

Изобретение относится к усовершенствованию способа получения трепонемного антигена, который находит широкое применение в диагностике сифилиса.

Известны аналоги получения трепонемного антигена из специфических орхитов кроликов-самцов, зараженных трепонемой штамма Никольса. Получаемый нативный трепонемный антиген (взвесь бледных трепонем в физиологическом растворе) широко используется при специфической диагностике сифилиса (РИФ, РИТ).

Однако данный препарат (нативный антиген) нестойкий, что делает невозможным унификацию реакции иммунофлуоресценции (РИФ) - наиболее популярной благодаря своей высокой чувствительности и специфичности.

В качестве прототипа выбран способ получения лиофильного трепонемного антигена, в котором бледные трепонемы высушивались в среде, содержащей мясной бульон (среда №2 ЦКВИ) с добавлением кроличьей сыворотки в соотношении 1:2 или 1:3. Для замораживания использовалась смесь сухого льда со спиртом (процесс высушивания длился 6-8 часов). [Автореф. дис. канд. меднаук Орлиной Э.А. "Усовершенствование методики постановки реакции иммунофлуоресценции для серологической диагностики сифилиса". - М., 1975]. Полученный таким способом трепонемный антиген не нашел применения в практике здравоохранения, так как высушивание не обеспечило стабильность препарата и его активность продолжала снижаться.

Задача, на решение которой направлено изобретение, состоит в том, чтобы получить стабильный трепонемный антиген путем предварительного высушивания защитной среды-стабилизатора в определенном режиме и последующего добавления к ней и высушивания в том же режиме нативного антигена, что обеспечивает сохранение антигенных свойств бледных трепонем на исходном уровне и возможность надежности диагностики сифилиса, что и является техническим результатом.

Вышеизложенное и позволяет утверждать о причинно-следственной связи между задачей, существенными признаками и техническим результатом.

Новизна заявляемого изобретения заключается в том, что создают защиту трепонемному антигену (штамм Никольса) путем высушивания стабилизатора защитной среды в ампулах в режиме: замораживают в течение 10 — 20 минут до температуры -20 --79°C, создают вакуум и высушивают в течение 20 - 30 часов с последующим добавлением к нему нативного трепонемного антигена и повторного высушивания в том же режиме.

Способ осуществляется следующим образом.

Защитную среду-стабилизатор разливают в ампулы, замораживают в течение 10 - 20 минут до температуры -20 - 79 °C и под вакуумом высушивают в течение 20 - 30 часов в лиофильной сушке. К высушенному стабилизатору добавляют нативный трепонемный антиген, который высушивают в указанном выше режиме. Готовый препарат запаивают под вакуумом и используют в РИФ или другой реакции в качестве антигена. Для постановки реакции иммунофлуоресценции (РИФ) вскрывают ампулу с сухим антигеном и добавляют фосфатный буфер (pH 7.2 - 7,4) до исходного объема (0,5 -1.0 мл), встряхивают содержимое ампулы для равномерного распределения бледных трепонем во взвеси и оставляют на 15-20 минут до полного растворения, повторно встряхивают взвесь и наносят по 0,1 - 0,3 мл взвеси на специально подготовленные для РИФ предметные стекла и делают мазки. В дальнейшем реакцию проводят как и с нативным антигеном.

Конкретный пример осуществления способа:

Были взяты образцы 15 сывороток больных сифилисом и лиц, обследуемых на сифилис (10 больных сифилисом: И.Б. 2336, 774, 2343,2348, 2353, 2335, 2347, 2342, 819, 821: 5 обследуемых на сифилис: И.Б. 2337, 2354, 820. 823).

Ход исследований: Вскрывают ампулу с сухим трепонемным (лиофильным) антигеном и восстанавливают его объем до исходного, добавляя 0,5 мл или 1,0 мл фосфатного буфера (pH 7,2 - 7,4).

Разводят испытуемое и контрольные образцы сыворотки, плазмы, ликвора фосфатным буфером или сорбентом (1:5, 1:10, 1:200).

На обезжиренные предметные стекла наносят по 0,01 - 0,03 мл разведенный лиофильный антиген, приготавливают мазки, высушивают их на воздухе и фиксируют 10 минут в химически чистом ацетоне.

Помещают предметные стекла с мазками-антигенами во влажную камеру.

Наносят на антиген испытуемые и контрольные образцы сыворотки, плазмы, ликвора на 30 минут.

Промывают препараты в двух порциях фосфатного буфера pH 7,2 - 7,4 на 10 минут.

Подсушивают на воздухе.

Помещают стекла во влажную камеру и наносят на мазки разведенную по титру люминесцентную сыворотку против комплекса иммуноглобулинов человека классов G.A.M на 30 минут.

Промывают препарат в двух порциях фосфатного буфера (pH 7,2 - 7,4). Высушивают на воздухе. Монтируют нелюминесцирующим маслом.

Учет реакции в люминесцентном микроскопе МЛ, ЛЮМАМ или другого типа по степени свечения бледных трепонем.

Контроли: Антигена - отсутствие свечения бледных трепонем.

Отрицательной сыворотки - отсутствие свечения.

Слабо-положительной сыворотки - 2+ -слабое свечение бледных трепонем.

Положительной сыворотки - 4+, 3+ - яркое свечение бледных трепонем.

Для сравнения полученных результатов указанные выше образцы сывороток крови исследовались параллельно и на нативном антигене. Получение идентичных результатов исследований на сухом лиофильном и нативном антигенах свидетельствует о его высокой активности.

Надежность способа подтверждается исследованиями, проведенными на 3,24 сыворотках больных различными формами сифилиса до и после лечения, обследуемой и контрольной групп, что свидетельствует также о идентичности активности сухого и нативного антигенов. Данные приведены в табл. 1 и 2.

Изучены также сроки хранения сухого трепонемного антигена (данные представлены в таблице 3).

Как видно из табл. 3, активность высушенного нами трепонемного антигена сохраняется при температуре +4 - +8 °С в течение трех лет (срок наблюдения).

Таким образом, заявляемый способ получения трепонемного антигена является надежным, обеспечивает высокую его активность, дает возможность стандартизовать РИФ, экономически выгоден (исключает необходимость содержания вивария при

каждой лаборатории), сокращает время проведения исследования.

Все это позволяет более широко использовать реакцию иммунофлуоресценции

(РИФ) для диагностики сифилиса, что будет способствовать улучшению эффективности диагностики и снижению заболеваемости сифилисом.

Активность нативного (I) и лиофильного (II) трепонемных антигенов

Форма сифилиса	Всего исследовано до лечения		Антиген 1							
			полож.		сл пол.		отриц.		полож.	
	абс	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Первичный серонегативный	4	100-25	4	100-25					4	100
Первичный серопозитивный	19	100-5	18	95±5	1	5±5			18	95
Вторичный свежий	17	100-6	17	100-6					17	100
Вторичный рецидивный	23	100-4	23	100-4					23	100
Скрытый ранний	44	100-2	42	96±3	2	4±3			42	96
Скрытый поздний	3	100-33	2	66±33	1	33±33			1	33
Нервной системы	7	100-14	4	57±20	2	28±18	1	14+4	5	71
ВСЕГО	117	100-1								
Обследуемая группа										
С положительными серореакциями	19	100-5	3	16±9	2	10±7	14	74+10	2	10
С клин. подозрением на сифилис	60	100-2					62	100-2		
Контакты и предполагаемые источники	48	100-2					48	100-2		
Контрольная группа	21	100-5					21	100-5		
ВСЕГО	265	100-1								

Продолжение табл.1

Форма сифилиса	Количество положительных сывороток		Антиген 1 I		Антиген 2 II		t	P
	абс.	%	абс.	%	абс.	%		
Первичный серонегативный	4	100-25	4	100-25	4	100-25	1	>0,05
Первичный серопозитивный	18	100-6	18	100-6	18	100-6	1	>0,05
Вторичный свежий	17	100-6	17	100-6	17	100-6	1	>0,05
Вторичный рецидивный	23	100-4	23	100-4	23	100-4	1	>0,05
Скрытый ранний	42	100-2	42	100-2	42	100-2	1	>0,05
Скрытый поздний	2	100	2	100	1	50±50	1	>0,05
Нервной системы	5	100-20	4	80±20	5	100-25	0,7	>0,05
ВСЕГО								
Обследуемая группа								
С положительными серореакциями	3	100-33	3	100-33	2	66±33	0,7	>0,05
С клин. подозрением на сифилис								
Контакты и предполагаемые источники								
Контрольная группа								
ВСЕГО								

Примечание: P - достоверность различий активности антигенов.

Активность нативного (I) и лиофильного (II) трепонемных антигенов

Первоначальный диагноз сифилис	Всего исследовано после лечения		Антиген 1						полож.	
			полож.		сл.пол.		отриц.			
			абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Первичный серонегативный	6	100-17	1	17±17	1	17±17	4	67±21	1	17
Первичный серопозитивный	7	100-14	5	28±18	3	43±20	2	28±18	2	28
Вторичный свежий	8	100-12	5	62±18	2	25±16	1	12±12	5	62
Вторичный рецидивный	8	100-12	5	62±18	1	12±12	2	25±16	4	50
Скрытый ранний	22	100-5	10	45±11	7	32±10	5	23±9	9	41
Скрытый поздний	5	100-22	4	80±20	1	20±20			4	80
Нервной системы	3	100-32			1	33±33	2	66±33		
ВСЕГО	59	100-2								

Продолжение табл.2

Первоначальный диагноз сифилис	Количество положительных сыворо-ток		Антиген 1 I		Антиген 2 II		t	P
			абс.	%	абс.	%		
Первичный серонегативный	1	100	1	100	1	100	1	>0,05
Первичный серопозитивный	2	100	2	100	2	100	1	>0,05
Вторичный свежий	5	100-20	5	100-20	5	100-20	1	>0,05
Вторичный рецидивный	5	100-20	5	100-20	4	80-20	1	>0,05
Скрытый ранний	10	100-10	10	100-10	9	80±20	1	>0,05
Скрытый поздний	4	100-25	4	100-25	4	100-25	1	>0,05
Нервной системы								
ВСЕГО								

Таблица 3

Влияние сроков хранения при +4 – +8 °С на активность сухого трепонемного антигена (Тест-системы 1-3)

Сроки сохране- ния, год	Число положительных результатов				t	P
	Нативный антиген		Сухой антиген			
	абс.	%	абс.	%		
1	40	100-2	40	100-2	1,0	>0,05
2	65	100-2	63	97+2	0,71	>0,05
3	22	100-5	21	95+5	0,70	>0,05

Примечание: P – достоверность различий в степени активности РИФ на нативном и сухом антигене.