



УДК: 615.012:577.175.446]-097

Шерзод ХАМИДОВ,

Независимый исследователь, PhD, инженер технолог ГП «РАДИОПРЕПАРАТ»

E-mail: sherzodxamidov3333@gmail.com

Илхом САДИКОВ,

Д-р техн. наук, академик, Директор, Институт Ядерной физике при АН РУз

Аюбхон АБДУКАЮМОВ,

Д-р техн. наук, Директор, ГП «РАДИОПРЕПАРАТ»

Аброр РИХСИЕВ,

Канд. хим. наук, Главный технолог, ГП «РАДИОПРЕПАРАТ»

Олеана ЗАЙЦЕВА,

Инженер технолог, ГП «РАДИОПРЕПАРАТ»,

Алишер ХАЙТБАЕВ,

д-р хим. наук, профессор, Национальный университет Узбекистана имени М. Улугбека

Рецензент: профессор З.Сманова

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ РАННЕГО ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К TREPONEMA PALLIDUM

Аннотация

Сифилитическая инфекция, вызываемая бактерией *Treponema pallidum*, представляет собой антропонозное заболевание, для которого характерен преимущественно половой путь передачи. Возможно также заражение через вертикальный путь - внутриутробное заражение плода от матери, больной сифилисом, что приводит к врожденному сифилису, а также через гемотрансфузионный путь - при переливании инфицированной донорской крови. Характерной особенностью сифилиса является его длительное хроническое течение с постепенным поражением различных систем органов и развитием серьезных осложнений. Заболеваемость сифилисом в мире остается высокой. По данным Всемирной организации здравоохранения, в 2020 году число заболевших сифилисом взрослых в возрасте от 15 до 49 лет достигло 7,1 миллиона человек. Эффективное выявление сифилитической инфекции значительно зависит от результатов лабораторных исследований, особенно иммунохимических методов, которые позволяют определять в крови антитела, специфические к антигенам возбудителя. В настоящей статье обсуждается разработка методов иммуноферментного анализа, направленных на раннее выявление антител к *Treponema pallidum*, что имеет важное значение для контроля и борьбы с распространением этого заболевания.

Ключевые слова: иммуноферментный анализ (ИФА), антитела, вирус, сифилис, ВОЗ.

TREPONEMA PALLIDUM ANTITELALARINI ERTA ANIQLASHDA IMMUNOFERMENT TAHLIL USULIDAN FOYDALANISH

Аннотация

Treponema pallidum bakteriyasi keltirib chiqaradigan sifilis infeksiyasi asosan jinsiy yo'l bilan yuqadigan antroponotik kasallikdir. Mazkur infeksiya shuningdek vertikal yo'l orqali yuqishi ham mumkin, bunda infeksiyalangan onadan homilaga yuqishi natijasida tug'ma sifilislga olib keladi. Shuningdek donor qonini quyish orqali ham yuqishi mumkin. Sifilislning xarakterli xususiyati bo'lib uning turli organ tizimlariga bosqichma-bosqich zarar yetkazishi va jiddiy asoratlarni rivojlanishiga sababchi bo'lishidir. Dunyoda sifilis bilan kasallanish darajasi yuqoriligicha qolmoqda. Jahon sog'liqni saqlash tashkiloti ma'lumotlariga ko'ra, 2020-yilda sifilis bilan kasallangan 15 yoshdan 49 yoshgacha bo'lgan kattalar soni 7,1 millionga yetdi. Sifilitik infeksiyani samarali aniqlash laboratoriya tekshiruvlari natijalariga, ayniqsa immunoferment usullariga bog'liq bo'lib, bu qonda patogen antigenlarga xos bo'lgan antitelalarni aniqlash imkonini beradi. Ushbu maqolada *Treponema pallidum*ga antitelalarini orlarni erta aniqlashga qaratilgan immunoferment usullarini ishlab chiqish muhokama qilinadi. Bu esa kasallikning tarqalishini nazorat qilish va unga qarshi kurashish uchun muhimdir.

Kalit so'zlar: immunoferment tahlil (IFT), antitela, virus, sifilis, JSST.

USE OF ELISA IMMUNO ASSAY FOR EARLY DETECTION OF ANTIBODIES TO TREPONEMA PALLIDUM

Annotation

Syphilis, which is a type of infection caused by the bacterium *Treponema pallidum*, is mainly transmitted through sexual activity, but vertical transmission from the mother to the fetus and through blood transfusions are also possible ways of infection. This disease is described by its chronic character, which causes a gradual damage to different organs and the development of severe complications. The worldwide incidence is still very high, with approximately 7.1 million adults aged 15 to 49 who were diagnosed with syphilis in 2020, as reported by the World Health Organization. Effective diagnosis of syphilis is based on laboratory tests, especially immunochemical methods, which detect the specific antibodies in the blood that are evidence of the infection. This article is about the new ways in which the enzyme immunoassay techniques have been improved to make the early detection of the antibodies to *Treponema pallidum* possible, thus helping in the prevention and control of its spread.

Keywords: enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), antibodies, virus, syphilis, WHO.

Введение. Сифилитическая инфекция является антропонозным заболеванием, вызываемым - *Treponema pallidum*. Эта инфекция передается преимущественно половым путем передачи инфекционного агента от больного человека здоровому. Возможны также: вертикальный путь - в результате внутриутробного инфицирования плода от больной сифилисом матери (врожденный сифилис) и гемотрансфузионный путь - заражение реципиента при переливании ему инфицированной донорской крови [1-5].

Treponema pallidum проникает через слизистые мембраны или кожу, достигает местных лимфоузлов в течение нескольких часов и быстро распространяется по всему организму. Сифилис характеризуется длительным хроническим течением с постепенным вовлечением в патологический процесс различных систем органов и развитием тяжелых осложнений [3,5-7].

По оценкам ВОЗ, в 2020 г. сифилисом заболели 7,1 миллиона взрослых в возрасте от 15 до 49 лет.

В Узбекистане общая заболеваемость сифилисом в 2011 г. составила 7,34 на 100 тыс. населения.

В период с 2003 по 2013 г. выявлено повышение уровня заболеваемости всеми формами сифилиса на 10,3%, врожденного сифилиса - на 50%. Среди неблагоприятных тенденций следует отметить увеличение показателей заболеваемости поздними формами сифилиса и в особенности нейросифилисом. Это может быть связано с сохранением высокого удельного веса заразных (ранних) форм сифилитической инфекции с длительным контагиозным периодом (вторичный, ранний скрытый сифилис), наличием не выявленных очагов инфекции.

Выявленные в динамике заболеваемости сифилисом негативные тенденции определяют высокие требования к качеству первичной диагностики сифилиса, вызывают необходимость усиления эпидемиологического контроля и широкого внедрения в практику современных, высокочувствительных и специфичных методов исследований.

Для своевременного выявления больных сифилитической инфекцией определяющее значение играют результаты лабораторных исследований и, в первую очередь, иммунохимическими методами, позволяющими определять в крови факторы гуморального иммунного ответа, направленные против специфических антигенов возбудителя заболевания [9-11].

Современные иммунохимические методы лабораторных исследований, такие как: иммуноферментный анализ (ИФА) позволяют с высокой степенью клинической информативности определять в крови или спинномозговой жидкости больного присутствие иммуноглобулинов (Ig), направленных против наиболее специфичных антигенов возбудителя заболевания. При этом применяемые в практическом здравоохранении лабораторные технологии направлены, в большинстве случаев, на определение специфических IgG.

Раннее определение специфических IgM также может быть применено для своевременного выявления случаев сифилиса раннего врожденного (определение специфических IgM в крови новорожденных) или случаев реинфекции у пациентов, ранее перенесших сифилис [11].

В связи с этим целью настоящей работы являлось создание способа выявления трепонемной инфекции для диагностики первичного сифилиса и обнаружения инфицирования *Treponema pallidum* на ранних стадиях и на стадиях активности инфекционного процесса, создание эффективной и удобной в использовании тест-системы с высокими показателями специфической активности (чувствительности и специфичности) для выявления антител к *Treponema pallidum* в сыворотках или плазмах крови человека на ранних стадиях заболевания имеет важное теоретическое и практическое значение.

Материал и методы. Взаимодействие антител с иммобилизованными на твердом сорбенте рекомбинантными антигенами *Treponema pallidum*, определяли добавлением контрольных образцов сывороток, содержащих антитела, добавлением конъюгата, добавлением красителя тетраметилбензидина а также раствора серной кислоты во все образцы. С помощью фотометрического метода измеряли оптическую плотность. При иммобилизации на твердой фазе использовали р17 и р47 и также рекомбинантный антиген *Treponema pallidum* р41. Антигены разводили в 0,05М трисовом нейтральном буферном растворе в соотношении р41, р47, р17 - 1:1,1:3 соответственно. В качестве конъюгата использовали композицию моноклональных антител IgM и IgG, конъюгированных с пероксидазой из корня хрена.

Имуноферментный анализ (ИФА). Используя одно- или многоканальную пипетку, в лунки вносили по 80 мкл раствора для разведения сывороток. Затем в лунки добавляли по 20 мкл образцов исследуемых сывороток, оставив свободными 4 лунки первого ряда (лунки для контролей). Далее в лунку А1 добавляли 20 мкл К⁺ (положительного контрольного образца), в лунки В1, С1, D1 добавляли по 20 мкл К⁻ (отрицательного контрольного образца). При добавлении каждого образца содержимое лунки перемешивали пипетированием.

Затем планшет накрывая клеящей лентой инкубировали при температуре 37°C в течение 60 минут. По окончании инкубации планшет промывали 6 раз рабочим раствором буфера для промывки планшета (350 мкл в каждую лунку).

Рабочий раствор конъюгата. В каждую лунку планшета вносили по 100 мкл рабочего раствора конъюгата. Заклеивая планшет клеящей лентой и инкубировали при температуре 37°C в течение 30 минут. По окончании инкубации планшет промывали 6 раз рабочим раствором буфера. В лунки вносили по 100 мкл раствора тетраметилбензидина с перекисью водорода и инкубировали при температуре 18-25°C в темном месте в течение 30 минут. Реакцию останавливали внесением во все лунки по 100 мкл стоп-реактента. Оптическую плотность регистрировали не более чем через 5 минут после остановки цветной реакции с помощью спектрофотометра, определяя оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме (450 нм относительно 620 нм). Среднее значение оптической плотности отрицательных образцов вычисляли по следующей формуле:

$$\text{ОП Кср} = \frac{K_1 + K_2 + K_3}{3}$$

Значение критической оптической плотности (ОПкр) рассчитывали по формуле: **ОПкр = ОП Кср + 0,15**

Образцы сывороток, имеющие ОП более величины ОПкр, считают положительными, а менее ОПкр - отрицательными.

Чувствительность способа определяли по формуле:

$$\text{Чувствительность} = \frac{П}{П+ЛО} \times 100\%$$

где, П – количество положительных результатов анализа, ЛО – количество ложноотрицательных результатов анализа. Специфичность способа определяли по формуле:

$$\text{Специфичность} = \frac{О}{О+ЛП} \times 100\%,$$

где, О – количество отрицательных результатов анализа, ЛП – количество ложноположительных результатов анализа.

Результаты и обсуждение.

Дополнительное использование для иммобилизации на твердой фазе рекомбинантного антигена p41, ассоциированного с наружной мембраной *Treponema pallidum*, позволило повысить чувствительность анализа. Так для сывороток крови со стадии первичного сифилиса характерно значительное преобладание в составе антител к антигену p41 и дополнительное выявление антител к этому белку наружной мембраны трепонемы (по предлагаемому способу) предоставляет широкие возможности для диагностики первичного сифилиса.

Использование композиции моноклональных антител IgM и IgG, конъюгированных с пероксидазой, позволило выявлять не только хроническое течение заболевания, но и инфицирование *Treponema pallidum* на ранних стадиях, и на стадиях реактивации инфекционного процесса, а также сохранение очагов персистентной инфекции. Иммуноглобулины IgM – наиболее ранние маркеры трепонемной инфекции служат индикатором активности инфекционного процесса и могут быть обнаружены начиная со второй недели после заражения.

Качественные характеристики использованного способа (по известному) для раннего выявления антител к *Treponema Pallidum* приведены в таблице 1:

Таблица 1. Сравнительные результаты специфической активности по прототипу и предлагаемому способу

Показатель специфической активности	Результаты по прототипу	Результаты по предлагаемому способу
Чувствительность	95,5%	100%
Специфичность	96,7%	100%

Данные, приведенные в таблице 1, свидетельствуют о высоких показателях специфической активности предлагаемого способа. Все верифицированные сыворотки, содержащие антитела к *Treponema pallidum*, были определены как положительные, все верифицированные сыворотки, не содержащие антитела к *Treponema pallidum*, были определены как отрицательные. Полученные данные приведены в таблице 2:

Таблица 2. Результаты ИФА-исследований при диагностике сифилиса и их возможная интерпретация.

Наличие специфических антител против <i>Treponema pallidum</i>			Стадия заболевания
IgG	IgM	IgG и IgM	
-	+	+	Ранняя стадия сифилиса (окончание инкубационного периода – начало первичного серонегативного сифилиса)
+	+	+	Окончание первичного серонегативного, первичный серопозитивный, вторичный активный, вторичный рецидивный сифилис
+	-	+	Вторичный скрытый либо пролеченный сифилис

Как видно из данных таблицы 2 большое значение для обнаружения заболевания на всех стадиях имеет определение антител классов IgG и IgM к *Treponema pallidum* и, использование композиции моноклональных антител IgM и IgG, конъюгированных с пероксидазой из корня хрена, позволяет определять антитела ко всем трем антигенам *Treponema pallidum*, иммобилизованным на твердой фазе, на всех стадиях заболевания.

Таким образом предлагаемый способ в совокупности всех отличительных признаков позволил создать эффективную и удобную в использовании диагностическую тест-систему с высокими показателями специфической активности для выявления раннего и хронического течения заболевания сифилисом.

Выводы. Тест-система позволяет проводить диагностику врожденного сифилиса у новорожденных, регистрацию первичного сифилиса, дифференцирование серорезистивных форм заболевания от ложной серорезистентности, а также определять хроническую форму заболевания. Выпуск в промышленном масштабе тест-системы, производимой по предлагаемому способу, и применение ее в лабораториях клиник для диагностики и своевременного выявления больных среди населения, способствует снижению уровня распространения опасного инфекционного заболевания в Республике Узбекистан.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аковбян В.А. Характеристика эпидемиологических закономерностей, определяющих распространение заболеваний, передаваемых половым путем, в России. / В.А. Аковбян, А.В. Резайкина, Л.И. Тихонова // Вестник дерматологии и венерологии 1998; 1: 4-6.
2. Овчинников Н.М. Бледная спирохета. // Венерические болезни: Руководство для врачей. / Под ред. М.П. Демьяновича, Н.М. Туранова. // М.: Медгиз, 1956: 451-465.
3. Скрипкин Ю.К. Кожные и венерические болезни. Руководство для врачей. / Ю.К. Скрипкин (ред.), В.Н. Мордовцев (ред.) // М.: Медицина, 1999; Т. 1: 466-503.
4. Goh B.T. European guidelines for the management of syphilis. / B.T. Goh, P.C. van Voorst Vader // Int J STD AIDS 2001; 12 (Suppl. 3): 63-68. URL: http://tutj.Std/Aids_oct2004.v1253.
5. Аковбян В.А. Глава 7. Сифилис. Диагностика. / В кн.: В.А. Аковбян, В.Г. Нестеренко // Инфекции, передаваемые половым путем. - М.: Медиа Сфера, 2007: 306-323.
6. Лосева О.К., Ловенецкий А.Н. Эпидемиология, клиника, диагностика и лечение сифилиса. Руководство для врачей. // В кн.: Опыт организации борьбы с сифилисом в субъекте Российской Федерации. - Екатеринбург: Чароид, 2002: 159-248.
7. Соколовский Е.В. Руководство по лабораторной диагностике сифилиса в странах Восточной Европы. / Е.В. Соколовский, Н.В. Фриго, С.В. Ротанов и др. // Вестник дерматологии и венерологии 2008; 5: 87-96.
8. Tsuboi M, Evans J, Davies EP, Rowley J, Korenromp EL, Clayton T, Taylor MM, Mabey D, Chico RM. Prevalence of syphilis among men who have sex with men: a global systematic review and meta-analysis from 2000-20. Lancet Glob Health. 2021 Aug;9(8):e1110-e1118. doi: 10.1016/S2214-109X(21)00221-7. Epub 2021 Jul 8. PMID: 34246332; PMCID: PMC9150735.
9. Масеткин И.П. Серодиагностика сифилиса. Учебно-методическое пособие. / И.П. Масеткин, Л.С. Резникова, Т.А. Лучникова, В.Д. Елькин // Пермь, 1977.
10. Овчинников Н.М. Лабораторная диагностика заболеваний, передающихся половым путем. / Н.М. Овчинников, В.Н. Беднова, В.В. Де-лекторский // М.: Медицина, 1987; 303 с.
11. Дмитриев Г.А. СИФИЛИС. Дифференциальный клинико-лабораторный диагноз. / Г.А. Дмитриев, Н.В. Фриго // М.: Медицинская книга, 2004; 366 с.