

Диагностическая характеристика иммуноферментных тест-систем при серологическом обследовании больных сифилисом

Частное Акционерное Общество
«Научно-производственная компания «Диапроф Мед»

Вступление

Сифилис – инфекционное заболевание, этиологическим агентом которого является *Treponema pallidum*, характеризуются разнообразными клиническими проявлениями с периодичностью течения. Наряду с тем, что в последние годы тревожный всплеск заболевания зафиксировали органы здравоохранения практически всех европейских стран, довольно часто стали диагностировать скрытые, латентные формы сифилиса, а также врожденный сифилис [1]. Изменилось и клиническое течение заболевания с преобладанием поздних его проявлений, в том числе нейро- и висцерального сифилиса [2]. В определенной мере это обусловлено возрастанием числа случаев осложнения сифилиса сопутствующими заболеваниями - хламидиозом, герпесом, папилломавирусной инфекцией, туберкулезом, ВИЧ, гепатитами В и С [3]. Сочетание сифилиса с другими инфекциями в значительной мере затрудняют его диагностику. В связи с этим, проблема разработки новых объективных методов, позволяющих своевременно и быстро диагностировать сифилис, особенно актуальна.

T. pallidum облигатный паразит, который сложно культивировать в условиях *in vitro*, поэтому диагностика сифилиса базируется на основании либо непосредственного обнаружения спирохет в экссудатах, жидкостях и тканях организма, либо на основании непрямых серологических тестов [4]. Серологические тесты для диагностики сифилиса можно разделить на две категории: нетрепонемные (НТ), базирующиеся на выявлении антител к кардиолипину, и трепонемные (ТТ), выявляющие антитела к специфическим антигенам *T. pallidum* [5].

В основе НТ лежит определение антител к кардиолипину - аутоантигену липидной природы, появляющемуся в организме при деструкции клеток. НТ широко доступны, быстры, недороги и крайне необходимы при определении эффективности лечения заболевания или подтверждении реинфекции. К существенным недостаткам таких тестов следует отнести низкую чувствительность на ранних и поздних стадиях заболевания, наличие эффекта прозоны, а также достаточно большое количество ложно-положительных результатов [6]. Все ТТ основаны на выявлении антител к *T. pallidum*, которые детектируются при помощи различных методик, включая гемагглютинацию, ИФА, иммунофлуоресценцию, иммуноблот и иммунохроматографию [7]. К неоспоримым достоинствам ТТ следует отнести высокий показатель чувствительности и специфичности, хотя по данным различных лабораторий в 1,5-3,1% случаев возможно получение ложно-положительных результатов за счет перекрестно реагирующих с трепонемными антигенами антител, образующихся при различных системных или индуцированных лекарствами и наркотиками нарушениях обмена веществ.

Для успешной постановки диагноза необходим диагностикум с высокими показателями чувствительности и специфичности, который способен определять сифилитическую инфекцию в любой её стадии (в том числе и повторное инфицирование) и служить критерием эффективности терапии. К сожалению, на сегодняшний день не существует единого теста, который бы удовлетворял всем перечисленным требованиям, поэтому для диагностики сифилиса используют комбинации различных тестов [8].

В клинической лабораторной практике существует два алгоритма серологического тестирования на сифилис, каждый из которых имеет ряд преимуществ и недостатков. Традиционно, скрининг на сифилис начинается с НТ и в случае позитивного результата в качестве подтверждающих используют ТТ [9]. Такой алгоритм является рентабельным для небольших диагностических лабораторий и госпиталей, а результаты тестирования до-

вольно хорошо коррелируют с клиническими проявлениями заболевания. Однако такая схема диагностики имеет существенные ограничения при использовании в масштабных скрининговых исследованиях из-за недостаточной чувствительности и специфичности тестов, ручной процедуры анализа и субъективного учета результатов.

Поэтому многие клинические лаборатории в различных странах Европы и в США используют альтернативный, так называемый «tevers»-скрининг для диагностики сифилиса. При таком подходе образцы сывороток сначала тестируют при помощи ТТ (ИФА, ХЛА), а затем положительные результаты подтверждают при помощи НТ. Данный алгоритм имеет свои преимущества, в том числе возможность автоматизации процесса и объективного учета результатов, а также способность выявлять раннюю и позднюю/латентную стадии сифилиса [9, 10].

На первом этапе «tevers»-скрининга чаще применяют иммуноферментные тест-системы, при изготовлении которых используют рекомбинантные аналоги наиболее иммуногенных липопротеинов *T. pallidum* - p15, p17, p41, p47. Белок p17 вызывает наиболее активную продукцию специфических антител, особенно на стадии вторичного сифилиса [11]. Кроме того, антитела к этому белку обнаруживают при скрытых формах сифилиса. Антитела к белкам p15 и p47 позволяют диагностировать первичный и врожденный сифилис [12, 13]. Белок p41 значительно повышает чувствительность диагностических тест-систем, антитела к нему обнаруживают на стадии первичного сифилиса при общем довольно низком уровне антител к белкам возбудителя [13]. Кроме того, титр антител к этому белку снижается при адекватной терапии, что может быть использовано для мониторинга эффективности лечения.

Существенным преимуществом иммуноферментных тест-систем является высокая чувствительность и специфичность, возможность проведения скрининговых исследований, получение результата в течение короткого времени и автоматический его учет, отсутствие необходимости сложного оборудования и предобработки тестируемого материала. Использование данных тестов в рутинной лабораторной практике является одним из основных направлений при проведении мероприятий, предупреждающих рост заболеваемости и распространении сифилиса, особенно при переливании крови.

Цель настоящей работы состояла в исследовании качественных характеристик разработанных в ЧАО «НПК «Диапроф-Мед» различных конструкций иммуноферментных тест-систем, предназначенных для серодиагностики сифилиса.

Материалы и методы

Исследуемый материал.

В исследованиях использованы сыворотка или плазма крови пациентов районных кожно-вендиспансеров г. Киева с подозрением на сифилис или подтвержденным диагнозом сифилиса на разных стадиях заболевания. Контингент обследованных пациентов включал:

- 533 человек без окончательного диагноза на сифилис;
- 95 больных первичным сифилисом;
- 28 больных первичным сифилисом, серонегативным в стандартных нетрепонемных тестах;
- 225 больных рецидивирующим сифилисом;
- 137 больных вторичным сифилисом;
- 127 больных вторичным скрытым сифилисом;
- 45 пациентов, прошедших курс профилактической терапии, поскольку контактировали с больным сифилисом;
- 125 больных сифилисом после курса терапии, проведенной в стационаре;
- 17 детей с подтвержденным диагнозом врожденный сифилис;
- 1576 здоровых доноров.

Панель сывороток/плазмы крови «Mixed Titer Performance Panel PSS201» производства Boston Biomedica Inc. (USA), состоящей из 25 образцов, из которых 2 отрицательных, 23 содержат IgG и 9 – IgM к *T. pallidum*.

Тесты.

Нетрепонемные тесты: реакция Вассермана (РВ), реакция микрорепреципитации (МРП) и ее аналог – ускоренный плазмареагиновый тест (RPR, rapid plasma reagin test).

Трепонемные тесты: иммуноферментный анализ (ИФА), для проведения которого использовали диагностические тест-системы «DIA-IgG-IgM-Треп», «DIA-SYPH», «DIA-IgM-SYPH» производства ЧАО НПК «Диапроф Мед» и «Трепаностика» (Organon Teknika, Netherlands).

Тест-система «DIA-IgG-IgM-Треп» сконструирована в формате твердофазного двухэтапного непрямого ИФА. В состав иммуносорбента входят рекомбинантные белки – аналоги антигенов *T. pallidum* (p15, p17, p41 и p47). Иммунные комплексы выявляются пероксидазным конъюгатом на основе моноклональных антител к IgG и IgM человека.

Тест-система «DIA-SYPH» изготовлена в одноэтапном «сендвич» варианте с использованием рекомбинантных антигенов p17 и p47 в составе иммуносорбента и пероксидазного конъюгата. Выявляет суммарные антитела к *T. pallidum*.

Тест-система «DIA-IgM-SYPH» предназначена для определения IgM к *T. pallidum*. Сконструирована в формате IgM - «захвата». В составе иммуносорбента использованы мышинные моноклональные антитела к IgM человека. Специфические антитела выявляются рекомбинантными антигенами p17, p47 и p41, конъюгированными с пероксидазой хрена.

Тест-система «Трепаностика» изготовлена в формате конкурентного ИФА и предназначена для определения суммарных специфических антител. В состав иммуносорбента входят лизатные оболочечные белки *T. pallidum*. Конъюгат - антитрепонемная сыворотка человека, меченная пероксидазой хрена. В одноэтапной реакции специфические антитела исследуемой сыворотки конкурируют с антителами конъюгата за сайты связывания со специфическими антигенами в составе иммуносорбента.

Результаты и обсуждение

Несмотря на успешное внедрение новых диагностических подходов, определение специфических антител к *T. pallidum* до сих пор остается основой лабораторной диагностики сифилиса, поскольку позволяет выявлять возбудитель на разных стадиях заболевания. Определение специфических IgM входит в обязательный алгоритм обследования пациентов при постановке диагноза первичного и раннего врожденного сифилиса, активной рецидивирующей инфекции, а также при определении эффективности проводимой терапии. Однако, при диагностике специфических IgM существует большая вероятность получения ложноположительных результатов. Одной из причин их появления может быть наличие при системных заболеваниях ревматоидного фактора и IgM, перекрестно реагирующих с антигенами *T. pallidum*, а также появление иммуноглобулинов класса М к IgG матери у новорожденных [14]. Нами разработана тест-система «DIA-IgM-SYPH» для определения IgM к *T. pallidum*, конструкция которой в варианте IgM - «захвата», обеспечивает ей высокую специфичность, поскольку IgM к *T. pallidum* выявляются мечеными рекомбинантными белками – аналогами антигенов возбудителя сифилиса.

Снижение IgM-ответа в течение 6-12 мес. после инфицирования бледной трепонемой в ходе вторичного периода сифилиса и их отсутствие при латентной форме заболевания сопровождаются персистенцией в организме специфических IgG. Вместе с тем, недостаточная чувствительность тест-систем может быть причиной ложноотрицательных результатов при серодиагностике данных антител, поскольку существуют индивидуальные особенности экспрессии данных иммуноглобулинов у пациентов с различным иммунным статусом и на различных стадиях заболевания. Разработанные нами тест-системы «DIA-IgG-IgM-Треп» и «DIA-SYPH» позволяют выявлять суммарные антитела к *T.*

pallidum. В тест-системе «DIA-IgG-IgM-Треп» специфические антитела, связанные с антигенами иммуносорбента, выявляются моноклональными антителами к IgM и IgG человека в составе конъюгата. Тест-система «DIA-SYPH» сконструирована в «сендвич» - варианте и суммарные специфические антитела связываются с рекомбинантными белками иммуносорбента и конъюгата.

Результаты исследования качественных характеристик (чувствительности и специфичности) разработанных диагностических иммуноферментных тест-систем на коммерческой панели сывороток/плазмы крови PSS201 (BBI) представлены в табл.1. Кроме результатов ИФА в таблице приведены (из паспортных данных к панели) результаты тестирования этих образцов в коммерческих тестах – RPR и реакции иммунофлуоресценции (РИФ) – FTA-ABS. Тест-системы «DIA-IgG-IgM-Треп» и «DIA-SYPH» выявляли специфические антитела во всех положительных образцах панели. При этом тест-система «DIA-SYPH» диагностировала их с более высоким соотношением ОП/cut off ($p < 0,05$). В двух отрицательных сыворотках панели данные тест-системы специфические антитела не обнаружили. Тест-система «DIA-IgM-SYPH» выявила специфические IgM в 8 образцах панели, положительных по результатам тестирования в тестах RPR и FTA-ABS.

Табл.1

**Результаты исследования панели сывороток/плазмы крови PSS201 (BBI)
в различных диагностических тест-системах**

Номер образца панели	Результат анализа в тест-системах:					
	West.-Dick. RPR (титр)	Wampole RPR (титр)	Zeus FTA-ABS (результат)	DIA-IgG- IgM-Треп (ОП/cut off)*	DIA-SYPH (ОП/cut off)	DIA-IgM- SYPH (ОП/cut off)
PSS201-01	8	32	положит.	9,2	17,8	3,4
PSS201-02	2	8	положит.	10,9	19,4	1,4
PSS201-03	отр.	отр.	положит.	11,1	19,9	0,2
PSS201-04	отр.	отр.	положит.	10,9	19,8	1,7
PSS201-05	отр.	отр.	отр.	0,5	0,3	0,1
PSS201-06	16	64	положит.	9,6	19,9	5,4
PSS201-07	1	2	положит.	10,5	20,0	0,6
PSS201-08	4	8	положит.	11,6	21,3	0,2
PSS201-09	1	4	положит.	10,2	23,0	0,4
PSS201-10	4	16	положит.	12,2	20,9	0,5
PSS201-11	1	4	положит.	12,1	22,1	0,4
PSS201-12	отр.	отр.	положит.	8,9	21,4	0,3
PSS201-13	4	8	положит.	10,3	20,7	0,4
PSS201-14	отр.	отр.	положит.	10,4	20,9	0,2
PSS201-15	отр.	отр.	отр.	0,4	0,3	0,1
PSS201-16	8	32	положит.	12,7	22,0	1,7
PSS201-17	16	64	положит.	13,3	22,0	3,6
PSS201-18	8	32	положит.	12,6	21,6	0,3
PSS201-19	4	2	положит.	11,3	20,3	0,2
PSS201-20	1	2	положит.	10,3	21,2	0,2
PSS201-21	8	32	положит.	8,6	17,6	5,6
PSS201-22	отр.	отр.	положит.	9,6	20,3	0,6
PSS201-23	1	2	положит.	11,7	20,6	0,3
PSS201-24	1	4	положит.	11,5	21,8	0,5
PSS201-25	8	128	положит.	7,3	14,3	6,8

* при соотношении ОП/cut off больше 1,0 – результат положительный, меньше 1,0 – результат отрицательный

Способность тест-систем разных конструкций диагностировать антитела к *T. pallidum* исследована при анализе предварительно проверенных в РВ сывороток крови от больных сифилисом на разных клинических стадиях – первичный, вторичный и скрытый сифилис (табл.2). Тест-система «DIA-SYPH» определяла сифилис на всех стадиях инфекционного процесса. Все 215 исследованных сывороток определены в ней положительными. При исследовании в тест-системе «DIA-IgG-IgM-Trep» 28 сывороток от больных первичным сифилисом, отрицательных в РВ, результат анализа 2-х образцов получен в пределах «серой зоны» (на 10% меньше значения cut off). Специфические IgM, которые выявлены в сыворотках с помощью тест-системы «DIA-IgM-SYPH», чаще всего диагностированы у больных первичным и вторичным сифилисом, но практически отсутствовали у больных с латентным протеканием заболевания, что соответствует особенностям сероконверсии при сифилисе и согласуется с данными литературы [15]. При исследовании в данной тест-системе 17 сывороток крови новорожденных с подтвержденным диагнозом врожденного сифилиса специфические IgM выявлены во всех образцах.

Табл.2

Результаты исследования сыворотки крови больных сифилисом на разных стадиях заболевания в иммуноферментных тест-системах различных конструкций.

Больные с диагнозом:	Количество исследованных образцов	Тест-системы		
		DIA-IgG-IgM-Trep	DIA-SYPH	DIA-IgM-SYPH
		количество положительных результатов		
Первичный серонегативный сифилис	28	26	28	25
Первичный серопозитивный сифилис	27	27	27	25
Вторичный сифилис	137	137	137	73
Скрытый сифилис	23	23	23	2

В табл 3 представлены результаты сравнительного исследования сывороток крови 1100 пациентов кожвендиспансеров в нетрепонемных тестах (РВ и МРП) и тест-системе «DIA-IgG-IgM-Trep». При анализе 533 сывороток пациентов без окончательного диагноза положительными определено в РВ 186 образцов (34%), в МРП - 310 (39,4%), в ИФА – 234 (43,9%). При тестировании сывороток крови 68 больных с первичным сифилисом РВ выявила специфические антитела лишь в 61 образце (89,7%), МРП и ИФА определили специфические антитела у всех пациентов. При исследовании сывороток крови больных с рецидивирующим сифилисом (225 человек) в РВ положительными были 216 образцов (96%), в МРП и ИФА специфические антитела выявлены во всех сыворотках. Параметр чувствительности тест-системы «DIA-IgG-IgM-Trep» был наибольший при исследовании 104 больных с вторичным скрытым сифилисом, который был обнаружен у 99 пациентов (95,2%), по сравнению с РВ, которая диагностировала сифилис у 95 больных (91,3%), и МРП, определивших заболевание у 97 пациентов (93,3%).

**Сравнительные результаты серодиагностики на сифилис
с использованием различных тестов**

Контингент больных	Количество исследованных образцов	Тесты		
		РВ	МРП	«DIA-IgG-IgM-Треп» ИФА
		количество положительных результатов (%)		
Пациенты без окончательного диагноза	533	186 (34%)	310 (39,4%)	234 (43,9%)
Больные с первичным сифилисом	68	61 (89,7%)	68 (100%)	68 (100%)
Больные с рецидивирующим сифилисом	225	216 (96%)	225 (100%)	225 (100%)
Больные с вторичным скрытым сифилисом	104	95 (91,3%)	97 (93,3%)	99 (95,2%)
Пациенты, контактирующие с больным сифилисом, после курса профилактической терапии	45	8 (17,8%)	12 (26,7%)	10 (22,2%)
Больные сифилисом после курса терапии в стационаре	125	39 (31,2%)	81 (64,8%)	109 (87,2%)
Всего больных	1100	605 (55%)	693 (63%)	745 (67,7%)

Среди пациентов, которые контактировали с больным сифилисом и прошли курс профилактической терапии, 8 человек (17,8%) были положительными в РВ, 12 (26,7%) – в МРП и 10 (22,2%) – в ИФА. При повторной проверке в МРП 2-х сывороток, результат тестирования которых не совпадал с данными ИФА, они были определены отрицательными.

В наибольшей степени отличались результаты исследования различными методами сывороток больных сифилисом, прошедших курс лечения в стационаре. Из 125 больных положительными были по результатам исследования в РВ 39 человек (31,2%), в МРП – 81 (64,8%), в тест-системе «DIA-IgG-IgM-Треп» -109 пациентов (87,2%). Все сыворотки крови, при тестировании которых в разных тестах результаты отличались, были повторно проверены в РВ, МРП, ИФА – в тест-системах «DIA-IgG-IgM-Треп» и «Трепаностика» (табл.4). Согласно полученным данным расхождение результатов тестирования сывороток крови в двух иммуноферментных тест-системах отмечено только при исследовании образцов от больных с вторичным скрытым сифилисом. Из 9 сывороток крови тест-система «DIA-IgG-IgM-Треп» выявила специфические антитела в 5 образцах, а тест-система «Трепаностика» - только в 4 сыворотках. Остальные результаты анализа сывороток, полученные в тест-системе «DIA-Треп», подтвердились коммерческой тест-системой.

Результаты повторного исследования сывороток крови, при первичном тестировании которых получены несовпадающие данные в разных тестах.

Контингент больных	Количество исследованных образцов	Тесты			
		РВ	МРП	ИФА	
				«DIA-IgG-IgM-Trep»	«Trep-panostika»
количество положительных результатов					
Больные с первичным сифилисом	7	0	7	7	7
Больные с рецидивирующим сифилисом	9	0	9	9	9
Больные с вторичным скрытым сифилисом	9	0	2	5	4
Пациенты, контактирующие с больным сифилисом, после курса профилактической терапии	4	0	4	2	2
Больные сифилисом после курса терапии в стационаре	96	0	54	96	96

По данным многих авторов [15, 16, 17] у переболевших сифилисом возбудитель инфекции часто сохраняется в лимфатических узлах в форме цист, наличие которых в организме приводит к продукции специфических антител, определяемых серологическими реакциями. При переходе цист в L-форму с менее выраженной антигенной структурой синтез специфических антител резко снижается либо совсем прекращается [16]. При исследовании сывороток крови таких больных в РВ и МРП результат анализа, как правило, отрицательный. При исследовании подобных сывороток в иммуноферментных тест-системах результат может быть положительным, поскольку их чувствительность и специфичность выше, что обусловлено участием в реакции рекомбинантных белков – более специфичных и иммуногенных аналогов антигенов *T. pallidum*. Полученные нами данные подтвердили высокую способность иммуноферментных тест-систем выявлять скрытую и подлеченную форму сифилиса по сравнению с РВ и МРП.

При тестировании 1576 сывороток крови здоровых доноров в тест-системах «DIA-IgG-IgM-Trep», «DIA-SYPH» и «DIA-IgM-SYPH» ложноположительные результаты отсутствовали.

Таким образом, исследование качественных характеристик тест-систем «DIA-IgG-IgM-Trep», «DIA-SYPH» и «DIA-IgM-SYPH» показало их высокую чувствительность и специфичность, что позволяет использовать их в широкой лабораторной практике вместо более трудоемких тестов РВ и МРП при проведении как скрининговых исследований донорской крови, так и при контроле эффективности проводимой терапии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Быстрицкая Т.Ф., Самсонова Н.С., Колбнева Л.В., Подарь И.И., Гребенюк В.Н. Актуальные проблемы практической венерологии//Ж.Лечащий врач. – 1999.- №5.- Изд. «Открытые системы» (www.osp.ru). – 8 с.
2. Эглстоун С.И., Тернер А.Дж.Л. Серологическая диагностика сифилиса. //ИППП.- 2001.- № 3. –с.:4-9.
3. Борисенко К.К., Лосева О.К., Зудин Б.И. Итоги и перспективы практической сифидологии//ЗППП – 1995. - №4.- с.26-29.
4. Mattei PL, Beachkofsky TM, Gilson RT, Wisco OJ. Syphilis: a reemerging infection. Am Fam Physician. 2012 Sep 1;86(5):433-40.
5. Larsen SA, Steiner BM, Rudolph AH. Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis. Clin Microbiol Rev. 1995 Jan;8(1):1-21.
6. Seña AC, White BL, Sparling PF. Novel Treponema pallidum serologic tests: a paradigm shift in syphilis screening for the 21st century. Clin Infect Dis. 2010 Sep 15;51(6):700-8
7. Use of Treponemal Immunoassays for Screening and Diagnosis of Syphilis. Guidance for Medical Providers and Laboratories in California 2013, 15 p.
8. Binnicker MJ, Jespersen DJ, Rollins LO. Direct comparison of the traditional and reverse syphilis screening algorithms in a population with a low prevalence of syphilis. J Clin Microbiol. 2012 Jan;50(1):148-50.
9. Binnicker MJ. Which algorithm should be used to screen for syphilis? Curr Opin Infect Dis. 2012 Feb;25(1):79-85.
10. Leung WL, Kam KM/ Use of enzyme immunoassay as treponemal screening test in syphilis diagnosis. Hong Kong J. Dermatol. Venereol. (2006), 14, 189-195
11. Дмитриев Г.А., Брагина Е.Е. Современные методы лабораторной диагностики сифилиса. Часть1 //Вестник дерматологии и венерологии.- 1996. - №2. – с.29-33.
12. Дмитриев Г.А., Брагина Е.Е. Современные методы лабораторной диагностики сифилиса. Часть2 //Вестник дерматологии и венерологии.- 1996. - №2. – с.33-38.
13. Blanco D.R., Miller J.N., Lovett M.A. Surface antigens of the syphilis spirochete and their potential as virulence determinants// Emerging Inf.Dis. – 1997. – V3. N1.-p.1-12
14. Сидорова Е.В., Ляхов В.Ф. Значение определения противотрепонемных IgM-антител в серодиагностике сифилиса.//ЗППП. – 1995. -№4.- с11-14.
15. Милич А.В. Эволюция сифилиса (изд.2)//М.: «Медицина».-1987.-160с.
16. Овчинников Н.М., Беднова В.Н., Делекторский В.В. Лабораторная диагностика заболеваний, передающихся половым путем.//М.: «Медицина». – 1987. -301с.
17. Тацкая Л.С. Серодиагностика сифилиса. Вчера, сегодня, завтра.//Дерматол.венерол.-1997. - №2. – с32-36.