



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: **2001104381/14, 07.02.2001**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
07.02.2001(45) Опубликовано: **27.05.2003**

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **Неспецифические положительные результаты серологических реакций на сифилис. Количественные модификации современных серологических реакций. Методические рекомендации.** - М.: ЦКВИ, 1990, с.20. RU 2141660 C1, 20.11.1999. SU 1561043 A1, 30.04.1990. SU 879370 A, 07.11.1981. JP 5315133 A, 23.05.1978.

Адрес для переписки:
**197372, Санкт-Петербург, ул.Камышовая, 54, корп.1,
кв.122, И.Н.Теличко**

(71) Заявитель(и):

**Теличко Игорь Николаевич,
Иванов Андрей Михайлович**

(72) Автор(ы):

**Иванов А.М.,
Теличко И.Н.,
Вербов В.Н.,
Самцов А.В.,
Сбойчаков В.Б.,
Сухарев А.В.,
Смирнова Т.С.**

(73) Патентообладатель(и):

**Теличко Игорь Николаевич,
Иванов Андрей Михайлович**

(54) СПОСОБ СЕРОДИАГНОСТИКИ РАННЕГО НЕЙРОСИФИЛИСА

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины, а именно к венерологии. Способ обеспечивает повышение точности серодиагностики раннего нейросифилиса, кроме того он простой в постановке, экспрессный и унифицированный. Определяют наличие антител в сыворотке крови и спинномозговой жидкости к антигенам возбудителя сифилиса. Причем определяют антитела к антигенам возбудителя сифилиса с молекулярной массой 15, 17, 41 и 47 кД, при обнаружении в сыворотке крови антител к двум и более антигенам, а в спинномозговой жидкости только к антигену 17 кД верифицируют раннее сифилитическое поражение центральной нервной системы.

Изобретение относится к области медицины, а именно к венерологии, и может быть использовано для повышения точности серодиагностики раннего нейросифилиса.

В последние годы на фоне некоторого снижения регистрации новых случаев заражения сифилисом, отмечается относительное увеличение доли более поздних периодов сифилиса. Особенно актуальным является рост числа случаев нейросифилиса. В этих условиях сохраняется необходимость разработки и внедрения в практику новых методов ранней серологической диагностики нейросифилиса.

Обязательным условием лабораторного обследования при нейросифилисе является исследование в серологических тестах, наряду с сывороткой или плазмой крови, спинномозговой жидкости (СМЖ) [приказ МЗ СССР 1161 от 2.09.1985 "О совершенствовании серологической диагностики сифилиса"]. К настоящему времени известен ряд методов специфической серологической диагностики раннего нейросифилиса, применяемых для уточнения диагноза при сифилитическом поражении нервной системы. Это реакция связывания комплемента (РСК) с кардиолипиновым и культуральным трепонемным антигенами, реакция пассивной гемагглютинации (РИГА), реакция иммунофлюоресценции с неразведенной СМЖ (РИФц) и со СМЖ, разведенной в 10 раз (РИФ₁₀). Зарубежным аналогом отечественной РСК с кардиолипиновым антигеном является реакция VDRL (Venereal Disease Research Laboratory test) [Дмитриев Г.А. и соавт., 1996].

В РСК с кардиолипиновым антигеном определяют антитела (реагины) в сыворотке крови и СМЖ к фосфолипидам макроорганизма (фосфолипиды мембран митохондрий). Выявляется аутоиммунный

процесс, вызванный денатурацией бледными трепонемами тканей макроорганизма с образованием липопротеидного комплекса, в котором липиды являются детерминантой [Не специфические положительные результаты серологических реакций на сифилис. Количественные модификации современных серологических реакций (методические рекомендации) //сост. Борисенко К. К., Беднова В.Н., Лосева О.К. и др. - М.: ЦКВИ, 1990, - 20с.]. Необходимо учитывать, что реактивы способны формироваться в организме и при множестве других заболеваний и состояний. В связи с этим, данные реакции недостаточно специфичны. Они могут быть положительными у соматических больных (системная красная волчанка, злокачественные опухоли, инфаркт миокарда, гемолитические анемии, ревматоидный артрит, узелковый периартериит, ревматизм, пневмония), инфекционных больных (лепра, малярия, сыпной тиф).

Для постановки РСК с антигенами на основе культуральных трепонем используют штаммы трепонем (V, VII, VIII, IX, Рейтера), являющихся по своей природе представителями нормальной микрофлоры человеческого организма. Антитела к этим микроорганизмам присутствуют в сыворотке крови многих людей (*T. phagedenis*, *T. refringens*, *T. microdentium*). Кроме того, высок процент положительных результатов при тестировании крови больных инфекциями, вызванными родственными *T. pallidum* микроорганизмами: *V. burgdorferi*, *T. vincentii*, *L. interrogans*. При использовании для сорбции на полистироле малоочищенных антигенов из культуральных штаммов *T. pallidum* ложноположительные результаты наблюдаются у больных ревматизмом и ревматоидным артритом в 11,4% случаев, у больных системной красной волчанкой и склеродермией 18,4%, при дерматозах 2,2%, злокачественные новообразования внутренних органов и кроветворной ткани 6,5%, заболевания органов пищеварения 2,2%, заболевания мочеполовых органов 2,8%, заболевания легких 5,4%, туберкулез и лепра 2,5%, здоровые доноры 3,0%. Для увеличения специфичности в подобных тест-системах необходима предварительная сорбция исследуемых сывороток на мясоептонном бульоне без соли или на биологически активном концентрате сыворотки молока, что усложняет постановку реакции.

Реакция пассивной гемагглютинации (РПГА) высоко чувствительна и специфична при условии высокого качества антигена; проста в постановке, не требует ни дорогостоящего оборудования и материалов, ни особой подготовки персонала лаборатории. Это высокочувствительный и специфичный тест как при ранних, так и при поздних формах сифилиса [Беднова В.Н., Тимченко Г.Ф. Сравнительное изучение РПГА с диагностикумами из патогенных и культуральных бледных трепонем при различных формах сифилиса //Вестн. дерматологии и венерологии. - 1988. - 4. - С. 43-45]. В РПГА выявляются антитела как класса IgG, так и IgM. Гемагглютинины появляются на 3-ей неделе после заражения. В тоже время у данного метода существует ряд объективных недостатков: получение полуколичественного результата требует титрования биологических жидкостей; возможность возникновения феномена "prozone"; субъективная оценка результатов. После лечения титры гемагглютининов снижаются медленно, поэтому реакцию нельзя использовать для оценки эффективности терапии.

Все перечисленные реакции могут быть отнесены к аналогам данного изобретения, так как предполагают иммунологическое исследование крови и СМЖ путем определения антител, образующихся при сифилисе.

Прототипом предлагаемого изобретения является реакция иммунофлюоресценции (РИФ), которая занимает ведущее место среди специфических реакций [Неспецифические положительные результаты серологических реакций на сифилис. Количественные модификации современных серологических реакций (методические рекомендации) //сост. Борисенко К.К., Беднова В.Н., Лосева О.К. и др. - М.: ЦКВИ, 1990, - 20 с.]. Метод заключается в обнаружении специфических антител в сыворотке крови и СМЖ. Антиген (*T. pallidum* штамм Nichols, полученный из орхита кролика) наносят на стекло, высушивают, фиксируют ацетоном и наносят исследуемую сыворотку больного. Затем инкубируют во влажной камере, промывают буферным раствором и обрабатывают препарат люминисцирующей сывороткой против глобулинов человека (античеловеческий глобулин + флуоресцеин изотиоцианат). Микроскопируют в люминисцентном микроскопе и при интенсивности свечения 3+ и 4+ определяют наличие антител в исследуемом материале.

В данном тесте иногда встречаются перекрестные реакции между антигенами видов, входящих в род *Treponema*. Реакция не может служить критерием излеченности больных, так как часто "флюоресцирующие" антитела циркулируют в организме пожизненно, что снижает точность диагностики. РИФ - трудоемкая реакция, сложна в постановке, требует хорошо обученного персонала, субъективна при оценке и интерпретации результатов, для проведения анализа требуется более суток, нет возможности автоматизации.

Задачей настоящего изобретения является создание способа серодиагностики раннего нейросифилиса повышенной точности, простого в постановке, экспрессного и унифицированного,

Решение поставленной задачи достигается тем, что так же как и в прототипе определяют наличие антител в сыворотке крови и спинномозговой жидкости к антигенам возбудителя сифилиса. Отличие заключается в том, что определяют антитела к антигенам возбудителя сифилиса с молекулярной массой 15, 17, 41 и 47 кД, при обнаружении в сыворотке крови антител к двум и более антигенам, а в спинномозговой жидкости только к антигену 17 кД верифицируют раннее сифилитическое поражение центральной нервной системы.

При подробном изучении антигенной структуры патогенных бледных трепонем (БТ) был получен ряд рекомбинантных белков и синтетических пептидов, обладающих антигенной активностью естественных

компонентов клеточной стенки БТ, молекулярная масса которых варьирует от 15 до 97 кД. Наиболее перспективными для использования в серологической диагностике сифилиса признаны антигены с молекулярной массой 15, 17, 41 и 47 кД. Диагностическая информативность этих исследований повышается при раздельном выявлении антител класса М и подклассов IgG (IgG1, IgG3 и IgG4). Авторами изобретения выявлено, что в сроки заболевания, характерные для раннего нейросифилиса в пуле противотрепонемных иммуноглобулинов преобладает подкласс IgG1. В мировой литературе авторами не выявлены сведения, касающиеся образования антител в СМЖ при сифилисе, направленных к отдельным антигенам БТ.

Способ осуществляется следующим образом.

Забор крови из вены и получение из нее сыворотки осуществляется общепринятым методом.

Получение СМЖ: люмбальная пункция проводится по стандартной отработанной методике.

Содержание антител к липопротеинам 15, 17, 41 и 47 кД определяют методом твердофазного ИФА на разборных или неразборных 96-луночных полистироловых планшетах фирмы "Costar" (США). В качестве аналогов антигенов 15, 17 и 47 кД используют рекомбинантные белки производства научно-производственной фирмы "Диапроф-Мед" (Украина). В качестве аналога антигена 41 кД используется синтетический пептид, имитирующий N-концевой регион естественного липопротеина (последовательность аминокислот 23-51), полученный методом твердофазного синтеза и очищенный высокоэффективной жидкостной хроматографией в лаборатории синтеза пептидов НИИ особо чистых биопрепаратов (г. Санкт-Петербург).

Описание

реагентов:

- 0,02 М карбонатно-бикарбонатный буферный раствор с pH 9,6 использовался для приготовления рабочего раствора антигена и последующей сорбции планшетов;

- для промывки планшетов в перерывах между основными этапами реакции, разведения исследуемых биологических жидкостей и приготовления рабочего раствора конъюгата использовался фосфатно-солевой буфер, содержащий 0,15 М хлористого натрия и с добавлением 0,1% твин-20 (ФСБ);

- субстратный раствор включал 0,05 М цитратный буфер (pH 5,0), перекись водорода (0,035%) и ортофенилендиамин (0,05%);

- для выявления специфического комплекса антиген-антитело использовались пероксидазные конъюгаты на основе моноклональных антител, направленных к изотипспецифичному эпитопу IgG1 иммуноглобулинов (лаборатория гибридных технологий ВНИ рентгенорадиологического института).

Раствор антигена вносили по 100 мкл в лунки планшета (концентрация антигенов: 15 кД - 4 мкг/мл, 17 кД - 4 мкг/мл, 41 кД - 5 мкг/мл, 47 кД - 4 мкг/мл) и оставляли при °С на 24 часа. После адсорбции планшеты промывали внесением в каждую лунку по 200 мкл раствора ФСБ.

Затем в лунки помещали по 100 мкл исследуемых сывороток в разведении 1: 10 или СМЖ в разведении 1:5, приготовленном на ФСБ. Для разведения исследуемых проб при работе с рекомбинантными антигенами использовали ФСБ, содержащий 3,6 мкг/мл лизата клеток-продуцентов антигена р17 (E.coli). Планшеты инкубировали в течение 1 часа при температуре 37°С с последующим трехкратным отмыванием ФСБТ, после чего в лунки вносили по 100 мкл рабочего разведения конъюгата (1:4000). Планшеты инкубировали 1 час при температуре 37°С и после пятикратного промывания лунок ФСБ

добавляли по 100 мкл субстратного раствора. После 15 ± 1 мин экспозиции при температуре $20 \pm 2^\circ\text{C}$ реакцию останавливали добавлением 50 мкл 2 М H_2SO_4 и определяли оптическую плотность окрашенного продукта ферментативной реакции на вертикальном фотометре Multiscan-МС (Labsystems, Финляндия) при длине волны 492 нм. Исследуемые образцы признаются положительными, если оптическая плотность образца в 2 и более раз превышает среднюю оптическую плотность для панели отрицательных контролей (коэффициент позитивности 2 и более).

Пример 1. Больная К. Диагноз: "Сифилис вторичный рецидивный". Клиническая картина, характерная для вторичного рецидивного сифилиса. В сыворотке крови обнаружены антитела к антигенам T. pallidum с молекулярной массой 15, 17, 41 и 47 кД, резко положительные результаты исследований в РСК, РИГА, РИФ. Для исключения раннего нейросифилиса была проведена люмбальная пункция. Результаты серологического исследования СМЖ: РСК - отрицательная; РИФц без абсорбции - резко положительная (4+); РИГА - слабopоложительная (2+); модифицированный ИФА для определения специфических антител к антигенам с молекулярной массой 15, 17, 41 и 47 кД - отрицательный.

Таким образом данный пример подтверждает ложноположительный результат РИФц и исключает раннее сифилитическое поражение нервной системы.

Пример 2. Больная Г. Диагноз: "Сифилис вторичный рецидивный". Клиническая картина, характерная для вторичного рецидивного сифилиса. В сыворотке крови обнаружены антитела к антигенам T. pallidum с молекулярной массой 15, 17, 41 и 47 кД, резко положительные результаты исследований в РСК, РИГА, РИФ. Для исключения раннего нейросифилиса была проведена люмбальная пункция. Результаты серологического исследования СМЖ: РСК - отрицательная; РИФц без абсорбции - резко положительная (4+); РИГА - резко положительная (4+); модифицированный ИФА для определения специфических антител к антигену с молекулярной массой 17 кД - положительный (коэффициент

позитивности более 2); антитела к антигенам 15, 41 и 47 кД не обнаружены. Таким образом данный пример подтверждает наличие сифилитического поражения центральной нервной системы и доказывает недостаточную чувствительность РСК, широко применяемой в клинической практике.

Формула изобретения

Способ серодиагностики раннего нейросифилиса, включающий определение наличия антител в сыворотке крови и спинномозговой жидкости (СМЖ) к антигенам возбудителя сифилиса, отличающийся тем, что определяют антитела к антигенам возбудителя сифилиса с мол. м. 15, 17, 41 и 47 кД, и при обнаружении в сыворотке крови антител к двум и более антигенам, а в СМЖ только к антигену 17 кД верифицируют раннее сифилитическое поражение центральной нервной системы.

ММ4А Досрочное прекращение действия патента Российской Федерации на изобретение из-за неуплаты в установленный срок пошлины за поддержание патента в силе

Дата прекращения действия патента: **08.02.2003**

Извещение опубликовано: **20.11.2004** **БИ: 32/2004**
