином.
2. Сенсibilизация эритроцитов в присутствии хлорного хрома.
3. Сенсibilизация эритроцитов в присутствии риванола.
4. Сенсibilизация эритроцитов в присутствии глутарового альдегида.
5. Стабилизация СЭ и КЭ в защитной среде.
6. Лиофильная сушка СЭ и КЭ.
7. Определение стабильности СЭ ускоренным методом.

**Иммуноферментный анализ.** Для выявления антител к возбудителю сифилиса была использована модель твердофазного, неконкурентного, двустадийного ИФА, где на поверхность полистиролового планшета иммобилизованы рекомбинантные аналоги антигенов *T. pallidum*, в качестве конъюгата использованы меченные пероксидазой хрена моноклональные антитела к иммуноглобулинам IgG и IgM человека (ООО «Сорбент», г. Москва). В качестве хромогена применялся тетраметилбензидин (ТМБ). Твердой фазой во всех вариантах ИФА служили 96-луночные плоскодонные планшеты фирмы Nunc Polysorp F8, Дания.

**Статистическая обработка результатов.** Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием общеупотребительных методов параметрической и непараметрической статистики (Гланц, 1998). Для оценки межгрупповых различий применяли t-критерий Стьюдента. При сравнении качественных признаков пользовались двусторонним вариантом точного критерия Фишера и критерием  $\chi^2$  с поправкой Йейтса для четырехпольных таблиц и критерием  $\chi^2$  для произвольной таблицы сопряженности. Критический уровень достоверности нулевой статистической гипотезы (об отсутствии значимых различий) принимали равным 0,05. Если значения вероятности p находились в интервале от 0,05 до 0,1, то данная ситуация рассматривалась как тенденция к значимому изменению параметров и показателей.

## Результаты исследований и их обсуждение

### 1. Изучение иммунохимических свойств рекомбинантных антигенов – аналогов иммунодоминантных белков *T. pallidum*. Сравнительный анализ антигенных свойств рекомбинантных белков в РПГА и ИФА.

Используя известные методики сенсibilизации белковыми сенситинами эритроцитов при изготовлении гемагглютинационных диагностикумов, были испытаны следующие конъюгирующие агенты: глутаровый альдегид, риванол и хлорный хром. Сенсibilизация формализированных куриных эритроцитов рекомбинантными аналогами антигенов *T. pallidum* в присутствии 0,33% раствора хлорного хрома была наиболее эффективной. Только с помощью эритроцитов, сенсibilизированных в присутствии хлорного хрома, результаты реакции можно было разделить на положительные и отрицательные в соответствии с поставленным диагнозом, спонтанной агглютинации при этом не наблюдалось. Сенсibilизация в присутствии раствора хлорного хрома проводилась при 42 °С в течение 60 минут.

Формализованные куриные эритроциты были сенсibilизированы отдельными рекомбинантными белками, воспроизводящими основные иммунодоминантные протеины TrpA, 47, 17 и 15 кДа *T. pallidum* (диапазон концентраций 0,1 - 8 мг/мл). Для рекомбинантных антигенов были подобраны оптимальные концентрации: TrpA – 0,25 мг/мл, Trp47 – 0,24 мг/мл, Trp17 – 0,29 мг/мл, Trp15 – 0,25 мг/мл.

Сравнительное изучение иммунохимических свойств рекомбинантных белков методом РПГА проводилась с использованием двух референс-панелей сывороток крови. Результаты исследования представлены в табл. 1.

Таблица 1.

Чувствительность РПГА диагностикумов с использованием отдельных рекомбинантных антигенов

Стадии сифилиса	Рекомбинантные антигены			
	TrpA	Trp47	Trp17	Trp15
первичный, n = 74	94,6%	59,5%	40,5%	56,8%
вторичный, n = 109	99,1%	94,5%	92,7%	94,5%
скрытый, n = 120	99,2%	97,5%	97,5%	97,5%
леченый, n = 112	68,7%	83%	88,4%	74,1%

Из приведенных результатов видно, что при тестировании образцов сывороток больных сифилисом максимальный показатель чувствительности был получен в РПГА-тесте, где в качестве сенситина использовался рекомбинантный TrpA белок, причем в шести пробах обнаружены антитела только к данному антигену. Полученные результаты совпадают с данными других исследователей (Ijsselmuiden et al., 1989, Stienstra et al., 1992,

Гражданцева, 2000, Иванов, 2000), показавших высокую антигенную активность TmpA белка *T. pallidum*.

В трех образцах с клинически и серологически подтвержденным диагнозом сифилис первичный в РПГА не было обнаружено противотрепонемных антител ни к одному антигену, и в одном образце присутствовали антитела только к Tr47 и Tr15. Если для сифилиса первичного чувствительность теста на основе TmpA была значительно выше чувствительности остальных РПГА тестов ( $p < 0,05$ ), то для стадий вторичного, латентного и позднего сифилиса уровень антител к данному антигену соотносился с высокими уровнями специфических иммуноглобулинов ко всем трепонемным антигенам ( $p > 0,05$ ). Тестирование образцов сывороток пациентов, находящихся на контроле в посттерапевтический период, показало, что процент положительных результатов был минимальным в TmpA-РПГА, но достоверно не отличался от процента положительных результатов, полученных в Tr15-РПГА ( $p > 0,05$ ), уступая тестам Tr47-РПГА и Tr17-РПГА ( $p < 0,05$ ). Это может свидетельствовать о том, что антитела к белку TmpA первыми исчезают в сыворотке крови больных после адекватно проведенной терапии, что согласуется с данными нескольких авторов (Ijsselmuiden et al., 1989, Schouls et al., 1989, Кочанова, 2002, Иванов и др., 2005). Учитывая, что помимо создания высокочувствительного диагностикума ставилась задача конструирования теста, пригодного для контроля за эффективностью лечения, был выбран белок TmpA, показавший результаты, отвечающие заявленным требованиям.

Все РПГА тесты с использованием отдельных антигенов показали высокую специфичность: TmpA – 99%, Tr47 – 96,7%, Tr17 – 99,3%, Tr15 – 98,2% ( $p > 0,05$ ).

Учитывая, что каждый диагностический формат имеет свои ограничения, был проведен сравнительный анализ антигенных свойств рекомбинантных белков – аналогов основных мембранных протеинов TmpA, 47 кДа, 17 кДа, 15 кДа *T. pallidum* в РПГА и ИФА на разных стадиях сифилитической инфекции.

Рекомбинантные антигены были индивидуально сорбированы в лунки иммунологического планшета. Диапазон концентраций антигенов составил от 1 до 10 мкг/мл. Для рекомбинантных белков были выбраны следующие оптимальные концентрации: TmpA – 5 мкг/мл, Tr47 – 4 мкг/мл, Tr17 – 5,25 мкг/мл, Tr15 – 5,75 мкг/мл. Концентрация IgG-конъюгата составила 1:20 000 и IgM-конъюгата – 1:5000. В табл. 2 приведены данные по чувствительности ИФА-тестов, основанных на отдельных рекомбинантных антигенах.

При исследовании спектров антител, соответствующих различным стадиям сифилитической инфекции, иммуноферментными методами наблюдалась несколько иная картина, чем в РПГА. Особенно отчетливо разница в детекции антител к отдельным рекомбинантным антигенам ( $p < 0,05$ ) проявилась при первичном и леченом сифилисе, когда количество специфических иммуноглобулинов в сыворотке крови незначительно.

Большинство больных с первичной стадией заболевания имело антитела к белку Tr47. Разница в чувствительности Tr47-ИФА и TmpA-ИФА тестов была недостоверной ( $p > 0,05$ ). Число образцов сывороток с антителами к Tr17 и Tr15 антигенам было минимальным на стадии первичного сифилиса как при тестировании в РПГА, так и в ИФА ( $p < 0,05$ ). Среди образцов сывороток больных первичным сифилисом найдены 3 сыворотки, в которых методом ИФА выявлены антитела только к Tr47, и 1 сыворотка с антителами только к TmpA. Это подтверждает необходимость присутствия Tr47 и TmpA в комплексе антигенов, используемом в ИФА диагностикумах. В спектре специфических антител в образцах сывороток больных активным сифилисом, начиная со вторичной стадии, как правило присутствуют иммуноглобулины ко всем четырем рекомбинантным антигенам, с небольшим преимуществом к Tr17 ( $p > 0,05$ ).

Если расположить рекомбинантные антигены в порядке убывания процента определяемых к ним антител во всех положительных образцах от больных активным сифилисом, то для РПГА эта последовательность будет следующей: TmpA – 98%, Tr47 – 87,1%, Tr15 – 86,5%, Tr17 – 81,9%; для ИФА: Tr47 – 95,6%, TmpA – 95,3%, Tr17 – 92,2%, Tr15 – 89,3%. Разница в частоте детекции антител к антигенам Tr47 и Tr17 методами ИФА и РПГА оказалась достоверной ( $p < 0,05$ ), практически одинаково выявлялись антитела к антигенам TmpA и Tr15 ( $p > 0,05$ ). Последовательность показателей чувствительности тестов при исследовании образцов от лиц, находящихся на сероконтроле после проведенной терапии, имела вид - для РПГА: Tr17 – 88,4%, Tr47 – 83%, Tr15 – 74,1%, TmpA – 68,7%; для ИФА: Tr17 – 100%, Tr15 – 86,2%, Tr47 – 56,1%, TmpA – 48,8%. Чаще всего обоими методами у больных, получивших лечение, определялись антитела к белку Tr17 (в ИФА Tr17 достоверно отличался от других антигенов ( $p < 0,05$ ); в РПГА Tr17 недостоверно отличался от Tr47 ( $p > 0,05$ )). Реже всего определялись антитела к рекомбинантному антигену TmpA (в ИФА TmpA недостоверно отличался от Tr47 ( $p > 0,05$ ); в РПГА TmpA недостоверно отличался от Tr15 ( $p > 0,05$ )).

Таблица 2.

Чувствительность ИФА-тестов с использованием отдельных рекомбинантных антигенов

Стадии сифилиса	Рекомбинантные антигены			
	TmpA	Tr47	Tr17	Tr15
первичный, n = 84	88,1%	91,7%	71,4%	62,5%
вторичный, n = 128	99,2%	99,2%	100%	99,2%
скрытый, n = 107	96,3%	94,4%	99,1%	97,8%
леченый, n = 41	48,8%	56,1%	100%	86,2%

Возможной причиной разницы спектров антител к рекомбинантным антигенам, определяемых ИФА и РПГА, могли быть особенности экспозиции

рекомбинантных белков на поверхности твердых носителей в иммуноферментном и гемагглютинационном диагностикумах. В зависимости от связи белка с носителем развиваются конформационные изменения, сопровождающиеся появлением новых, либо экранированием имеющихся детерминант или, напротив, усилением их реакционной способности. От конформации белка зависит какие субклассы антител будут связываться с доступными антигенными детерминантами.

Результаты нашей работы подтверждают полученные ранее данные (Гражданцева, 2000, Иванов, 2000, Кочанова, 2002, Rostopira, 2003) о том, что вероятность обнаружения специфических иммуноглобулинов к исследованным антигенам возрастает с увеличением остроты инфекционного процесса и длительности заболевания. Наши исследования подтвердили данные других авторов, что антитела к белку TmpA первыми исчезают после успешно проведенной терапии сифилиса (Иванов и др., 2005). Число образцов сывороток, содержащих преимущественно антитела к Trp17, от лиц, получивших полноценное лечение по поводу сифилиса, было максимальным. Это согласуется с данными, приведенными в работах А.А. Гражданцевой (2000) и М.В. Кочановой (2002).

## **2. Разработка технологии производства гемагглютинационного диагностикума «ДС-РПГА-анти-Люис», основанного на рекомбинантном антигене TmpA. Характеристики теста «ДС-РПГА-анти-Люис».**

Для создания гемагглютинационного диагностикума были выбраны формализированные куриные эритроциты, сенсibilизированные рекомбинантным аналогом TmpA антигена бледной трепонемы (концентрация 0,25 мг/мл) в присутствии хлорного хрома.

Постановка реакции осуществлялась в оптимальном режиме для проведения РПГА на формализированных куриных эритроцитах: в качестве реакционной смеси выбран физиологический раствор, рабочее разведение образца сыворотки крови 1:80, температура реакции от 20 до 24 °С, время проведения реакции 30-40 минут. Образец сыворотки тестировался параллельно в двух лунках планшета с СЭ и КЭ.

Показано, что прогревание образцов сывороток крови позволило сократить число неспецифических результатов с СЭ и КЭ с 30,2% до 9%.

Введение в раствор для разведения образцов 0,05% концентрата клеточного лизата *E. coli* (СОП-ТП-ГИБ-009.01., ООО НПО «Диагностические системы») и концентрирование суспензии СЭ с 1% до 1,25% позволило сократить число ЛПР при тестировании сывороток здоровых доноров до 1,2%, а число неспецифических реакций до 1,5% при сохранении высоких показателей чувствительности гемагглютинационного диагностикума.

В раствор для разведения образцов был введен краситель-индикатор бромфеноловый синий в концентрации 0,002%, что позволило облегчить постановку реакции.

Оценка чувствительности гемагглютинационного диагностикума, получившего рабочее название «ДС-РПГА-анти-Люис», проводилась на панели из 467 образцов сывороток крови больных сифилисом. Чувствительность тест-системы составила 98,7% (при первичном сифилисе – 95,2%, при вторичном – 99,3%, при скрытом – 99,5%, при позднем – 100%).

Специфичность тест-системы «ДС-РПГА-анти-Люис», оцененная на 1918 образцах сывороток крови здоровых доноров, составила 98,8%.

Оценка воспроизводимости диагностикума проводилась на восьми образцах сывороток. Отклонение в один титр допускалось. Результаты исследований представлены в табл. 3. Воспроизводимость теста «ДС-РПГА-анти-Люис» составила 100%.

Таблица 3.

Воспроизводимость теста «ДС-РПГА-анти-Люис»

Сыворотки больных	Число повторов постановки образцов, показавших реактивность				
	4+	3+	2+	1+	слабопол. отриц.
Первичный сифилис					
образец N1				9	1
образец N2			10		
Вторичный сифилис					
образец N3	10				
образец N4		7	3		
Скрытый сифилис					
образец N5	9	1			
образец N6	10				
Сыворотка с ЛПР в РМП					
образец N7					10
образец N8					10

Исследовались группы сывороток больных инфекционными заболеваниями, онкозаболеваниями и сывороток беременных женщин. Проводилось определение числа ЛПР при использовании нового гемагглютинационного диагностикума. Результаты исследований представлены в табл. 4.

Минимальные показатели специфичности были получены при исследовании образцов сывороток больных острым гепатитом А, это касалось как числа ЛПР, так и числа неспецифических реакций одновременно с СЭ и КЭ. Возможно, характерная для острой фазы гепатита А повышенная концентрация билирубина в сыворотке крови, гомологичного по строению с гемоглобином, является причиной неспецифических взаимодействий в РПГА.

ЛПР и неспецифические реакции в тест-системе «ДС-РПГА-анти-Люис»

Диагноз	Число образцов	Число неспецифических реакций с СЭ и КЭ	ЛПР
Гепатит А острый	54	25 (46,3%)	6 (11,1%)
Гепатит В хронический	47	0	4 (8,5%)
Гепатит С хронический	143	0	7 (4,9%)
Лейкоз	48	0	1 (2,1%)
ВИЧ инфекция	96	1 (1%)	6 (6,2%)
Хламидиоз	48	0	1 (2,1%)
Половой герпес	10	0	0
Клещевой энцефалит	8	0	0
Беременность	52	0	1 (1,9%)
Здоровые доноры	1918	19 (1,5%)	23 (1,2%)

Из полученных данных видно, что ЛПР и неспецифические реакции в гемагглютинационном диагностикуме, основанном на рекомбинантном антигене, при хламидиозе, половом герпесе, клещевом энцефалите, беременности и у больных лейкозом детей либо отсутствуют, либо их число было статистически близко к числу неспецифических результатов при тестировании сывороток здоровых доноров ( $p > 0,05$ ). Частота встречаемости ЛПР в гемагглютинационном диагностикуме при остром гепатите согласуется с данными других исследователей (Балашов, 1981). Число ЛПР в гемагглютинационном диагностикуме при ВИЧ инфекции составило 6,2%.

Известно, что РПГА диагностикумы, благодаря своей высокой специфичности, используются для исключения биологических ложноположительных результатов (БЛПР) отборочных кардиолипидных тестов. Проводились исследования возможности использования гемагглютинационного диагностикума на основе рекомбинантного антигена TmpA для исключения ЛПР нетрепонемных (РМП, РСК с кардиолипидным антигеном) и трепонемных тестов (РСК с трепонемным антигеном, ИФА). Результаты исследований приведены в табл. 5.

Число исключенных с помощью гемагглютинационного диагностикума ЛПР, полученных как в кардиолипидных, так и в трепонемных тестах, были достоверно близки ( $p > 0,05$ ). Представленные результаты подтверждают высокую специфичность гемагглютинационного диагностикума, основанного на рекомбинантном белке.

Сравнение тест-систем «ДС-РПГА-анти-Люис» и «ИФА-анти-Люис» проводилось на панели образцов сывороток крови от больных сифилисом на разных стадиях: первичный – 52, вторичный – 96, скрытый – 159 образцов. Совпадение положительных результатов, полученных в РПГА и ИФА, составило 99,7%. Образец сыворотки от одного больного первичным сифилисом был позитивен только в ИФА.

Таблица 5.

Сравнение числа ЛПР в тестах для диагностики сифилиса и в тест-системе «ДС-РПГА-анти-Люис»

Тест	Число образцов с ЛПР	«ДС-РПГА-анти-Люис»	
		Положительный результат	Отрицательный результат
РМП	33	12 (36,4%)	21 (63,6%)
РСКкард.	21	8 (38,1%)	13 (61,9%)
РСКтреп.	38	12 (31,6%)	26 (68,4%)
«ИФА-анти-Люис»	40	16 (40,0%)	24 (60,0%)

В качестве образцов для сравнения диагностикумов «ДС-РПГА-анти-Люис» и «Люис-теста» (аналога RPR) были отобраны сыворотки больных: первичным сифилисом – 4, вторичным – 33, скрытым – 29 и поздним – 7 образцов. Тесты совпали по числу выявленных положительных образцов в 98,6%. Один образец сыворотки от больного скрытым сифилисом был позитивен только в РПГА диагностикуме.

Установлено, что тест-системы «ДС-РПГА-анти-Люис», «ИФА-анти-Люис» и «Люис-тест» сопоставимы по чувствительности.

В настоящее время частью практических лабораторий для диагностики сифилиса используется КСР, включающий в себя РМП, РСК с кардиолипидным и трепонемным антигенами. Проводилось сравнение чувствительности теста «ДС-РПГА-анти-Люис» и тестов, входящих в КСР. Результаты исследований представлены в табл. 6.

Таблица 6.

Сравнение чувствительности теста «ДС-РПГА-анти-Люис» и КСР

Стадии сифилиса	«ДС-РПГА-анти-Люис»	КСР		
		РМП	РСКкард.	РСКтреп.
первичный, n=36	97,2%	58,3%	63,9%	83,3%
вторичный, n=78	100%	98,9%	98,9%	100%
скрытый, n=138	100%	96,2%	97,4%	98,7%

Полученные результаты подтверждают данные ГУ ЦНИКВИ МЗ РФ (Приказ МЗ РФ № 327 от 25.07.2003.) о более высокой чувствительности РПГА по сравнению с реакциями КСР при диагностике сифилиса. Особенно наглядно преимущество гемагглютинационного диагностикума проявилось при тестировании образцов сывороток больных первичным сифилисом ( $p < 0,05$  при сравнении РПГА с РМП и РСК с кардиолипидным антигеном.;  $0,05 < p < 0,1$  при сравнении РПГА с РСК с трепонемным антигеном).



С целью определения сроков хранения препарата проводилось изучение стабильности СЭ методом термодеградациии по Методическим рекомендациям ГИСК им. Л.А.Тарасевича «Определение стабильности Отраслевых Стандартных Образцов (ОСО) и других МИБП ускоренным методом». Предполагаемая температура хранения диагностикума «ДС-РПГА-анти-Люис» - 4°C. СЭ хранились в жидком виде с добавлением консерванта 0,1% азида натрия. В качестве повышенных температур были выбраны температуры 37°C, 42°C и 47°C. В качестве контролируемого параметра был выбран титр специфических антител в тестируемом образце сыворотки больного сифилисом скрытым. Титр специфических антител в образце сыворотки - 1:5120 (в четырех повторах) был принят за исходный 100% уровень. В каждой контрольной точке исследовались по три образца СЭ, хранящихся при разных температурах. С анализируемыми образцами СЭ определялся титр противотрепонемных антител в образце сыворотки (в четырех повторах), выраженный в процентах от исходного уровня.

Если в качестве критерия стабильности препарата принять падение титра антител в исследуемом образце сыворотки на 1 титр (14,3%), то время хранения СЭ, определенное методом термодеградациии, составило 478 дней или 1 год 4 месяца.

В реальном времени при температуре 4°C оценивалось хранение компонентов тест-системы «ДС-РПГА-анти-Люис» в жидком и сухом виде. Хранение в жидком виде оценивалось на трех лабораторных сериях препарата. Снижение титров специфических антител для четырех сывороток больных сифилисом из шести в производственно-экспериментальной серии №1 произошло к одному году хранения. Критический уровень антител – падение титра на один во всех образцах к 1 году и 4 месяцам хранения, спрогнозированному методом термодеградациии СЭ, не был достигнут.

В качестве альтернативного было оценено хранение СЭ и КЭ в лиофилизированном виде при температуре 4°C. Полученные результаты хранения лиофилизированных СЭ и КЭ в течение двух, пяти, восьми и двенадцати месяцев показали 100% сохранения активности препарата.

Результаты исследований свидетельствуют о хорошей стабильности теста «ДС-РПГА-анти-Люис».

### **3. Сравнительный анализ гемагглютинационных диагностикумов на основе рекомбинантных и лизатных трепонемных антигенов на разных стадиях сифилиса.**

«ДС-РПГА-анти-Люис» - первый в мире гемагглютинационный тест для диагностики сифилиса, основанный на рекомбинантном аналоге иммунодоминантного антигена TmpA *T. pallidum*. Было проведено сравнение диагностической эффективности данного диагностикума и агглютинационных диагностикумов, построенных на лизатах сапрофитных и патогенных трепонем. Сравнение чувствительности проводилось с двумя отечественными гемагглютинационными диагностикумами «Люис РПГА

тест» (ООО «Ниармедик Плюс», г. Москва) и «Сифилис РПГА-тест» (ЗАО «ЭКОлаб», г. Электрогорск), немецким гемагглютинационным тестом «Syphilis TRHA test» («Human», Германия) и японским агглютинационным тестом на желатиновых частицах «Serodia TR-PA» («Fujirebio Inc.», Япония).

Результаты сравнения гемагглютинационных диагностикумов, полученные при тестировании образцов сывороток больных разными стадиями сифилиса, представлены на рис. 1-3. При исследовании 39 образцов сывороток больных сифилисом тесты «ДС-РПГА-анти-Люис» и «Serodia TR-PA» показали совпадающие результаты – 100% чувствительность.

Статистический анализ полученных данных показал, что если чувствительность разрабатываемого нами теста для первичной стадии сифилиса значительно превышает чувствительность теста ООО «Ниармедик Плюс» ( $p < 0,01$ ), то между показателями чувствительности теста «ДС-РПГА-анти-Люис» и тестами «Сифилис РПГА-тест», «Syphilis TRHA test» и «Serodia TR-PA» нет достоверной разницы ( $p > 0,05$ ). Но диагностикум «ДС-РПГА-анти-Люис» позволил подтвердить диагноз первичного сифилиса у нескольких человек, которых пропустили гемагглютинационные диагностикумы других производителей. Принимая во внимание важность ранней серодиагностики данного заболевания, связанной с повышенной контагиозностью больных первичным сифилисом и эффективностью во время начатого лечения, можно сделать предварительное заключение, что гемагглютинационный диагностикум, основанный на рекомбинантном антигене, имеет преимущество в детекции специфических иммуноглобулинов в начале сифилитической инфекции перед гемагглютинационными тестами, основанными на лизатах трепонем.

Сравнительная оценка специфичности тест-систем «ДС-РПГА-анти-Люис» (99%) и «Люис РПГА тест» (99,5%), проведенная на 187 образцах сывороток здоровых доноров, показала отсутствие достоверной разницы ( $p > 0,05$ ).

Окончательную оценку диагностической эффективности теста «ДС-РПГА-анти-Люис» можно будет дать только после его клинического испытания в условиях практического здравоохранения в течение некоторого времени.

#### **4. Сравнение динамики титров антител к кардиолипину и к белку TmpA *T. pallidum* в процессе проведения противосифилитической терапии.**

Основываясь на результатах, полученных ранее при сравнении ИФА и РМП тестов, где была отмечена хорошая корреляция динамики титров антикардиолипиновых антител и анти-TmpA антител (Ijsselmuiden et al., 1989, Schouls et al., 1989), была проведена оценка возможности использования гемагглютинационного диагностикума на основе рекомбинантного антигена TmpA для мониторинга проводимого противосифилитического лечения и контроле в посттерапевтический период.

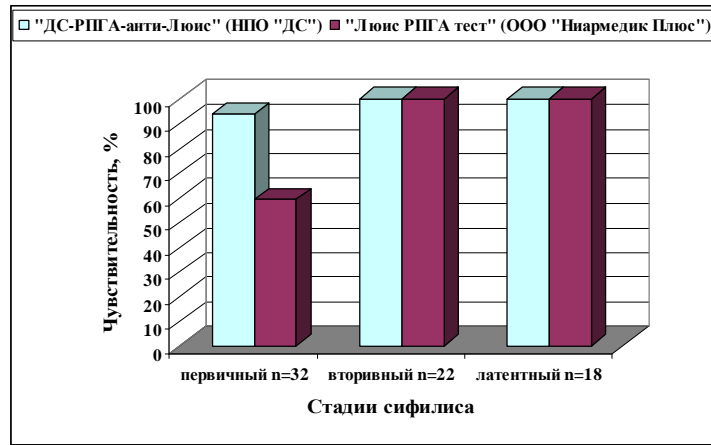


Рисунок 1. Сравнение чувствительности тестов «ДС-РПГА-анти-Люис» и «Люис РПГА тест» (ООО «Ниармедик Плюс», Россия).

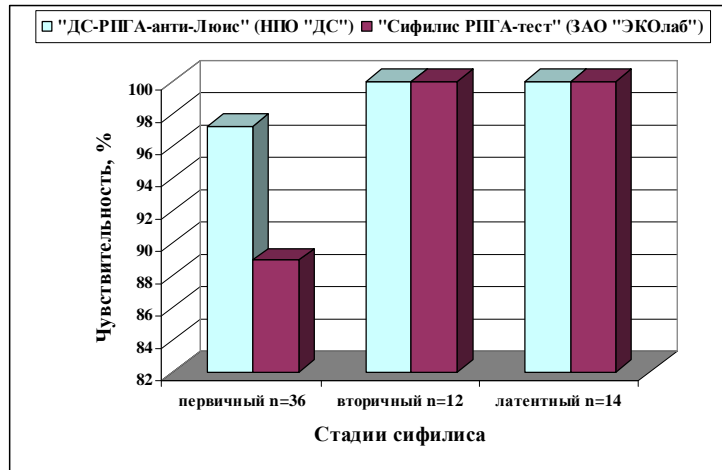


Рисунок 2. Сравнение чувствительности тестов «ДС-РПГА-анти-Люис» и «Сифилис РПГА-тест» (ЗАО «ЭКОлаб», Россия).

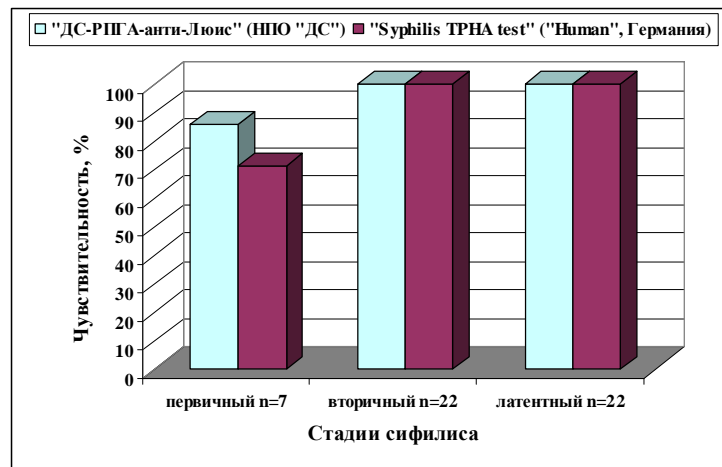


Рисунок 3. Сравнение чувствительности тестов «ДС-РПГА-анти-Люис» и «Syphilis TRNA test» («Human», Германия).

Проведено сравнение исходных уровней противотрепонемных антител, определяемых тест-системами «ИФА-анти-Люис», «ДС-РПГА-анти-Люис» и РМП тестом в 37 образцах сывороток крови больных сифилисом и лиц, находящихся на контроле после лечения. В гемагглютинационном диагностикуме титры специфических антител определялись в диапазоне от 1:80 до 1:10240, в иммуноферментной тест-системе - от 1:10 до 1:2560, в РМП – от 1:2 до 1:32. Чтобы сравнить титры антител, определяемые разными методами, они были представлены как число двукратных разведений образца от исходного титра (N). Результаты сравнения представлены на рис. 4.

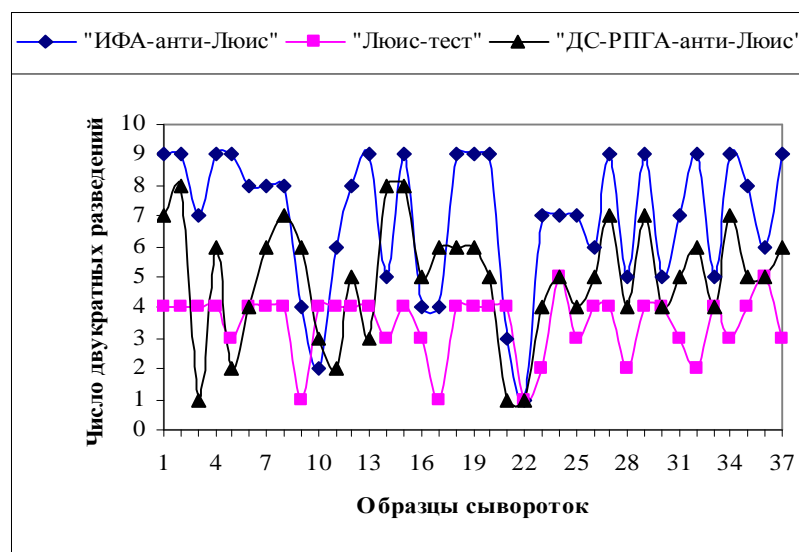


Рисунок 4. Сравнение титров антител (выраженных через число двукратных разведений образца, N) в образцах сывороток крови, определяемых тестами «ДС-РПГА-анти-Люис», «ИФА-анти-Люис» и РМП.

Проведенный анализ результатов сравнения трех тестов показал, что самые длинные ряды титрования образцов сывороток крови получены для иммуноферментной тест-системы (N среднее = 8), а самые короткие – для РМП (N среднее = 3), для РПГА – N среднее = 5, что, возможно, отражает чувствительность разных методов. Результаты, полученные по индивидуальным образцам в «ДС-РПГА-анти-Люис», достоверно отличались от результатов в ИФА и РМП ( $p < 0,05$ ).

Гемагглютинационным диагностикумом, основанном на рекомбинантном белке TprA, и РМП тестом исследовалась динамика титров специфических антител в парных образцах сывороток у 53 пациентов.

После проведенной терапии титры антител в сыворотках больных изменились в РМП в 22,6% случаев, в РПГА в 41,5% случаев.

Совпадающие результаты по динамике титров антител в гемагглютинационном диагностикуме и РМП были получены в 56,6 % случаев. В 30,2% случаев наблюдалось изменение титров антител в гемагглютинационном диагностикуме без изменения в РМП, и лишь в 13,2% случаев отмечалась положительная динамика титров антител в РМП при

постоянстве титров в РПГА тесте. Полученные предварительные данные позволяют говорить о корреляции динамики титров антикардиолипиновых и анти TprA иммуноглобулинов при проводимом лечении и контроле в посттерапевтический период.

Проводилось сравнение числа положительных результатов в тестах для диагностики сифилиса, полученных при исследовании образцов сывороток пациентов, стоящих на контроле после проведенной терапии (табл. 7, 8). Процент образцов сывороток с детектируемыми противотрепонемными антителами в гемагглютинационном диагностикуме был выше чем в основанном на кардиолипиновом антигене тесте РМП ( $p < 0,05$ ) и достоверно ниже чем в иммуноферментной тест-системе ( $p < 0,05$ ). Полученные результаты исследований показывают, что чувствительность метода отражается на сроках «негативации» результатов в трепонемных и кардиолипиновых тестах.

Таблица 7.

Сравнение числа положительных результатов в тесте «ДС-РПГА-анти-Люис» с тестами РМП, «ИФА-анти-Люис» при исследовании образцов сывороток пациентов, получивших полноценное противосифилитическое лечение

«ДС-РПГА-анти-Люис»	РМП	«ДС-РПГА-анти-Люис»	«ИФА-анти-Люис»
n = 138		n = 171	
79,7%	65,9%	78,9%	98,2%

Наблюдаемая разница числа положительных результатов, полученных в агглютинационных тестах, может быть объяснена разной скоростью элиминации специфических антител к отдельным трепонемным антигенам при проводимом лечении.

Таблица 8.

Сравнение числа положительных результатов в тесте «ДС-РПГА-анти-Люис» с агглютинационными тестами, основанными на лизатах трепонем, у пациентов, получивших лечение по поводу сифилиса

«ДС-РПГА-анти-Люис»	«Люис РПГА тест»	«ДС-РПГА-анти-Люис»	«Сифилис с РПГА-тест»	«ДС-РПГА-анти-Люис»	«Syphilis TPHA test»	«ДС-РПГА-анти-Люис»	«Serodia – TP-PA»
n = 25		n = 8		n = 18		n = 20	
68%	76%	87,5%	100%	94,4%	100%	90,0%	100%

Установлено, что гемагглютинационный диагностикум, основанный на рекомбинантном белке TprA, может использоваться для контроля за мониторингом проводимого лечения и при посттерапевтическом контроле.

## 5. Оценка возможности использования теста «ДС-РПГА-анти-Люис» для диагностики нейросифилиса.

Определено оптимальное разведение образца ликвора в гемагглютинационном диагностикуме, основанном на рекомбинантном антигене TmpA, - 1:40. В 15 образцах ликвора от больных с сифилитическими поражениями ЦНС и 3 образцах от лиц, получивших лечение по поводу нейросифилиса, проводилось сравнение спектров противотрепонемных антител в цереброспинальной жидкости методами РПГА и ИФА. Результаты исследований представлены в табл. 9.

Таблица 9.

Чувствительность РПГА и ИФА тестов с использованием отдельных рекомбинантных антигенов при диагностике нейросифилиса

Рекомбинантный антиген	TmpA	Tr47	Tr17	Tr15
Чувствительность РПГА тестов	86,7%	80%	86,7%	60%
Чувствительность ИФА тестов	69,2%	53,8%	84,6%	46,2%

Исследование спектров антител к белкам бледной трепонемы в ликворе больных и переболевших нейросифилисом лиц методом ИФА продемонстрировало преобладание иммуноглобулинов к антигену Tr17 ( $p < 0,05$ ), гемагглютинационный диагностикум выявлял преимущественно специфические антитела к TmpA и Tr17 антигенам, но достоверная разница на такой небольшой выборке была только с РПГА тестом на основе протеина Tr15. Полученные данные подтверждают правильность выбора рекомбинантного белка TmpA для создания гемагглютинационного теста для диагностики сифилиса. Показано, что для конструирования ИФА диагностикума в антигенный комплекс должен быть включен рекомбинантный белок Tr17.

Специфичность РПГА тестов при исследовании 13 образцов ликвора от больных сифилисом без поражения нервной системы составила: TmpA – 84,6%, Tr47 – 84,6%, Tr17 – 76,9%, Tr15 – 100%.

Проанализированы уровни специфических антител к отдельным рекомбинантным трепонемным антигенам в парных образцах (сыворотка – ликвор), полученных от 9 больных нейросифилисом и 1 больного с от больного сифилисом без поражений ЦНС, но с выявленными специфическими антителами в образце ликвора в РПГА.

Результаты свидетельствуют о том, что титры антител, выявляемых гемагглютинационным тестом при поражениях ЦНС при сифилисе в образцах ликвора, ниже титров антител в соответствующих образцах сывороток крови ( $p < 0,05$ ), что совпадает с данными других авторов (Hagedorn, 1980, Young, 1998, Luger et al., 2000). Показано отсутствие

корреляции между соотношениями титров антител к отдельным антигенам в парных образцах у больных нейросифилисом. В то время как у больного сифилисом без поражений ЦНС соотношения между титрами антител в образцах сыворотки и ликвора совпадали. Равенство соотношений титров антител в биологических жидкостях в данном образце может свидетельствовать о пассивном переносе иммуноглобулинов через гематоэнцефалический барьер. Отсутствие корреляции в соотношениях титров антител к отдельным антигенам в ликворе и сыворотке у больных нейросифилисом может служить косвенным подтверждением активного интратекального синтеза IgG в ответ на инвазию *T. pallidum* в центральную нервную систему. Необходимы дополнительные масштабные исследования, чтобы подтвердить достоверность этих данных.

С использованием образцов ликвора от больных нейросифилисом (n =18) и от больных сифилисом без поражения нервной системы (n = 13) проведено сравнение чувствительности и специфичности тестов РИФ, РИБТ, РМП, РСК с кардиолипидным и трепонемным антигенами, ИФА и гемагглютинационным диагностикумом на основе рекомбинантного антигена TmpA. Результаты приведены в табл. 10.

Таблица 10.

Чувствительность и специфичность разных тестов при диагностике нейросифилиса

Тест	Чувствительность	Специфичность	Диагностическая эффективность
РИФ	76,9%	84,6%	80,8%
РИБТ	61,5%	81,8%	70,8%
РМП	61,5%	100%	80,8%
РСКкард.	50%	100%	74,1%
РСКтреп.	64,3%	100%	81,5%
ИФА	80%	84,6%	82,1%
РПГА на TmpA	86,7%	84,6%	85,7%

Результаты исследований показали, что при использовании ликвора в качестве диагностической среды тесты РИФ, ИФА и гемагглютинационный диагностикум, основанный на рекомбинантном антигене, превосходят по чувствительности тесты РИБТ, РМП, РСК с кардиолипидным и трепонемным антигенами. При тестировании образцов ликвора реакции КСР отличаются 100% специфичностью по сравнению с трепонемными тестами (специфичность 81,8 - 84,6%). Из приведенных данных видно, что иммуноферментный и гемагглютинационный тесты, основанные на рекомбинантных антигенах, сопоставимы по чувствительности и специфичности с признанной в нашей стране для диагностики нейросифилиса РИФ. Значения диагностической эффективности отдельных тестов варьировали в пределах от 70,8 до 85,7 и достоверно не отличались

друг от друга. Показано, что диагностическую эффективность ликвородиагностики можно повысить до 90,3% путем использования комбинации тестов РИФ + ИФА + РПГА и РИФ + ИФА + РМП (критерий совпадения – минимум в двух тестах из трех положительный результат). Т.о. гемагглютинационный тест на основе рекомбинантного антигена TmpA может использоваться для диагностики нейросифилиса в комбинации с тестами РИФ и ИФА.

### Выводы

1. Установлена высокая диагностическая значимость четырех рекомбинантных антигенов – аналогов иммунодоминантных белков TmpA, 47, 17 и 15 кДа *T. pallidum*. Для создания эффективного диагностикума на основе РПГА достаточно использования одного антигена TmpA, для ИФА тест-систем необходим комплекс рекомбинантных антигенов.

2. Разработана и внедрена в практику технология производства гемагглютинационного диагностикума, основанного на использовании рекомбинантного антигена – аналога иммунодоминантного белка TmpA *T. pallidum*. Созданный гемагглютинационный диагностикум обладает высокими показателями чувствительности, специфичности и воспроизводимости.

3. Гемагглютинационный диагностикум на основе рекомбинантного белка TmpA имеет преимущество перед аналогами на основе лизатных антигенов *T. pallidum* при детекции специфических иммуноглобулинов в первичной стадии сифилитической инфекции и не уступает по специфичности и чувствительности при диагностике вторичной и латентной стадии заболевания.

4. В процессе лечения сифилиса динамика титров антител к кардиолипину и к белку TmpA совпадает, что позволяет использовать новый гемагглютинационный диагностикум для оценки эффективности лечения и контроля в посттерапевтический период.

5. Показана возможность использования гемагглютинационного диагностикума на основе рекомбинантного антигена, воспроизводящего иммунодоминантные домены TmpA белка *T. pallidum*, для ликвородиагностики нейросифилиса.



### Список публикаций по теме диссертации

1. Обрядина А.П., **Чепурченко Н.В.**, Поздышева Л.А., Вязьмина Е.С., Абалкина Л.М., Бурков А.Н. Скрининговый комплекс для диагностики сифилиса.// Научно-практическая конференция «Актуальные вопросы инфекционной патологии». Барнаул, 1999. С.220-221.
2. Обрядина А.П., Фриго Н.В., Комарова В.Д., **Чепурченко Н.В.**, Абалкина Л.М., Бурков А.Н. Использование ультроозвученных белков *T. pallidum* и их рекомбинантных аналогов в иммуноферментной диагностике сифилиса. // ИППП. 1999. №1. С.25-28.
3. **Чепурченко Н.В.**, Гладышева М.В., Бурков А.Н., Комарова В.Д., Фриго Н.В., Новикова С.И. Предварительные результаты апробации иммуноферментной тест-системы для определения трепонемоспецифических IgM.// Тезисы научных работ VIII-ого Всероссийского съезда дерматовенерологов. Ч.II. Москва, 2001. С. 113-114.
4. **Чепурченко Н.В.**, Гладышева М.В., Пьявкина А.А., Обрядина А.П. Новый способ определения титра специфических антител в иммуноферментной диагностике сифилиса. // Тезисы научных работ Первого Российского конгресса дерматовенерологов. Том II. Санкт-Петербург, 23-26 сент. 2003 г. С. 38-39.
5. **Чепурченко Н.В.**, Гладышева М.В., Фриго Н.В. Диагностическая значимость поверхностных антигенов *T. pallidum* при детекции специфических антител в различные стадии и формы сифилиса. // Тезисы научных работ Первого Российского конгресса дерматовенерологов. Том II. Санкт-Петербург, 23-26 сент. 2003 г. С. 39-40.
6. Обрядина А.П., **Чепурченко Н.В.**, Фриго Н.В., Никулин Н.К., Комарова В.Д. Диагностика сифилиса.// Информационные материалы. Нижний Новгород, НПО «Диагностические системы», 2004. 42С.
7. Гладышева М.В., Уланова Т.И., Пузырев В.Ф., Бугрова Н.А., **Чепурченко Н.В.**, Обрядина А.П. Использование нового синтетического антигена в иммуноферментной диагностике сифилиса.// Тезисы научных работ Всероссийской конференции дерматовенерологов «Современные направления диагностики, лечения и профилактики ИППП и дерматозов». Нижний Новгород, 27-28 мая 2004 г. С. 86-87.
8. **Чепурченко Н.В.**, Уланова Т.И., Пузырев В.Ф., Логинова Л.Н., Бурков А.Н., Обрядина А.П. A new recombinant antigen haemagglutination test for the serological diagnosis of syphilis.// Материалы 15-ого Европейского конгресса клинической микробиологии и инфекционных заболеваний. Копенгаген, Дания. 2-5 апр. 2005. С.247.
9. Иванова Н.И., Пекшева О.Ю., **Чепурченко Н.В.**, Обрядина А.П., Залеских Н.В. Оценка готовности лабораторий центров по профилактике и борьбе со СПИД Приволжского федерального округа к осуществлению диагностики сифилиса.// Российская научно-практическая конференция,

посвященная 110-летию кафедры инфекционных болезней Военно-Медицинской академии им. С.М. Кирова. Санкт-Петербург, 22-24 марта 2006г. С.135.

10. **Чепурченко Н.В.**, Гладышева М.В., Обрядина А.П. Новые возможности использования рекомбинантных антигенов в серодиагностике сифилиса. // Клин. дерматол. и венерол. 2006. №2. С. 28-31.

11. Кувшинов М.В., **Чепурченко Н.В.**, Обрядина А.П. Комплексный подход к серологической диагностике сифилиса. // Материалы V съезда дерматовенерологов Республики Беларусь «Актуальные вопросы дерматологии, венерологии и дерматокосметологии». Минск, 20-21 сентября 2006 г. С.68-71.