

**ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ГИДРОЗОЛЬНОЙ АГГЛЮТИМАЦИИ В
ДИАГНОСТИКЕ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ.**

Попова С. В., Мешандин А. Г., Куклина С. А.

Кировская государственная медицинская академия

610020, г. Киров, ул. К. Маркса 112,

Тел.: +7 (8332) 67-5333,

E-mail: gavrilovich51@mail.ru

Резюме. Настоящая статья содержит данные по созданию отечественных бесприборных экспрессных препаратов для диагностики туберкулёза. Данные препараты, именуемые гидрозолями, позволяют осуществить проведение иммунодиагностики заболевания, в течение 2-10 минут без каких-либо приборов практически в полевых условиях. Данные препараты можно использовать для диагностики заболевания не только в сыворотке крови, но и в капиллярной крови.

Ключевые слова: коллоидный раствор берлинской лазури, генно-инженерный антиген, гидрозоль, реакция гидрозольной агглютинации, иммунодиагностика.

THE USE METHOD HYDROZOL AGGLUTINATION IN DIAGNOSIS INFECTION.

S.V. Popova, A.G. Meshandin, S. A. Kuklina

Summary: The real article consist et data by creation of native unapparatus expres preparation for diagnosis of tuberculosis. It is preparations are called by hydrozol and they allow carry out execution immunodiagnostic diseases during two ten minutes without any apparatus in the field condition. It s preparations can be used for diagnosis of diseases in the serum blood and blood capillary.

The keys importance words: solution colloid berlins blue, gen-engineering antigen, hydrozol, reaction hydrozol agglutination, immunodiagnostic.

Введение. В настоящее время туберкулёз является опасным инфекционным заболеванием. Его распространение, в том числе в Российской Федерации с 1991 года, стало крайне негативным социальным фактором. Естественно наряду с профилактикой данного заболевания, значительная роль принадлежит его эффективной и своевременной диагностике.

Из существующих методов диагностики туберкулёза можно указать на микробиологические методы, инструментальные (флюорография, рентгенография), выходящие за пределы компетенции настоящей статьи, и иммунологические методы (ИФА, ПЦР и др.).

Основными методами выявления возбудителя туберкулёза на сегодняшний день, к сожалению, остаются традиционные микробиологические методы - микроскопия мазка и культуральные исследования (посев), которые характеризуются высокой специфичностью. Чувствительность метода посева равна 80-90%, метода микроскопии ниже – не более 50% от всех больных туберкулёзом. Однако чтобы обнаружить, микобактерии при проведении микроскопии методом Циля – Нильсена, в 1 мл мокроты должно содержаться от 5000 и более микробных клеток, при условии выделения их во внешнюю среду. Этот метод не позволяет определить видовую принадлежность и идентифицировать возбудителя туберкулёза. Культуральный метод позволяет выявить МБТ при наличии в 1 мл исследуемого материала нескольких десятков жизнеспособных особей, к недостаткам метода можно отнести его высокую стоимость, сложность обработки диагностического материала, а также медленный рост микобактерий туберкулёза, обуславливающий необходимость длительного ожидания результатов исследования (от 14 дней до 12 недель) [1].

Инструментальные методы - рентгенодиагностика и флюорография не дают однозначных результатов при отсутствии выраженных морфологических изменений в органах, а диагностика внелегочных форм туберкулёза не всегда возможна

ИФА – иммуноферментный анализ – для определения противотуберкулёзных антител не имеет самостоятельного диагностического значения, что обусловлено недостаточной чувствительностью и специфичностью метода, для которого характерны не экспрессность, дороговизна приборов и комплексных наборов реактивов [5].

ПЦР - полимеразная цепная реакция – характеризуется высокой специфичностью – 99,8% и чувствительность – более 85% в испытаниях, однако при применении в клинике эти цифры оказались ниже. Это объясняется высокими требованиями к условиям проведения анализа, исключая перекрёстный перенос фрагментов молекул ДНК (РНК); сложностями, связанными с экстракцией ДНК (РНК) из инфекционного материала, кроме того стоимость аппаратуры и тест – наборов делает этот метод дорогостоящим [1].

Экспресс – диагностика: LEBI international США, Amni Sure Франция, Identa Corp. Израиль и др. – эти методы дороги и не могут быть использованы для массового обследования в Российской Федерации.

Основными методами выявления ТБ у детей и подростков – ежегодная туберкулинодиагностика (р. Манту), у взрослого населения – флюорография. Гиперчувствительность к туберкулину может возникать при контакте с непатогенными микобактериями окружающей среды, что снижает информативность этой методики. Кроме того, антигенная структура ныне персистирующих среди населения сероваров *M.Tuberculosis* существенно отличается от таковых во времена создания реактива Манту и вакцины Кальметта-Жерена. Последнее обстоятельство делает вакцинопрофилактику и туберкулинодиагностику проблематичной, если вообще эффективной.

На сегодняшний день диагностические затруднения при туберкулёзе общепризнанны. От раннего выявления больных зависит предупреждение заразных форм заболевания и эффективность лечебных и профилактических мероприятий. С возникновением осложнений возможности выздоровления от туберкулёза снижаются, а исходы запущенного процесса могут приводить к инвалидности. Необходимым условием успеха профилактики является внедрение в медицинскую практику методов, которые обладали бы требуемой специфичностью и чувствительностью, достоверностью результатов, простотой применения и низкой стоимостью, одновременно обеспечить экспрессность исследования искомого компонента. Для первоначального скрининга необходимо использовать диагностические препараты, которые должны быть бесприборны, т. е. должны позволять проводить постановки реакции непосредственно у постели больного, а также микро – количественны, т. е. возможности операций с очень малыми (10-100 мкл) объёмами биоматериала от больного, экспрессные.

В настоящее время разработано ряд иммунохимических иммунологических диагностических препаратов на основе коллоидных растворов неорганических соединений. Данные препараты, именуемые гидрозолями, позволяют осуществить проведение иммунодиагностики, в т. ч. туберкулёза, в течение 2-10 минут без каких-либо приборов практически в полевых условиях[2,3].

В связи с этим **целью** настоящей работы явилось изучение возможности применения реакции гидрозольной агглютинации в диагностике туберкулёзной инфекции.

Материалы и методы. Образцы крови были предоставлены клинико-диагностическими лабораториями г.Кирова ОКПТуб. Диспансера и г. Кирово-Чепецка ОР-218 МВД РФ. На первом этапе брали сыворотки от 16 пациентов с установленным диагнозом - туберкулёз, подтверждённый клинико-лабораторными методами. 90% изучаемых сывороток были от бациллярных больных с активной формой легочного туберкулёзного процесса, 10% от пациентов с внелегочной формой туберкулёза (туберкулёз среднего уха, мочевого пузыря, лимфадениты). В качестве контрольных были исследованы 48 образцов сыворотки крови здоровых доноров. Возраст пациентов составлял - мужчины от 25 до 55 лет.

Для проведения исследования были взяты биолиганды - по 100 мкл сывороток; коллоидный раствор берлинской лазури (гексацианферрат железа), приготовленный по оригинальной авторской технологии [2,3]; фосфатный буфер; генно-инженерный антиген (HT№1-CFP 10, CF10, HSP 70, HSP 65).

Для выявления специфических антител к *M. Tuberculosis*, мы использовали метод гидрозольной агглютинации. Гидрозоль на выявление специфических антител к *M. Tuberculosis* синтезировали по ранее опубликованной методике [2,3].

Постановку реакции осуществляли в U-образных лунках иммунологического планшета. Перед постановкой реакции проводили во вспомогательном планшете разведение сывороток 1:10, для этого в первый ряд лунок вносили буферный раствор для разведения, затем в те же лунки добавляли сыворотку отрицательную и положительную. Далее многоканальной пипеткой с первой лунки проводили титрование – от 1:20 до 1:2560, последние лунки оставляли для контроля (гидрозоль не вносился). Далее вносили готовый гидрозоль с адсорбированным на нём генно-инженерным антигеном, через 1-10 минут проводили регистрацию результатов на пористом носителе - фильтровальной бумаге.

На втором этапе было проведёно исследование панели сывороток от 20 реальных больных с клинически подтверждённым диагнозом туберкулёза. Во-первых, в отличие от первой группы параллельно для исследования у 10 из них была взята капиллярная кровь. В качестве отрицательного контроля были использованы пул сывороток и

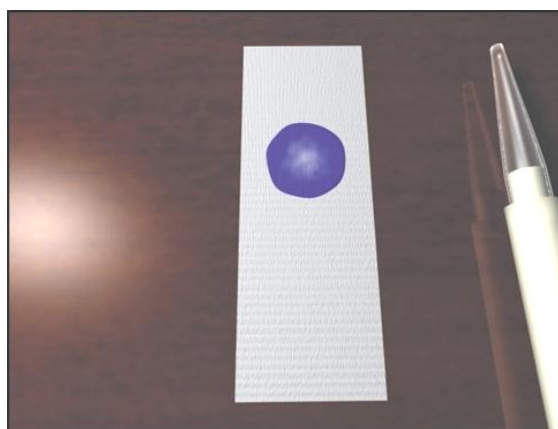
капиллярная кровь здоровых доноров. Во-вторых, перед постановкой во вспомогательном планшете проводили разведение сывороток 1:100, а затем в рабочую панель вносили буферный раствор для разведения и из предварительно разведённых положительных и отрицательных сывороток получали разведение 1:1000. Далее осуществляли постановку и учёт реакции описанные выше. На момент нашей постановки гидрозольной агглютинации, пациенты были обследованы на предмет бактериовыделения микробиологическими методами (микроскопия мазка и культуральный методы), при этом 10 из 20 оказались абациллярны (МБТ-). Данные взятия биоматериала, возраст, давность заболевания, диагноз, локализация очага, бактериовыделители или абациллярность (МБТ+,-), результаты проведённого исследования представлены в таблице №2.

Статистическую обработку для сравнения двух качественных признаков выполнили с помощью критерия Мак – Нимара [4] (Таблица №3).

Результаты и обсуждения. Оценка результатов реакции агглютинации на основе гидрозоля с адсорбированном на коллоидном растворе берлинской лазури генно-инженерных антигенов и сывороток (биолигандов) от лиц, инфицированных и здоровых доноров осуществлялась на фильтровальной бумаге. При положительной реакции образовывался плотный, компактный комплекс с чёткой границей, диаметром 2-4 мм; при отрицательной реакции происходило распределение частиц реагирующих веществ без чёткой границы в виде пятна синего цвета – рисунок №1.

Рисунок №1.

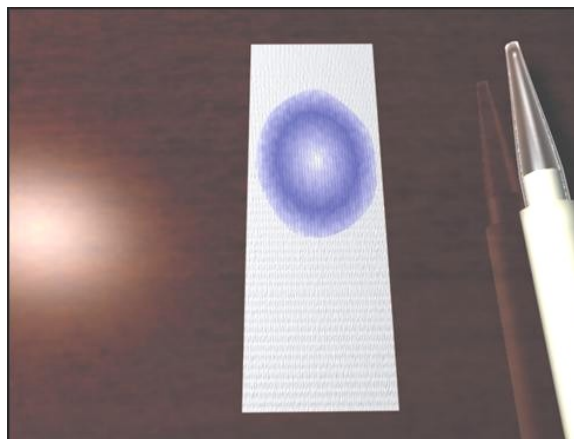
**Внешний вид реакции гидрозольной агглютинации
при постановке на мембранном фильтре.**



“Положительная” реакция.

Сыворотка больного туберкулёзом - разведение 1:2560

Пул сывороток здоровых доноров-
“Отрицательная” реакция.



Из первой группы брали пул сывороток 16 отрицательных и 16 положительных, проводили их исследование гидрозольным методом и получили следующие результаты (таблица № 1):

Таблица №

1

Опытные данные по титрованию пула сывороток

Т	Разведение сывороток							
	1:20	1:4	1:8	1:1	1:3	1:6	1:12	1:25
И		0	0	60	20	40	80	60
П								
С								
Ы								
В								
О								
Р								

П							
+	+	+	+	+	+	+	+
(есть							
реакци							
я)							
О							
-	-	-	-	-	-	-	-
(нет							
реакци							
и)							

Результаты, представленные в таблице, позволяют сделать вывод, что положительная реакция наблюдается не только в титре 1:20, но и вплоть до 1: 2560. При этом следует отметить, реакция с гидрозольным препаратом прошла положительная у всех пациентов с установленным ранее диагнозом и отрицательная у здоровых доноров.

Из второй группы у 20 пациентов получили аналогичные результаты, в сыворотках в разведении 1:1000 и капиллярной крови в разведении 1:100 наблюдали положительный результат в реакции гидрозольной агглютинации (таблица № 2).

Таблица

№2

Данные проведённого исследования панелей сывороток методом гидрозольной агглютинации и микробиологическими методами на базе КДЛ г. Кирово-Чепецке ОР-218 МВД РФ.

№ п/п, биоматериал взятый для исследования	Год рождения больного	Дата установления диагноза	Клиническая форма. Результат микробиологических методов.	Результат гидрозольной реакции
1. Больной №1 Взята сыворотка Взята капиллярная кровь	1966 г.	30.10.08 г.	Очаговый туберкулёз(ТБ) в/д лев. Лёгкого в фазе инф-ии МБТ(-)	положительный.
2. Больной №2 Взята сыворотка Взята капиллярн. кровь	1980 г.	23.10.08 г.	Инф. ТБ в/д прав. Лёгкого МБТ(-)	положительный.

3. Больной №3 Взята сыворотка Взята капиллярн. кровь	1958 г.	16.10.08 г.	Очаговый ТБ в/д лев. Лёгкого в фазе инф-ии МБТ(-)	положител ьн.
4. Больной №4 Взята сыворотка Взята капиллярн. кровь	1952 г.	14.10.08 г.	Инф. ТБ в/д прав. лёгкого МБТ(-)	положител ьн.
5. Больной №5 Взята сыворотка Взята капиллярн. кровь	1943 г.	08.10.08 г.	Инф. ТБ в/д прав. лёгкого МБТ(-)	положител ьн.
6. Больной №6 Взята сыворотка Взята капиллярн. кровь	1962 г.	30.09.08 г.	Инф. ТБ в/д прав. лёгкого МБТ(-)	положител ьн.
7. Больной №7 Взята сыворотка Взята капиллярн. кровь	1987 г.	19.09.08 г.	Инф. ТБ в/д прав. лёгкого МБТ(-)	положител ьн.
8. Больной №8 Взята сыворотка Взята	1987 г.	15.07.08 г.	Очаговый ТБ в/д справа в фазе инф-ии. Инф. ТБ	положител ьн.

капиллярн. кровь			слева в ф. инф-ии.МБТ (-)	
9. Больной №9 Взята сыворотка Взята капиллярн. кровь	1951 г.	27.05.08 г.	Инф.ТБ в/д лев. лёгкого МБТ(-)	положител ьн.
10. Больной №10 Взята сыворотка Взята капиллярн. кровь	1976 г.	28.08.08 г.	Инф. ТБ в/д лев. лёгкого МБТ(-)	положител ьн.
11.Больной №11 Взята сыворотка	1975 г.	выявлен04. 07года	Инф.ТБ в/д правого лёгкого в фазе распада (МБТ+)	положител ьн.
12. Больной №12 Взята сыворотка	1971 г.	выяв. 09.06 г.	Инф. ТБ в/д прав. лёгкого в фазе распада и отсева в в/д левого лёгкого МБТ(+)	положител ьн.
13. Больной №13 Взята сыворотка	1960 г.	выяв.02.08 г.	Инф. ТБ в/д левого лёгкого	положител ьн.

			в фазе распада МБТ(+)	
14. Больной №14 Взята сыворотка	1984 г.	выяв.12.06 г.	Инф. ТБ S6 прав. лёгкого МБТ(+)	положител ьн.
15. Больной №15 Взята сыворотка	1986 г.	выяв.12.06 г.	Инф. ТБ в/д лев. лёгк. в ф. распад МБТ(+)	положител ьн.
16. Больной №16 Взята сыворотка	1982 г.	выяв.03.06 г.	Инф. ТБ в/д прав. лёгкого в фазе распада МБТ(+)	положител ьн.
17. Больной №17 Взята сыворотка	1985 г.	выяв. 04.08г.	Инф. ТБ в/д лёгк. в ф. распад МБТ(+)	положител ьн.
18. Больной №18 Взята сыворотка	1982 г.	выяв.2005г .	Инф. ТБ в/д лёгк в фазе распада МБТ(+)	положител ьн.
19. Больной №19 Взята сыворотка	1977 г.	выяв.03.06 г.	Инф. ТБ в/д правого лёгкого в ф. распад.и от- сева в в/длев.лёг МБТ(+)	положител ьн.
20. Больной №20 Взята сыворотка	1976 г.	выяв.2002г .	Инф. ТБ в/д обоих лёгких МБТ(+)	положител ьн.

Из таблицы видно, что 10 пациентов из 20 по микробиологическим методам дали отрицательный результат (МБТ -), а с гидрозольным препаратом все 20 прошли положительно, то есть появляется возможность малоинвазивным методом определять антитела к *M. Tuberculosis*, даже когда больной не выделяет во внешнюю среду, любой локализации (туберкулёз костной системы, почек и т. д.).

Статистическую обработку для сравнения двух качественных признаков – «есть» или «нет», определённых у одних и тех же больных выполнили с помощью критерия Мак – Нимара [4] (Таблица №1).

Таблица №3

Таблица сопряженности

		Метод второй	
		есть	нет
М е т о д п е р в ы й	есть	A=10	B=0
	нет	C=10	D=0

Для проверки гипотезы определяется экспериментальное значение χ^2 : по формуле:

$$\chi^2_{\text{эк.}} = \frac{(|B-C| - 1)^2}{\frac{B+C}{0+10} \cdot \frac{0+10}{10}} = \frac{(0-10) - 1)^2}{\frac{0+10}{10}} = \frac{(-9)^2}{10} = 8,1$$

Где $\chi^2_{\text{эк.}}$ – экспериментальное

Критическое значение определяется по таблице χ^2 , исходя из числа степеней свободы $f=1$ и уровня значимости α по таблице:

$$\alpha=0,05 \chi^2_{\text{кр.}}=3,8$$

$$\alpha=0,01 \chi^2_{\text{кр.}}=6.6$$

$$\alpha=0.001 \chi^2 \text{ кр.}=10.8$$

Где χ кр.- критическое

Экспериментальные значения критерия больше критического с вероятностью ошибки менее 0,01 (<1%).

Таким образом, мы можем с вероятностью более 99% (мощность критерия >0,09) утверждать, что предложенный метод даёт очень большую вероятность совпадения диагноза при помощи изучаемого метода и традиционных методов диагностики туберкулёза различной локализации.

Выводы:

1. Гидрозольный препарат позволяет выявить специфические антитела к *M. Tuberculosis* в сыворотке крови, это даст возможность проводить скрининговое обследование по выявлению данной патологии.
2. Гидрозольный препарат также может быть использован в качестве диагностического препарата в применении к цельной, в том числе капиллярной крови.
3. Простота и доступность методики позволит врачу любой специальности у постели больного предварительно поставить диагноз провести дифференциальную диагностику и в дальнейшем направить обследовать биоматериал в специализированные лаборатории.

Авторы выражают благодарность главному врачу Л. В. Плехову и заведующей клинико-диагностической лаборатории О.Н. Якимовой из специализированного учреждения ОР-218 МВД РФ (г. Кирово- Чепецка, Кировской области) и лаборатории КОКПТуб. Диспансера в предоставлении образцов сывороток и капиллярной крови для исследования.

Литература:

- 1.Ерохин В.В. Микробиологические методы диагностики туберкулёза/ В.В. Ерохин, В.И. Гольшевская, Э.В.Севастьянова //М.- Тверь – ООО Издательство «Триада», 2008,С. 22-23, 24-25, 32-33 .

2.КуклинаС.А. Способ диагностики инфекционных заболеваний/ С.А.Куклина,А,А, Мальщуклова,А,Г, Мешандин// - Инф. лист ЦНТИ, 2006, № 24-025-06.

3.Орлова О. Ю. Синтез гидрозольных препаратов на основе нерастворимых соединений d – элементов: дис. канд. техн. наук: защищена 19.02.05:утв. 12.32.05 / Орлова Ольга Юрьевна - К., 2005.-С.120.

4.Планц Стентон Медико-биологическая статистика/ Планц Стентон// М.:Практика.- 1998.-С.314-418.

5.Степанян И. Э. Диагностика туберкулёза органов дыхания в клинике внутренних болезней / И.Э. Степанян.– Режим доступа: [http: // www. med-spravochnik. ru](http://www.med-spravochnik.ru)

Научный руководитель д.т.н., профессор

Мешандин Алексей Гаврилович (тел.8-912-722-29-75)

ПоповаС.В. – врач - КЛД КОКБ - является соискателем степени кандидата биологических наук (тел. 8-909-716-12-23)