

**ТАРАН**  
**Александр Владимирович**

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОВ ЛАБОРАТОРНОЙ  
ДИАГНОСТИКИ ЛЕПТОСПИРОЗА И  
ДЕТЕКЦИИ ЕГО ВОЗБУДИТЕЛЯ**

03.00.07 – микробиология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Ставрополь – 2008

Работа выполнена в ФГУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

**Научный руководитель:** доктор биологических наук  
**Жарникова Ирина Викторовна**

**Официальные оппоненты:** доктор медицинских наук  
**Ляпустина Лариса Вениаминовна**

доктор медицинских наук, профессор  
**Пожарская Виктория Олеговна**

**Ведущая организация:** ФГУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Защита диссертации состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2008 г. в \_\_\_ часов на заседании регионального диссертационного совета ДМ 212.256.09 при Ставропольском государственном университете по адресу: 355009, г. Ставрополь, ул. Пушкина д 1, корпус 2, аудитория 506.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ставропольского государственного университета.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2007 г.



Ученый секретарь  
диссертационного совета

*И.В.Ржепаковский*

**И.В.Ржепаковский**

## Общая характеристика работы

**Актуальность проблемы.** Патогенные лептоспиры распространены практически на всей территории Российской Федерации, урочая здоровью и жизни человека. Ежегодно в России регистрируется в среднем от 1,5 до 2,5 тысяч заболеваний лептоспирозами. Результаты лабораторного исследования являются решающими для подтверждения лептоспирозной этиологии заболевания [Онищенко Г.Г., 2001; Онищенко Г.Г., 2007; WHO, 2003; Савченко С.Т. с соавт., 2007]. В диагностике лептоспирозов ведущая роль принадлежит серологическим методам. Общепринятым стандартным тестом при исследовании сывороток крови является реакция микроагглютинации (РМА) [Малахов Ю.В. с соавт., 2001], использование которой связано с необходимостью поддержания на дорогостоящих сывороточных средах большого количества штаммов лептоспир. Учет результатов реакции осуществляется путем микроскопии в темном поле. Эти факторы ограничивают возможность внедрения РМА в широкую практику. С целью серологического скрининга и ранней диагностики лептоспирозов используется также иммуноферментный анализ (ИФА) [МУ 3.1.1128-02]. Генетические методы могут осуществляться только в специализированных лабораториях, отличаются значительной дороговизной и сложностью исполнения и поэтому широкого практического распространения не получили.

Среди способов диагностики инфекционных заболеваний особое место занимают иммуносорбционные, в основе которых лежит принцип аффинности [Егорова Т.А. с соавт., 2006]. Этапом усовершенствования общепринятых методов диагностики является разработка препаратов на основе магноиммуносорбентов (МИС), которые позволяют селективно концентрировать микробы на поверхности сорбента, применять специальные технические средства, упрощающие проведение анализов [Саяпина Л.В. с соавт., 2007].

Стабильно напряженная эпидемиологическая обстановка по лептоспирозу в ЮФО на протяжении последних лет, трудность постановки диагноза, неудовлетворительное состояние лабораторной диагностики послужили основанием для проведения исследований с це-

лью совершенствования диагностических препаратов. Внедрение в схему лабораторной диагностики и мониторинга природных очагов лептоспироза недорогих, экспрессных, чувствительных и специфичных тест-систем и методов позволит проводить быструю детекцию возбудителя в биологическом и полевом материале, будет способствовать своевременному проведению адекватных противоэпидемических мероприятий.

## ВЫВОДЫ

1. Качественный мониторинг объектов внешней среды на наличие лептоспир возможен путем использования разработанных препаратов на основе высокоспецифичных лептоспирозных сывороток, полученных с применением МИС, которые позволяют значительно снизить титр неспецифических антител и сохранить первоначальную активность иммунных сывороток,

2. В процессе совершенствования экспресс-диагностики лептоспироза и детекции его возбудителя удалось увеличить чувствительность иммуноферментного и иммунофлуоресцентного анализов в 100-1000 раз в сравнении с традиционными ИФА и РИФ, сократить время постановки анализов с сохранением стабильности препаратов в течение 2 лет (срок наблюдения) путем использования магноиммосорбентов (активированный полифепан с оксидом железа) с иммобилизованными лептоспирозными иммуноглобулинами и антигенами.

3. Получены диагностические лептоспирозные тест-системы

для ИФА, обладающие высокой чувствительностью ( $5 \times 10^4 - 1 \times 10^5$  м.к./мл) и специфичностью (отсутствие перекрестных реакций с гетерологичными штаммами). Имобилизация на мембране липосом фермента и лептоспирозных иммуноглобулинов обеспечила сохранение исходной активности и каталитических свойств фермента и лептоспирозных иммуноглобулинов, увеличила в 2 раза стабильность и срок годности системы по сравнению с традиционным ИФА.

4. Усовершенствованная РСА на стекле с применением разработанного алюмосиликатно-флюоресцентного лептоспирозного диагностикума позволяет выявлять лептоспиры в концентрации  $1 \times 10^5 - 1 \times 10^6$  м.к./мл при учете результатов реакции через 1-3 мин, что даёт возможность использовать его в качестве скрининг-теста. Применение в качестве матрицы алюмосиликата обеспечивает получение стабильных при хранении суспензионных препаратов. Использование ФИТЦ позволяет исключить процесс активирования матрицы.

5. Впервые созданы мобильные рабочие установки («Аквадиамаг») для проведения микробиологического мониторинга воды открытых водоемов на наличие возбудителя, обладающие высокой эффективностью, надежностью и возможностью селективного фиксирования на поверхности МИС лептоспир из большого объема жидкости.

6. Комплекс разработанных препаратов и методов был апробирован при исследовании клинического материала и показал их высокую диагностическую ценность. Специфические антитела при исследовании сывороток крови больных (49) и контактировавших с ними людей (56) обнаружены в РМА у 64,8 %, в традиционном ИФА на планшетах – у 67,6 %, в ИФА с МИС – у 81,9 % людей ( $p < 0,05$ ). Средний геометрический титр специфических антител в ИФА с МИС в 7,4 раза превысил титр антител в традиционном ИФА и в 88 раз – титр антител в РМА, что подтверждает высокую диагностическую ценность разработанных препаратов.

7. При выявлении лептоспир в полевом материале (вода открытого водоема) эффективным (80 % положительных проб) является ИФА, где в качестве твердой фазы использованы сконструированные

МИС с иммобилизованными антителами, выгодно отличающийся высокой чувствительностью и непродолжительным сроком проведения анализа (1,0-1,5 ч). Традиционными методами выявить лептоспиры в данном объекте не представляется возможным из-за низкой концентрации патогена.