

Применение тест-системы «Лайн-Блот Сифилис» в диагностике сифилиса методом линейного иммуноблотинга

С.Г. Марданлы, В.А. Арсеньева, Н.В. Фриго, С.В. Ротанов, Е.А. Амелина, М.В. Захаров

Using the Line Blot Syphilis test system for diagnosing syphilis by the linear immunoblotting method

S.G. MARDANLY, V.A. ARSENIYEVA, N.V. FRIGO, S.V. ROTANOV, YE.A. AMELINA, M.V. ZAKHAROV

об авторах:

С.Г. Марданлы — президент ЗАО «ЭКОлаб», акад. РАМТН, к.м.н.

В.А. Арсеньева — старший микробиолог отдела перспективных разработок ЗАО «ЭКОлаб»

Н.В. Фриго — главный научный сотрудник, заведующая отделом лабораторной диагностики ИППП и болезней кожи ФГУ «ГНДЦК Минздравсоцразвития России», г. Москва, д.м.н.

С.В. Ротанов — ведущий научный сотрудник отделения лабораторной диагностики сифилиса отдела лабораторной диагностики ИППП и болезней кожи ФГУ «ГНДЦК Минздравсоцразвития России», г. Москва, д.м.н., доцент

Е.А. Амелина — начальник отдела перспективных разработок ЗАО «ЭКОлаб», к.б.н.

М.В. Захаров — начальник лаборатории белковой инженерии ЗАО «ЭКОлаб», к.б.н.

Разработана новая отечественная тест-система «Лайн-Блот Сифилис» (ЗАО «ЭКОлаб») на основе метода линейного иммуноблотинга с использованием рекомбинантных антигенов *Treponema pallidum*. В представленной работе диагностическая значимость диагностикума «Лайн-Блот Сифилис» оценивалась в формате подтверждающего теста. В рамках проведенного исследования тест-система показала абсолютную чувствительность и специфичность по отношению к серопозитивным ($n = 237$) и серонегативным ($n = 114$) образцам, в которых наличие или отсутствие антител к *T.pallidum* было установлено двумя трепонемными тестами. При исследовании 14 образцов, отнесенных на основании результатов двух тестов (РПГА и РИФаБс) в группу сомнительных анализов, соответствие данных, полученных в тест-системе «Лайн-Блот Сифилис», данным «INNO-LIA Syphilis score» составило 100% (14/14), ИФА — 93% (13/14), РИФаБс — 57% (8/14). Рекомендовано использовать тест-систему «Лайн-Блот Сифилис» (ЗАО «ЭКОлаб») в качестве подтверждающего теста на сифилис.

Ключевые слова: диагностика сифилиса, иммуноблотинг.

ZAO ECOlab (Russia) developed Line Blot Syphilis, a new test system on the basis of the linear immunoblotting method using *Treponema pallidum* recombinant antigens. The article assessed the diagnostic value of the Line Blot Syphilis test system in the form of a confirmatory test. As a part of the conducted study, the test system demonstrated its absolute sensitivity and specificity to serum-positive ($n = 237$) and serum-negative ($n = 114$) samples, in which the presence or absence of *T.pallidum* antibodies was confirmed by two treponemal tests. As a result of examining 14 samples attributed to doubtful analytes based on two test results (passive hemagglutination test and immunofluorescence test with absorption), the data compliance between the Line Blot Syphilis test system and data from INNO-LIA Syphilis Score amounted to 100% (14/14) or 93% (13/14) for the immune-enzyme assay and 57% (8/14) for the immunofluorescence test with absorption. It is recommended to use the Line Blot Syphilis test system (ZAO ECOlab) as a confirmatory syphilis test.

Key words: syphilis diagnostics, immunoblotting.

■ Сифилис — инфекционное заболевание человека, вызываемое *Treponema pallidum*, лабораторная диагностика которого проводится с использованием микробиологических и серологических методов исследования [1]. Высокая локальная концентрация инфекционного агента в местах его внедрения в организм человека при первичном и вторичном сифилисе позволяет выявлять *T. pallidum* микробиологическими методами, что является абсолютным критерием окончательного диагноза [2]. При других стадиях и формах сифилитической инфекции возможности прямых микробиологических тестов ограничены, прежде всего ввиду отсутствия или низкой концентрации *T. pallidum* в исследуемом биологическом материале.

Современная серологическая диагностика сифилиса, исключая скрининговые обследования, носит комплексный характер. Применение двух методов: нетрепонемного и трепонемного, направленных на выявление серологических маркеров инфекции, позволяет увеличить вероятность постановки правильного предварительного диагноза [1, 3].

Следует отметить, что ни один из используемых на сегодняшний день серологических тестов не обладает 100% специфичностью [4, 5]. В ряде случаев на фоне отсутствия клинических проявлений инфекции для постановки предварительного диагноза требуется привлечение всего арсенала специфических (трепонемных) диагностических тестов. В связи с этим актуальной проблемой сифилидологии является разработка новых отечественных диагностических наборов для диагностики сифилиса, обладающих высокой чувствительностью и специфичностью, направленных на сокращение объема необходимых серологических исследований [6].

Тесты, основанные на детекции флуоресцентного сигнала (реакция иммунофлуоресценции — РИФ), считаются одними из лучших тестов на сифилис [7]. РИФ чувствительна на всех стадиях инфекции, применяется как подтверждающая реакция при раннем, скрытом сифилисе и при установлении ретроспективного диагноза. Несмотря на высокую диагностическую ценность, широкому внедрению РИФаБс в повседневную практику препятствуют необходимость использования живой *T. pallidum*, высокая стоимость и длительность проведения исследования. Кроме того, оценка результатов РИФ носит субъективный характер.

В последние годы за рубежом для серодиагностики сифилиса начали активно использовать метод иммуноблотинга. Существует несколько коммерческих тест-систем на основе данного метода. Одни из них выполнены в формате вестерн-блота, состоят из стрипов, на которые перенесены белковые компоненты *T. pallidum*, предварительно разделенные электрофорезом в полиакриламидном геле [8, 9]. Другие, как, например, зарегистрированная

в России тест-система «INNO-LIA Syphilis Score» (Innogenetics, Бельгия) [10], выполнены в формате линейного блота, состоят из стрипов, на которых в виде дискретных линий сорбированы рекомбинантные и синтетические полипептиды — аналоги поверхностных антигенов *T. pallidum*, TrpN15, TrpN17, TrpN47 и TrpA [11]. Результаты вестерн-блота трудно интерпретировать, так как на стрипах выявляется большое разнообразие антител, многие из которых являются группоспецифическими [12]. Напротив, интерпретация результатов линейного блота не вызывает затруднений; кроме того, дополнительные контрольные линии, нанесенные на стрип, позволяют проводить полуколичественную оценку уровня антител к четырем антигенам *T. pallidum* [10]. При проведении сравнительного изучения диагностической эффективности тест-системы «INNO-LIA Syphilis Score» со стандартными серологическими методами (реакция микропреципитации — РМП, иммуноферментный анализ — ИФА, реакция пассивной гемагглютинации — РПГА, РИФаБс) авторами работы [13] установлена 99,6% чувствительность и 99,5% специфичность линейного иммуноблотинга. При этом тест-система не давала положительных результатов при исследовании 90 образцов сыворотки, полученных от пациентов с болезнью Лайма и аутоиммунными заболеваниями [10]. В исследованиях, проведенных отечественными исследователями, также была подтверждена высокая чувствительность (100%) и специфичность (98%) тест-системы «INNO-LIA Syphilis Score» [14—16]. Показатели чувствительности линейного иммуноблотинга превышали чувствительность стандартных нетрепонемных (РМП, РСКк) и трепонемных тестов (РСКт, ИФА, РПГА) при первичном и раннем скрытом сифилисе. При обследовании лиц, имевших половой контакт с больными сифилисом, положительный результат в «INNO-LIA Syphilis Score» был получен у 36% пациентов, в РМП — у 7%, в ИФА — у 21%, в то время как другие реакции (РСКт, РСКк, РИФаБс и РПГА) дали отрицательный результат [16]. Проведенные исследования позволили рекомендовать метод иммуноблотинга в качестве подтверждающего теста на сифилис как дополнительный либо альтернативный РИБТ (реакция иммобилизации бледных трепонем) и РИФаБс [13, 15]. Несмотря на то что в настоящее время существуют технические возможности автоматизации процедуры использования тест-системы «INNO-LIA Syphilis Score», ее широкому применению в лабораторной практике препятствует высокая стоимость и длительность процедуры исследования [3].

Целью настоящей работы явились разработка и изучение диагностической эффективности отечественной тест-системы «Лайн-Блот Сифилис» для диагностики сифилиса методом линейного иммуноблотинга, разработанной ЗАО «ЭКОлаб».

Материал и методы

Диагностическая тест-система «Лайн-Блот Сифилис» производства ЗАО «ЭКОлаб» (ТУ 9398-118-70423725-2009; Регистрационное удостоверение № ФСР 2010/06925 от 1 марта 2010 г.) представляет собой набор реагентов, рассчитанный на проведение 24 исследований, позволяющих полуколичественно оценивать в ликворе, плазме и сыворотке крови человека титр IgG-антител к четырем антигенам *T. pallidum*: TrN15, TrN17, TrN47 и TmpA.

В состав набора входят:

- десятикратный концентрат промывочного раствора (ПР);
- раствор для разведения исследуемых образцов (РРО);
- конъюгат (представляет собой козьи антитела к IgG человека, конъюгированные с щелочной фосфатазой);
- раствор для разведения конъюгата;
- раствор хромогенного субстрата для выявления ферментативной активности щелочной фосфотазы;
- контрольные образцы (К+ и К-), представляющие собой сыворотки крови человека, содержащие и не содержащие антитела к *T. pallidum*;
- тест-полоски (стрипы) из нитроцеллюлозной мембраны, на которые в виде дискретных линий нанесены четыре рекомбинантных белка *T. pallidum*: TrN15, TrN17, TrN47 и TmpA.

Кроме линий (зон) рекомбинантных антигенов, на каждом стрипе имеются четыре контрольные линии: линия контроля антигена (K_{ар}) — зона нанесения рекомбинантного белка тиоредоксина *E.coli* — служит для оценки корректности проведения теста на исследуемом образце (при правильно проведенном исследовании эта полоса не окрашивается); три калибровочные линии, содержащие иммобилизованные IgG человека, которые при проведении исследования дают зоны дискретно уменьшающейся интенсивности окрашивания, соответствующие баллам 3+, 1+, 0,5+ (Cut off); калибровочная линия, соответствующая 1+, одновременно служит контролем внесения образца биологического материала (рис. 1).

Процедура исследования образцов (сыворотки, плазмы и ликвора) с использованием тест-системы «Лайн-Блот Сифилис» проводится при комнатной

температуре (20—25°C). Стрип погружают в 1 мл РРО, содержащий 20 мкл исследуемого образца (разведение 1:50), инкубируют в течение 2 ч. После четырех-пятиминутных промывок стрипов однократным ПР к ним добавляют конъюгат (в рабочем разведении), инкубируют в течение 30 мин. Снова выполняют процедуру промывки, как описано выше, добавляют раствор хромогенного субстрата, инкубируют в течение 15 мин. Развитие окраски останавливают посредством трехкратной промывки стрипов дистиллированной водой.

Полученные результаты оценивают визуально путем сравнения интенсивности окрашивания зон нанесения антигенов TrN15, TrN17, TrN47 и TmpA с окрашиванием трехкалибровочных линий. Интенсивность окраски каждой линии оценивается следующим образом:

- 0 — нет линии или ее интенсивность ниже, чем интенсивность контрольной линии 0,5+ (Cut off);
- 0,5 — интенсивность линии равна интенсивности контрольной линии 0,5+;
- 1 — интенсивность линии больше, чем 0,5+, но меньше либо равна 1,0+;
- 2 — интенсивность линии между контрольными линиями 1,0+ и 3,0+;
- 3 — интенсивность линии равна интенсивности контрольной линии 3,0+;
- 4 — интенсивность линии выше, чем интенсивность контрольной линии 3,0+.

Результат исследования считается:

- отрицательным — при отсутствии окрашенных полос на стрипе или при наличии одной полосы, окрашенной с интенсивностью, равной 0,5;
- сомнительным — при наличии одной полосы, окрашенной с интенсивностью больше или равной 1;
- положительным, если на стрипе определяется не менее 2 полос, окрашенных с интенсивностью 0,5 или выше;
- неопределенным — при выявлении на стрипе линии контроля антигена, окрашенной с интенсивностью, превышающей интенсивность контрольной линии 0,5+ (Cut off).

Оценку диагностической эффективности тест-системы «Лайн-Блот Сифилис» проводили в два эта-

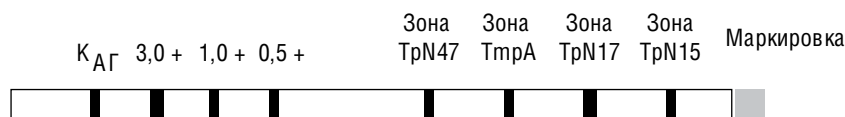


Рис. 1. Схема нанесения антигенов *T.pallidum*, контролей и калибраторов на нитроцеллюлозном стрипе в тест-системе «Лайн-Блот Сифилис»

па. На первом этапе показатели чувствительности и специфичности тест-системы изучались на коллекции аттестованных образцов сыворотки крови, входящих в состав панелей контрольных материалов для серодиагностики сифилиса: «Внутрилабораторный контроль антипаллидум» и «Контрольная панель сывороток, содержащих и не содержащих антитела к *T. pallidum*» («Вектор-Бест»); «П-АТ-*T. pallidum*. Панель сывороток, содержащих и не содержащих антитела к *T. pallidum*» и «ВЛ-Контроль-АТ-*T. pallidum*» («МБС»); «СОП-антипаллидум» («ЭКОлаб»); «Экспертная панель контрольных сывороток для серодиагностики сифилиса «ЭП СИФИЛИС» (ФГУ «ГНЦД Росмедтехнологий»). Всего исследовано 64 положительных образца и 34 отрицательных образца сыворотки, входящих в состав контрольных материалов. Для оценки воспроизводимости результатов с использованием тест-системы «Лайн-Блот Сифилис» было проведено трехкратное повторение исследований с контрольными материалами.

Второй этап включал изучение результатов работы тест-системы «Лайн-Блот Сифилис» на 162 образцах сыворотки крови и 48 образцах спинномозговой жидкости, полученных от пациентов, проходивших обследование на наличие сифилиса в Городской клинической больнице № 14 имени В.Г. Короленко Департамента здравоохранения г. Москвы, и на 57 образцах сыворотки крови, полученных от здоровых доноров (Станция переливания крови г. Орехово-Зуево). Биологический материал, полученный от пациентов, был охарактеризован в Городской клинической больнице № 14 с помощью трепонемных тестов (РПГА, РИФаБс и/или РИБТ). Образцы были разделены на три группы, согласно результатам проведенного исследования. Образцы, давшие положительный результат во всех трепонемных тестах (РПГА, РИФаБс/РИБТ), были отнесены в группу положительных анализов; образцы, давшие отрицательный результат во всех трепонемных тестах, — в группу отрицательных анализов, образцы, давшие дискордантные результаты, — в группу сомнительных.

Результаты

При проведении первого этапа исследования с использованием коллекции аттестованных образцов сыворотки крови, содержавших ($n = 64$) и не содержавших ($n = 34$) антитела к *T. pallidum*, была установлена 100% чувствительность, специфичность и воспроизводимость тест-системы «Лайн-Блот Сифилис». Во всех исследованных положительных образцах сыворотки наблюдалось 100% выявление антител к TrN17 в титре от 1 до 4 баллов, тогда как титр антител к антигенам TrN15, TrN47 и TrpA колебался от 0 до 3 баллов. На рис. 2 и в табл. 1 представлены результаты исследования контрольных материалов из состава набора реагентов «П-АТ-*T. pallidum*» и оценка результатов исследования в баллах.

Накопленный на сегодняшний день опыт использования тест-системы «INNO-LIA Syphilis Score» [14—16] показывает, что основным серологическим маркером активного и перенесенного сифилиса являются трепонемоспецифические антитела к антигену TrN17. Как следует из данных, приведенных на рис. 2 и в табл. 1, тест-система «Лайн-Блот Сифилис» детектировала линию антигена TrN17 во всех положительных образцах набора «П-АТ-*T. pallidum*»; в 15 из 16 образцов титр антител к этому антигену был выше или сравним с титром антител к другим антигенам, входящим в тест-систему.

На втором этапе диагностическая эффективность тест-системы «Лайн-Блот Сифилис» была исследована на 162 образцах сыворотки крови и 48 образцах спинномозговой жидкости, полученных от пациентов, проходивших обследование на наличие сифилиса.

В результате тестирования положительных анализов ($n = 156$) с использованием тест-системы «Лайн-Блот Сифилис» были получены положительные ответы, согласующиеся с результатами исследования сыворотки крови с использованием других трепонемных тестов (РПГА, РИФаБс и/или РИБТ) (табл. 2). Образцы сыворотки донорской крови ($n = 57$), вошедшие в группу отрицательных анализов, дали негативный результат в тест-системе «Лайн-Блот Сифилис», что также совпадало с результатами исследования данных образцов с помощью других трепонемных тестов. Полученные данные позволили сделать заключение о 100% клинической чувствительности и 100% клинической специфичности тест-системы «Лайн-Блот Сифилис» при исследовании образцов сыворотки крови. Сомнительные образцы ($n = 6$), давшие в РПГА, РИФаБс/РИБТ дискордантные результаты, были дифференцированы с помощью тест-системы «Лайн-Блот Сифилис» следующим образом: как отрицательные (один образец, № 3519), положительные (два образца, № 1/21 и № 3144) и сомнительные (три образца, № 23/13657, № 5202 и № 4/108).

Анализ образцов спинномозговой жидкости в тест-системе «Лайн-Блот Сифилис» (табл. 3) дал согласующиеся результаты с трепонемными тестами (РПГА, РИФаБс и/или РИБТ) в отношении положительных ($n = 17$) и отрицательных ($n = 23$) образцов ликвора, что также позволило сделать заключение о 100% клинической чувствительности и 100% клинической специфичности тест-системы «Лайн-Блот Сифилис» при исследовании образцов ликвора. Сомнительные образцы ликвора ($n = 8$), давшие в РПГА, РИФаБс/РИБТ дискордантные результаты, были дифференцированы с помощью тест-системы «Лайн-Блот Сифилис» следующим образом: как положительные (четыре образца, № 13, № 17, № 10/3424 и № 9/3422) и сомнительные (четыре образца, № 3, № 4, № 15 и № 16).

Для подтверждения результатов исследования сомнительных образцов, полученных с использова-

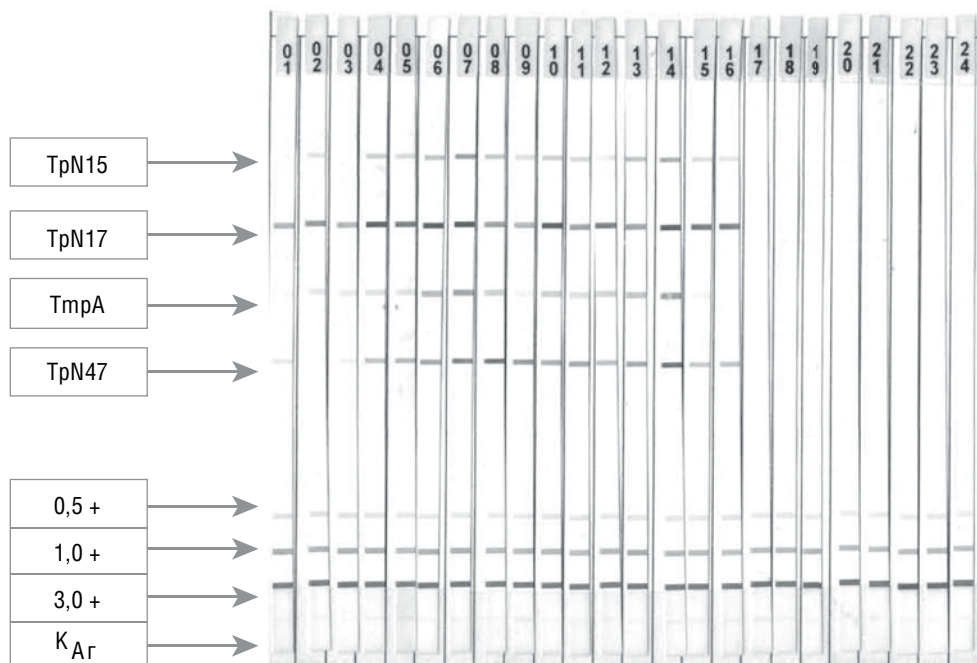


Рис. 2. Результаты исследования сыворотки крови из наборов контрольных материалов «П-АТ-*T. pallidum*», содержащих (№ 1—16) и не содержащих (№ 17—24) антитела к *T. pallidum*. Нумерация стрипов соответствует нумерации образцов, входящих в набор «П-АТ-*T. pallidum*»

ТАБЛИЦА 1

Оценка иммунореактивности контрольных образцов сыворотки № 1—16 набора «П-АТ-*T. pallidum*», выраженная в баллах, по отношению к четырем рекомбинантным антигенам (TrpN15, TrpN17, TrpN47 и TrpA)

| Антиген | № образца | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------|-----------|-----|-----|---|-----|---|---|---|-----|----|-----|-----|----|----|-----|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 |
| TrpN15 | 0 | 0,5 | 0 | 1 | 1 | 2 | 3 | 1 | 0,5 | 1 | 1 | 0,5 | 1 | 2 | 0,5 | 0,5 |
| TrpN17 | 2 | 3 | 2 | 4 | 3 | 4 | 4 | 2 | 2 | 4 | 2 | 3 | 2 | 4 | 3 | 3 |
| TrpA | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 1 | 0,5 | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0,5 | 1 | 1 | 2 | 0 | 0 |
| TrpN47 | 1 | 0 | 0 | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 | 3 | 1 | 1 |

нием тест-системы «Лайн-Блот Сифилис», анализы, отнесенные в группу «сомнительных», были дополнительно проанализированы в тест-системах «INNO-LIA Syphilis Score» и «ИФА-антипаллидум одностадийная» (ЭКОлаб). Результаты, полученные при исследовании сомнительных образцов в тест-системах «Лайн-Блот Сифилис» и «INNO-LIA Syphilis Score», оказались идентичными как по суммарному результату реакции, так и по результатам определения антител к четырем отдельным антигенам, входящим в состав диагностических наборов (табл. 4). Совпадение результатов тестирования

сомнительных образцов, полученных с использованием тест-систем «Лайн-Блот Сифилис» и «ИФА-антипаллидум одностадийная», было получено для 13 (93%) из 14 исследованных образцов. Соответствие результатов в тест-системах РИФабс и «Лайн-Блот Сифилис» составило 57% (табл. 5).

Обсуждение результатов

Разработка технологий производства рекомбинантных антигенов бледной трепонемы способствовала широкому внедрению в серологическую диагностику

ТАБЛИЦА 2

Результаты сравнения данных, полученных при исследовании сыворотки крови в тест-системе «Лайн-Блот Сифилис» и других трепонемных тестах (РПГА, РИФаБс/РИБТ)

| Результат РПГА, РИФаБс/РИБТ | Результат «Лайн-Блот Сифилис» | | | |
|-----------------------------|-------------------------------|---------------|--------------|-------|
| | отрицательные | положительные | сомнительные | всего |
| Отрицательные* | 57 | 0 | 0 | 57 |
| Положительные | 0 | 156 | 0 | 156 |
| Сомнительные | 1 | 2 | 3 | 6 |
| Итого | 58 | 158 | 3 | 219 |

Примечание. * Сыворотки донорской крови (n = 57), негативные по наличию серологических маркеров сифилитической инфекции в трех тестах (RPR, РПГА и ИФА).

ТАБЛИЦА 3

Результаты сравнения данных, полученных при исследовании образцов ликвора в тест-системе «Лайн-Блот Сифилис» и других трепонемных тестах (РПГА, РИФаБс/РИБТ)

| Результат РПГА, РИФаБс/РИБТ | Результат «Лайн-Блот Сифилис» | | | |
|-----------------------------|-------------------------------|---------------|--------------|-------|
| | отрицательные | положительные | сомнительные | всего |
| Отрицательные | 23 | 0 | 0 | 0 |
| Положительные | 0 | 17 | 0 | 17 |
| Сомнительные | 0 | 4 | 4 | 8 |
| Итого | 23 | 21 | 4 | 48 |

ТАБЛИЦА 4

Результаты оценки иммунореактивности сомнительных образцов в тест-системах «Лайн-Блот Сифилис» и «INNO-LIA Syphilis Score» по суммарному результату реакций и по отношению к каждому из четырех рекомбинантных антигенов

| № образца | «Лайн-Блот Сифилис» | | | | | «INNO-LIA Syphilis score» | | | | |
|------------------|---------------------|-------|------|-------|------|---------------------------|-------|------|-------|------|
| | ТрN15 | ТрN17 | ТрpA | ТрN47 | Рез. | ТрN15 | ТрN17 | ТрpA | ТрN47 | Рез. |
| Сыворотка | | | | | | | | | | |
| 23/13657 | 0 | 1 | 0 | 0 | ± | 0 | 2 | 0 | 0 | ± |
| 1/21 | 0,5 | 0,5 | 0 | 0,5 | + | 2 | 0,5 | 0 | 1 | + |
| 3519 | 0 | 0,5 | 0 | 0 | - | 0 | 0,5 | 0 | 0 | - |
| 5202 | 1 | 0 | 0 | 0 | ± | 1 | 0 | 0 | 0 | ± |
| 3144 | 0,5 | 0,5 | 0 | 1 | + | 1 | 2 | 0 | 1 | + |
| 4/108 | 0 | 1 | 0 | 0 | ± | 0 | 2 | 0 | 0 | ± |
| Ликвор | | | | | | | | | | |
| 3 | 0 | 1 | 0 | 0 | ± | 0 | 3 | 0 | 0 | ± |
| 4 | 0 | 0 | 1 | 0 | ± | 0 | 0 | 1 | 0 | ± |
| 13 | 0 | 1 | 0,5 | 0 | + | 0 | 2 | 0,5 | 0 | + |
| 15 | 0 | 1 | 0 | 0 | ± | 0 | 2 | 0 | 0 | ± |
| 16 | 0 | 1 | 0 | 0 | ± | 0 | 1 | 0 | 0 | ± |
| 17 | 0 | 0,5 | 1 | 0,5 | + | 0 | 1 | 1 | 0,5 | + |
| 10/3424 | 0,5 | 1 | 0,5 | 0 | + | 0,5 | 2 | 0,5 | 0 | + |
| 9/3422 | 0 | 1 | 0,5 | 0 | + | 0 | 2 | 0,5 | 0 | + |

ТАБЛИЦА 5

Результаты сравнительной оценки иммунореактивности «сомнительных» образцов в четырех тест-системах для серодиагностики сифилиса

| № образца | Информация о пациенте | «Лайн-Блот Сифилис» | «INNO-LIA Syphilis score» | ИФА ¹ | РИФабс ² |
|------------------|----------------------------|---------------------|---------------------------|------------------|---------------------|
| Сыворотка | | | | | |
| 23/13657 | Перелом костей голени | Сомн ³ | Сомн ³ | Сомн | Отр |
| 1/21 | Беременность 28 нед. | Пол | Пол | Пол | Отр |
| 3519 | Подозрение на сифилис | Отр | Отр | Отр | Сомн |
| 5202 | Нет информации | Сомн ⁴ | Сомн ⁴ | Сомн | Сомн |
| 3144 | Нет информации | Пол | Пол | Пол | Отр |
| 4/108 | 1918 г. рождения | Сомн ³ | Сомн ³ | Пол | Отр |
| Ликвор | | | | | |
| 3 | Сифилис в анамнезе | Сомн ³ | Сомн ³ | Сомн | Сомн |
| 4 | Сифилис в анамнезе | Сомн ⁵ | Сомн ⁵ | Сомн | Сомн |
| 13 | Сифилис в анамнезе | Пол | Пол | Сомн | Отр |
| 15 | Подозрение на нейросифилис | Сомн ³ | Сомн ³ | Сомн | Сомн |
| 16 | Обследование | Сомн ³ | Сомн ³ | Сомн | Сомн |
| 17 | Нет информации | Пол | Пол | Пол | Пол |
| 10/3424 | Рецидив 2006 г. | Пол | Пол | Пол | Пол |
| 9/3422 | Сифилис в анамнезе | Пол | Пол | Пол | Пол |
| | | | 100% (14/14) | 93% (13/14) | 57% (8/14) |

Примечание. Пол — положительный; Сомн — сомнительный; Отр — отрицательный.

¹ Результат ИФА расценивался как сомнительный при коэффициенте позитивности (КП) = $1 \pm 0,2$; отрицательный — при КП < 0,8; положительный — при КП > 1,2.

² Данные исследования, проведенные в Городской клинической больнице № 14 имени В.Г. Короленко г. Москвы.

³ Образцы, иммунореактивные только к антигену TrN17.

⁴ Сыворотка, иммунореактивная только к антигену TrN15.

⁵ Ликвор, иммунореактивный только к антигену TrpA.

ку сифилиса методов ИФА [12, 17—19]. Несмотря на значимость прямых методов обнаружения *T. pallidum*, серологические реакции являются в настоящее время основным инструментом диагностики сифилиса. В силу ряда объективных и субъективных причин специфические тесты на сифилис не всегда дают однозначные результаты. В связи с этим достоверность диагноза зависит от количества проведенных исследований, что в свою очередь делает всю диагностическую процедуру трудоемкой и дорогостоящей.

В представленной работе диагностическая значимость тест-системы «Лайн-Блот Сифилис» оценивалась в формате подтверждающего теста. В рамках проведенного исследования тест-система показала высокую (100%) чувствительность и специфичность по отношению к серопозитивным ($n = 237$) и серонегативным ($n = 114$) образцам, наличие или отсутствие в которых антител к *T. pallidum* было подтверждено другими трепонемными тестами.

При исследовании 14 образцов, отнесенных на основании результатов двух тестов (РПГА и РИ-

Фабс) в группу сомнительных анализов, соответствие данных, полученных в тест-системе «Лайн-Блот Сифилис», данным «INNO-LIA Syphilis score» составило 100% (14/14), ИФА — 93% (13/14), РИФабс — 57% (8/14). Три образца сыворотки — № 1/21, № 3144 и ликвор № 13, охарактеризованные методом РИФабс как отрицательные, были однозначно положительными в тест-системе «Лайн-Блот Сифилис», при этом для образцов № 1/21 и № 3144 результаты, полученные методом линейного иммуноблотинга, подтверждались результатами ИФА. Это согласуется с данными литературы [10], указывающими на более высокую чувствительность тест-систем, созданных на основе рекомбинантных антигенов, по сравнению с тест-системами, в которых в качестве антигена используются цельные клетки *T. pallidum* [20]. В целом при анализе сомнительных анализов с помощью тест-системы «Лайн-Блот Сифилис» шесть образцов были охарактеризованы как положительные, один — как отрицательный, семь — как сомнительные. Среди семи сомнительных образцов в пяти антитела выявлялись только к антиге-

ну ТрN17, два образца демонстрировали серореактивность соответственно только по отношению к антигенам ТрpA и ТрN15. С одной стороны, выявление у обследуемых лиц антител исключительно к белку ТрN17 может отражать факт перенесенного ранее сифилиса [21]. С другой стороны, диагностически значимое антителообразование только по отношению к ТрN17 указывает на важность этого антигена для выявления заболевания на самой ранней стадии [22].

Тест-система «Лайн-Блот Сифилис» разрабатывалась в формате диагностикума, подтверждающего результаты таких высокочувствительных и высокопроизводительных тестов, как ИФА и РПГА. Совокупность антигенных структур, используемых в этих тест-системах, в виде нескольких рекомбинантных белков или всего пула поверхностных белков, выделенных из *T. pallidum*, с одной стороны, увеличивает их чувствительность, с другой стороны — негативно отражается на их специфичности. Дизайн диагности-

кума «Лайн-Блот Сифилис» основан на принципах, общих для тест-систем подтверждающего формата, — на одновременном выявлении серологических маркеров инфекции к отдельным антигенам. Тест-система «Лайн-Блот Сифилис» предназначена для выявления и полуколичественной оценки в ликворе, плазме и сыворотке крови человека уровня IgG-антител к четырем антигенам *T. pallidum*: ТрN15, ТрN17, ТрN47 и ТрpA. Для сведения к минимуму возможности субъективной ошибки инкубационные растворы, входящие в тест-систему, имеют индикаторную окраску. Практическое применение тест-системы «Лайн-Блот Сифилис» не требует высокой профессиональной подготовки персонала и дорогостоящего оборудования. Кроме того, несложная и непродолжительная (4 ч.) процедура анализа в формате тест-системы «Лайн-Блот Сифилис» делает ее удобным инструментом для исследования большого количества образцов в течение одного рабочего дня. ■

Литература

- Larsen S.A., Steiner B.M., Rudolph A.H. Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 1—21.
- Wheeler H.L., Agarwal S., Goh B.T. Dark ground microscopy and treponemal serological tests in the diagnosis of early syphilis. *Sex Transm Infect* 2004; 80: 411—414.
- Morse S.A. Advances in diagnostic tests for bacterial STDs. *Salud Publica Mex* 2003; 45 Suppl 5: 698—708.
- Rusnak J.M., Butzin C., MacGlason D. et al. False-positive rapid plasma reagin tests in human immunodeficiency virus infection and relationship to anticardiolipin antibody and serum immunoglobulin levels. *J Infect Dis* 1994; 169: 1356—1359.
- Nandwani R., Evans D.T.P. Are you sure it's syphilis? A review of false positive serology. *Int J STD AIDS* 1995; 6: 241—248.
- Кубанова А.А., Говорун В.М., Китаева Н.В. и др. Достижения и перспективы изучения *Treponema pallidum*. *Вестн. дерматол.*, 2006; 5: 34—37.
- Carlsson B., Hanson H.S., Wasserman J. et al. Evaluation of the fluorescent treponemal antibody-absorption (FTA-ABS) test specificity. *Acta Dermatol Venereol* 1991; 71: 306—311.
- Dettoni G., Grillo R., Mora G. et al. Evaluation of Western immunoblotting technique in the serological diagnosis of human syphilitic infections. *Eur J Epidemiol* 1989; 5: 22—30.
- Byrne R.E., Laska S., Bell M. et al. Evaluation of a *Treponema pallidum* Western immunoblot assay as a confirmatory test for syphilis. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 115—122.
- Ebel A., Vanneste L., Cardinaels M. et al. Validation of the INNO-LIA syphilis kit as a confirmatory assay for *Treponema pallidum* antibodies. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 215—219.
- Norris S.J., and the *Treponema pallidum* Polypeptide Research Group. Polypeptides of *Treponema pallidum*: progress toward understanding their structural, functional, and immunologic roles. *Microbiol Rev* 1993; 57: 750—779.
- Sambri V., Marangoni A., Eyer C. et al. Western Immunoblotting with Five *Treponema pallidum* Recombinant Antigens for Serologic Diagnosis of Syphilis. *Clin Diagnost Lab Immunol* 2001; 8: 534—539.
- Hagedorn H.J., Kraminer-Hagedorn A., De Bosschere K et al. Evaluation of INNO-LIA syphilis assay as a confirmatory test for syphilis. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 973—978.
- Фриго Н.В., Ротанов С.В., Нестеренко В.Г. и др. Результаты изучения диагностической эффективности новой тест-системы линейного иммуноферментного анализа «Inno-Lia™ Syphilis Score». *Клин. лаб. диагн.*, 2006; 3: 36—41.
- Кубанова А.А., Фриго Н.В., Ротанов С.В. и др. Иммуноблоттинг в диагностике ранних форм сифилиса. *Вестн. дерматол.*, 2006; 2: 4—11.
- Фриго Н.В., Ротанов С.В., Дударева Л.А. и др. Опыт использования метода иммуноблоттинга для диагностики сифилиса. *Вестн. дерматол.*, 2008; 4: 57—62.
- Schmidt B.L., Edjlalipour M., Luger A. Comparative evaluation of nine different enzyme-linked immunosorbent assays for determination of antibodies against *Treponema pallidum* in patients with primary syphilis. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1279—82.
- Zrein M., Maure I., Boursier F. et al. Recombinant antigen-based enzyme immunoassay for screening of *Treponema pallidum* antibodies in blood bank routine. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 525—7.
- Young H., Moyes A., Seagar L. et al. Novel recombinant-antigen enzyme immunoassay for serological diagnosis of syphilis. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 913—7.
- Sordillo E.M., Hoehl B., and Belch J. False-negative fluorescent treponemal tests and confirmation of syphilis infection. 1998; *J. Infect. Dis.* 178: 294—295.
- Кубанова А.А., Нестеренко В.Г., Фриго Н.В. и др. Опыт использования метода иммуноблоттинга для диагностики сифилиса. *Вестн. дерматол.*, 2006; 2: 4—11.
- Кубанова А.А., Фриго Н.В., Ротанов С.В., Нестеренко В.Г., Ловенецкий А.Н., Дударева Л.А. Опыт использования метода иммуноблоттинга для диагностики сифилиса. *Вестник дерматологии и венерологии* 2006. (2): 4—11.