

# Сравнительная оценка качественных характеристик тест-систем ИФА для определения антител к *Treponema pallidum*

Екатерина Дмитриевна Филиппова

и. о. заведующей серологической лабораторией, врач клинической лабораторной диагностики СПб ГБУЗ «КВД № 11»\*

Сифилис – социально значимая и важная проблема современной дерматовенерологии. Конец XX века в России ознаменовался бурным ростом заболеваемости, оказавшим существенное влияние на репродуктивное здоровье населения страны. По данным ВОЗ, в течение года в мире регистрируется около 374 млн новых случаев, наиболее распространенных ИППП, из них примерно 7,1 млн приходится на долю сифилиса. Несмотря на давнюю известность и достаточную изученность, проблема качественной и своевременной диагностики различных форм сифилиса остается актуальной по сей день [1].

Сифилис – инфекционное заболевание, передающееся преимущественно половым путем, характеризующееся поражением кожи, слизистых оболочек, нервной системы, внутрен-

них органов и опорно-двигательного аппарата и отличающееся стадийным, рецидивирующим, прогрессирующим течением. Сифилис – строгий антропоноз. Антитела к возбудителю сифилиса *Treponema pallidum* не защищают от повторного заражения, а лишь свидетельствуют о наличии текущей или перенесенной инфекции [2].

Возбудитель сифилиса относится к порядку *Spirochaetales*, семейству *Spirochaetaeaceae*, роду *Treponema*, виду *Treponema pallidum*, подвиду *pallidum* (син. *Spirochaeta pallidum*). Отличительными особенностями *Treponema pallidum*, или бледной трепонемы, является слабая способность воспринимать окраску из-за большого количества гидрофобных компонентов в цитоплазме и невозможность культивирования на искусственных питательных средах. Вне организма неустойчива,

\* На момент проведения исследования.

гибнет при нагревании, высушивании, под влиянием большинства антисептиков, в кислой и щелочной среде. Устойчива при низких температурах, во влажной среде.

В соответствии с распоряжением комитета по здравоохранению администрации Санкт-Петербурга и центра госсанэпиднадзора в Санкт-Петербурге от 31.12.2002 № 500-р/37 «О мерах по предупреждению распространения инфекций, передаваемых половым путем» руководитель медицинской организации обязан обеспечить обследование взрослого населения на сифилис [3].

### Лабораторная диагностика сифилиса

Лабораторная диагностика сифилиса осуществляется прямыми (молекулярно-генетические методы, темнопольная микроскопия самого возбудителя) и непрямыми методами (выявление антител к возбудителю – серологические методы исследования). В свою очередь, серологические тесты подразделяются на две основные группы: нетрепонемные и трепонемные. Нетрепонемные тесты (например, реакция микропреципитации (РМП) с кардиолипиновым антигеном) используются в качестве отборочных для скрининга большого количества людей и эффективности терапии. К недостаткам метода можно отнести субъективность оценки результатов, невозможность автоматизации и низкую воспроизводимость, достаточный процент ложноположительных резуль-

татов. Специфичность РМП оценивается в 98%, а чувствительность зависит от стадии заболевания и варьирует в пределах 81–94% при ранних формах и 30% при поздних [4].

Отличительной особенностью трепонемных тестов является применение в них антигена трепонемного происхождения. Они используются для подтверждения нетрепонемных тестов, при клиническом, эпидемиологическом и анамнестическом подозрении на сифилис, для диагностики скрытых и поздних форм заболевания, для установления ретроспективного диагноза пациента. К числу наиболее известных трепонемных тестов относятся:

1) определение антител к бледной трепонеме (*Treponema pallidum*) в реакции пассивной гемагглютинации (РПГА) – высокочувствительный и специфичный тест. Чувствительность метода при первичном сифилисе – 76%, при вторичном – 100%, при скрытом – 94–97%, специфичность – 98–100%;

2) определение антител к бледной трепонеме (*Treponema pallidum*) иммуноферментным методом (ИФА) – высокочувствительный и специфичный тест. Чувствительность при первичном и вторичном сифилисе – 98–100%, специфичность – 96–100%. Дает возможность дифференцированного и суммарного определения IgM и IgG антител к возбудителю сифилиса;

3) определение антител к *Treponema pallidum* методом иммуноблоттинга является модификацией ИФА. Чувствительность и специфичность – 98–100%.

Может применяться для подтверждения диагноза, в особенности при сомнительных или противоречивых результатах других трепонемных тестов. Дает возможность дифференцированного и суммарного определения IgM и IgG антител к возбудителю сифилиса;

4) определение антител к *Treponema pallidum* реакцией иммунофлюоресценции (РИФ), в том числе в модификациях РИФабс, РИФц и РИФ200) – тест, достаточно чувствительный на всех стадиях сифилиса. Чувствительность при первичном сифилисе – 70–100%, при вторичном и позднем – 96–100%, специфичность – 94–100%. РИФ применяется для дифференциации скрытых форм сифилиса и ложноположительных результатов исследований на сифилис;

5) реакция иммобилизации (бледных) трепонем (РИБТ, РИТ) – классический тест для выявления специфических трепонемных антител; чувствительность (суммарно по стадиям сифилиса) составляет 87,7%; специфичность – 100%. Трудоемкий и сложный для постановки тест, требующий значительных средств для проведения тестирования. Сфера применения РИБТ сужается, однако она сохраняет свои позиции как «реакция-арбитр» при дифференциальной диагностике скрытых форм сифилиса с ложноположительными результатами серологических реакций [5];

6) метод иммунохемилюминесценции, обладает высокой чувствительностью и специфичностью (98–100%), дает возможность качественного и ко-

личественного определения уровня антител к возбудителю сифилиса, может быть использован для подтверждения сифилитической инфекции и скрининга, однако не может быть использован для контроля эффективности терапии, может давать ложноположительный результат [6];

7) метод иммунохроматографии, имеет чувствительность 99–100% и специфичность 97–99,5%. Простая технологическая процедура выполнения и интерпретации результата, отсутствие необходимости сложного оборудования позволяют использовать этот метод в качестве дополнительного теста. РИФ, ИФА, иммуноблоттинг становятся положительными приблизительно с 3-й недели от момента заражения и ранее, РПГА – с 4-й недели, РИБТ – с 7–8-й.

Один из самых широко применяемых тестов – иммуноферментный анализ, высокоспецифичный и чувствительный тест, имеет ряд преимуществ перед другими трепонемными тестами: возможность автоматизации, меньшая трудоемкость, отсутствие субъективной оценки результатов. В комплексе с нетрепонемным тестом является достаточно информативным и важным для врачей-дерматовенерологов и пациентов.

Лабораторная диагностика ИППП является основой вторичной профилактики, направленной на установление этиологического диагноза и назначения адекватного лечения. Многолетний анализ деятельности лабораторной службы дерматовенерологической сети

города показывает явное преимущество централизованной диагностики ИППП на базах районных кожно-венерологических диспансеров [7].

В серологических лабораториях проводится комплексное обследование пациентов на сифилис с применением нетрепонемного (РМП) и трепонемного (ИФА) тестов. В случае сомнительного или положительного результата какого-либо из них параллельно применяется РПГА. По назначению врача могут быть также выполнены иные трепонемные тесты (РИФ, иммунный блоттинг и другие). О всех случаях положительных серологических реакций на сифилис обязательно передается телефонограмма в учреждение здравоохранения, направившее биоматериал на исследование, и в территориальное кожно-венерологическое учреждение по месту расположения направившей организации [3].

### **Диагностические характеристики различных тест-систем**

**Цель исследования:** сравнить диагностические характеристики тест-систем разных производителей для серологической диагностики сифилиса в поставках с сыворотками реальных пациентов.

**Материалы и методы:** исследование проводилось на базе централизованной межрайонной серологической лаборатории кожно-венерологического диспансера Санкт-Петербурга. По результатам тестирования сыво-

роток крови скрининговым набором на суммарные антитела *Treponema pallidum* были отобраны 996 отрицательных и 400 положительных сывороток пациентов стационарных и амбулаторно-поликлинических учреждений, кожно-венерологических диспансеров. Всем им был выполнен комплекс стандартных серологических реакций, включающий в себя нетрепонемный тест – реакция микропреципитации с кардиолипидным антигеном и трепонемный тест – ИФА суммарные антитела. Для всех сывороток, определенных методом ИФА как положительные, ставился дополнительный подтверждающий тест – РПГА (за исключением тех, у кого был заранее известен диагноз). Затем все сыворотки были исследованы с помощью двух тест-систем «СифилисИФА-суммарные антитела» (ООО «Компания Алкор Био») и «Альтернативная тест-система № 1» для определения суммарных антител. В случае несовпадения результатов ИФА тест-систем дополнительно было проведено исследование с помощью «Альтернативная тест-система № 2» для определения суммарных антител.

Из этой же выборки были протестированы 537 отрицательных и 368 положительных образцов в наборах «СифилисИФА-IgG» производства ООО «Компания Алкор Био» и в «Альтернативная тест-система № 1» для определения IgG. При спорном результате образцы были дополнительно протестированы в «Альтернативная тест-система № 2» для определения

IgG. Для каждого образца вычисляли коэффициент позитивности (КП), рассчитанный по формулам, приведенным в инструкциях по применению наборов. Для постановки использовалась сыворотка однократного замораживания. Осуществлялась ручная постановка анализов, результаты считывались с помощью автоматического ИФА-анализатора Alisei Q. S.

## Результаты

Сравнение тест-систем для определения суммарных антител к *Treponema pallidum*. В наборах для определения суммарных антител использован «сэндвич» – вариант твердофазного ИФА. Для реализации этого варианта использованы рекомбинантные антигены *Treponema pallidum*, которые иммобилизованы на твердой фазе, а также конъюгированы с пероксидазой хрена. В лунках, при добавлении исследуемого образца и конъюгата рекомбинант-

ных антигенов с пероксидазой хрена, во время инкубации одновременно происходит иммобилизация иммуноглобулинов классов А, G и М к *T. pallidum*, содержащихся в исследуемом образце, на твердую фазу и связывание образовавшегося комплекса с конъюгатом. Несвязавшиеся компоненты удаляются промывкой.

Для определения диагностической специфичности было протестировано 996 образцов, и среди них получены ложноположительные результаты для сравниваемых тест-систем, данные представлены в таблице 1.

Диагностическая специфичность набора «СифилисИФА-суммарные антитела» производства ООО «Компания Алкор Био» составила 99,7%, диагностическая специфичность «Альтернативная тест-система № 1» для определения суммарных антител – 99,8%.

Ложноположительные результаты могут быть обусловлены особенностями

Таблица 1

**Результаты сравнительного тестирования противоречивых образцов (выборка отрицательных)\***

№ образца	«СифилисИФА-суммарные антитела» (Алкор Био)		Альтернативная тест-система № 1 для определения суммарных антител		Альтернативная тест-система № 2 для определения суммарных антител		Микрореакция
	КП	Статус	КП	Статус	КП	Статус	
154	0,48	-	1,82	+	0,06	-	Отриц.
155	0,41	-	1,78	+	0,10	-	Отриц.
659	1,09	+	0,08	-	0,05	-	Отриц.
740	1,27	+	0,06	-	0,04	-	Отриц.
837	1,00	+	0,14	-			Отриц.

Примечание: \* Строка не заполнена, если образец не тестировали в данной тест-системе.

## Оснащение современной лаборатории

ми организма. Они могут наблюдаться при беременности, аутоиммунных заболеваниях, после вакцинации, недавно перенесенного инфаркта миокарда, при многих инфекционных заболеваниях. В связи с разнообразием используемого специфического сырья тесты разных производителей могут давать различающиеся результаты для одних и тех же проб.

Для определения диагностической чувствительности было протести-

ровано 400 образцов. Несовпадения по диагнозам в четырех тест-системах наблюдаем для 12 проб, данные представлены в таблице 2. Для 6 образцов (№ 213, 231, 232, 246, 329, 332) получен отрицательный результат в трех тест-системах, предположительно данные образцы ложноположительные в скрининговой тест-системе. Отрицательный результат получен для 6 образцов (№ 161, 172, 215, 327, 336, 396) в двух тест-системах, и поскольку точный ди-

Таблица 2

**Результаты сравнительного тестирования противоречивых образцов  
(выборка положительных)**

№ образца	Скрининговая тест-система		«СифилисИФА-суммарные антитела» (Алкор Био)		Альтернативная тест-система № 1 для определения суммарных антител		Альтернативная тест-система № 2 для определения суммарных антител		Микрореакция/РПГА
	КП	статус	КП	статус	КП	статус	КП	статус	
161	1,58	+	1,28	+	0,43	-	0,24	-	МР отриц., РПГА отриц.
172	1,73	+	0,62	-	6,24	+	0,00	-	МР отриц.
213	1,35	+	0,61	-	0,41	-	0,00	-	МР отриц.
215	1,24	+	0,68	-	1,34	+	0,06	-	МР отриц.
231	1,18	+	0,3	-	0,43	-	0,11	-	МР отриц., РПГА 2+
232	1,49	+	0,29	-	0,25	-	0,19	-	МР отриц., РПГА 2+
246	5,31	+	0,42	-	0,25	-	0,04	-	МР отриц., РПГА отриц.
327	6,28	+	0,66	-	1,5	+	0,39	-	МР отриц., РПГА отриц.
329	4,74	+	0,4	-	0,62	-	0,00	-	МР отриц., РПГА отриц.
332	1,14	+	0,9	-	0,22	-	0,00	-	МР отриц., РПГА отриц.
336	4,21	+	1,17	+	0,84	-	0,00	-	МР отриц., РПГА отриц.
396	2,85	+	0,4	-	0,5	-	3,04	+	МР отриц., РПГА отриц.

агноз неизвестен, то данные образцы тоже были исключены из расчета диагностической чувствительности.

Таким образом, по выборке из 388 образцов диагностическая чувствительность набора «СифилисИФА-суммарные антитела» производства ООО «Компания Алкор Био» и «Альтернативная тест-система № 1» для определения суммарных антител составила 100%.

### **Сравнение тест-систем для определения иммуноглобулинов класса G к *Treponema pallidum***

В наборах для определения иммуноглобулинов класса G использован вариант непрямого твердофазного ИФА. Если в образце присутствуют IgG к *Treponema pallidum*, то во время первой инкубации они связываются с рекомбинантными антигенами *Treponema pallidum*, иммобилизованными на твердой фазе. Во время второй инкубации антитела к IgG человека, меченные пероксидазой хрена, взаимодействуют с образовавшимся на первой стадии комплексом антиген-антитело.

Для определения диагностической специфичности было протестировано 537 образцов с отрицательным статусом в трех наборах для определения суммарных антител к *Treponema pallidum*. В каждой тест-системе для определения иммуноглобулинов класса G к *Treponema pallidum* наблюдали ложноположительные образцы. В тест-системе производства ООО «Компания Алкор Био» получено 12 ложноположительных и 4 образца в «серой зоне».

В «Альтернативной тест-системе № 1» для определения IgG получено 17 ложноположительных образцов, но стоит отметить, что в данном наборе отсутствует «серая зона», что увеличивает количество ложноположительных образцов.

Диагностическая специфичность набора «СифилисИФА-IgG» производства ООО «Компания Алкор Био» составила 97,7%, диагностическая специфичность «Альтернативная тест-система № 1» для определения IgG – 96,8%.

Следует обратить внимание, что специфичность тестов, основанных на непрямом методе ИФА (определение конкретного класса иммуноглобулинов с помощью антивидовых антител) ниже, чем специфичность наборов типа «сэндвич», основанного на применении одинаковых антигенов. Это вызвано использованием в конъюгате антивидовых антител, которые могут взаимодействовать с различными антителами, неспецифически связавшимися с твердой фазой во время инкубации.

Для определения диагностической чувствительности было протестировано 368 образцов с положительным статусом в наборах для определения суммарных антител к *Treponema pallidum*. Несовпадения по диагнозам получено для 87 образцов. Для расчета диагностической чувствительности из выборки положительных проб исключили 15 штук, так как в данных образцах отсутствуют IgG к *Treponema pallidum* по результатам тестирования в двух или более тест-системах, данные представлены в таблице 3.

## Оснащение современной лаборатории

Таблица 3

Результаты тестирования образцов, не содержащих IgG к *Treponema pallidum*\*

№ образца	Скрининговая тест-система		«Сифилис ИФА-суммарные антитела» (Алкор Био)		Альтернативная тест-система № 1 для определения суммарных антител		Альтернативная тест-система № 2 для определения суммарных антител		«СифилисИФА-IgG» (Алкор Био)		Альтернативная тест-система № 1 для определения IgG		Альтернативная тест-система № 2 для определения IgG		Микрореакция/РПГА
	КП	статус	КП	статус	КП	статус	КП	статус	КП	статус	КП	статус	КП	статус	
111	1,48	+	10,91	+	1,49	+			0,7	-	0,00	-			МР отриц.
161	1,58	+	1,28	+	0,43	-	0,24	-	1,2	+	0,01	-	0,1	-	МР отриц. РПГА отриц.
172	1,73	+	0,62	-	6,24	+	0,00	-	0,1	-	0,15	-			МР отриц.
213	1,35	+	0,61	-	0,41	-	0,00	-	0,2	-	0,04	-			МР отриц.
215	1,24	+	0,68	-	1,34	+	0,06	-	0,5	-	0,36	-			МР отриц.
216	1,49	+	15,54	+	1,75	+			1,2	+	0,21	-	0,8	-	МР отриц.
231	1,18	+	0,3	-	0,43	-	0,11	-	0,2	-	0,88	-			МР отриц. РПГА 2+
232	1,49	+	0,29	-	0,25	-	0,19	-	0,3	-	0,33	-			МР отриц. РПГА 2+
246	5,31	+	0,42	-	0,25	-	0,04	-	0,1	-	0,03	-			МР отриц.
303	1,13	+	8,48	+	1,21	+			1,7	+	0,09	-	0,8	-	МР отриц. РПГА 2+
327	6,28	+	0,66	-	1,5	+	0,39	-	0,1	-	0,16	-			МР отриц.
329	4,74	+	0,4	-	0,62	-	0,00	-	0,2	-	0,25	-			МР отриц.
332	1,14	+	0,9	-	0,22	-	0,00	-	0,2	-	0,14	-			МР отриц.
336	4,21	+	1,17	+	0,84	-	0,00	-	0,4	-	1,17	+	0,3	-	МР отриц. РПГА отриц.
356	1,2	+	11,97	+	1,36	+			1,4	+	0,27	-	0,6	-	МР отриц. РПГА 2+

Примечание: \* Строка не заполнена, если образец не тестировали в данной тест-системе.



## Оснащение современной лаборатории

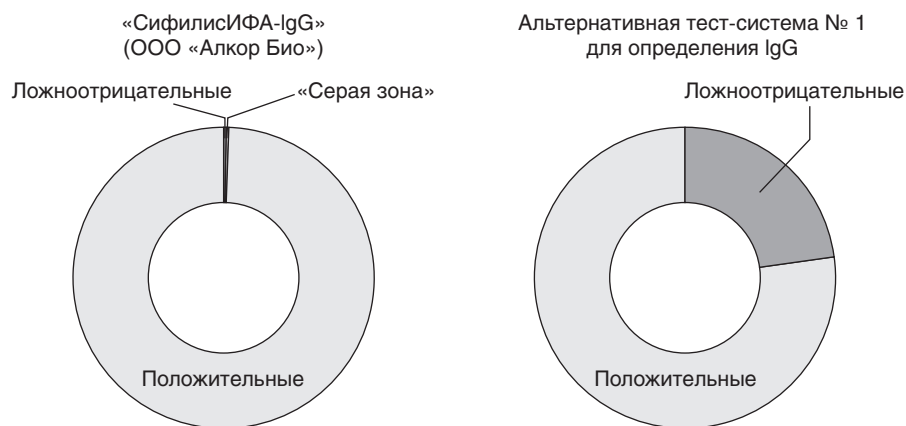


Рисунок 1. Результаты сравнительного тестирования положительных образцов

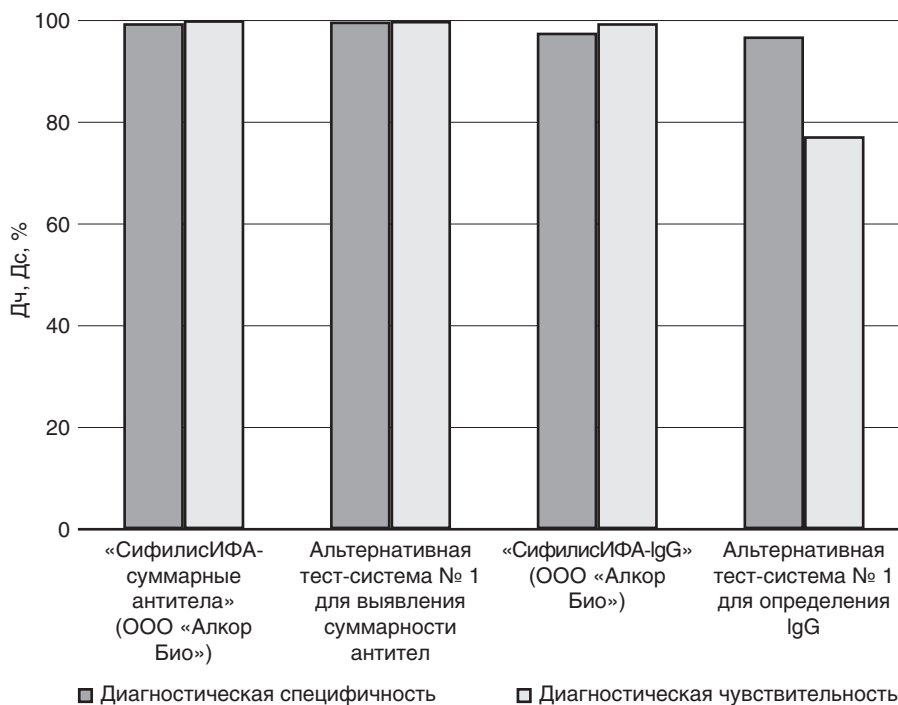


Рисунок 2. Сравнение диагностических характеристик проверенных тест-систем

Для набора производства ООО «Компания Алкор Био» получен 1 ложноотрицательный образец и 1 образец в «серой зоне», для набора «Альтернативная тест-система № 1» для

определения IgG получено 80 ложноотрицательных образцов, данные представлены на рисунке 1.

Таким образом по выборке из 353 образцов диагностическая чувствительность

набора «СифилисИФА-IgG» производства ООО «Алкор Био» составила 99,7%, диагностическая чувствительность в «Альтернативная тест-система № 1» для определения IgG – 77,3%.

Сравнение диагностических характеристик проверенных тест-систем для серологической диагностики сифилиса в постановках с сыворотками реальных пациентов представлено на рисунке 2.

### Выводы

При сравнении тест-системы «СифилисИФА-суммарные антитела» производства компании ООО «Алкор Био» и «Альтернативная тест-система № 1» для выявления суммарных антител к *Treponema pallidum* получены близкие значения диагностической специфичности и одинаковые значения диагностической чувствительности.

Диагностическая чувствительность набора «СифилисИФА-IgG» производства ООО «Компания Алкор Био» значительно превышает данный показатель у «Альтернативная тест-система № 1» для определения IgG при схожем значении диагностической специфичности. Наличие в наборе производства ООО «Компания Алкор Био» «серой зоны» снижает количество ложных результатов.

Таким образом, исследования качественных характеристик тест-систем «СифилисИФА-суммарные антитела» и «СифилисИФА-IgG» производства ООО «Компания Алкор Био» показало их высокую чувствительность и специфичность, что позволяет использовать их в широкой лабораторной практике

как при проведении скрининговых исследований, так и при дифференциальной диагностике стадий сифилитической инфекции.

### Список использованной литературы

1. Анализ эпидемиологической ситуации и динамика заболеваемости инфекциями, передаваемыми половым путем, и дерматозами на территории Российской Федерации / А.А. Кубанова, И.Н. Лесная, А.А. Кубанов и др. // Вестник дерматологии и венерологии. 2010. № 5.
2. Дмитриев Г.А., Фриго Н.В. «Сифилис. Клинико-лабораторный диагноз» / Москва. Медицинская книга, 2004.
3. Распоряжение Комитета по здравоохранению Администрации СПб и Центра госсанэпиднадзора в СПб от 31.12.2002 г. № 500-р/37 «О мерах по предупреждению распространения инфекций, передаваемых половым путем».
4. Приказ Минздрава от 26.03.2001 № 87 «О совершенствовании серологической диагностики сифилиса».
5. Клинические рекомендации Минздрава. Сифилис, 2020. Российское общество дерматовенерологов и косметологов.
6. Российское общество дерматовенерологов и косметологов. Клинические рекомендации по ведению больных сифилисом. Москва, 2015.
7. Распоряжение Комитета по здравоохранению Администрации Санкт-Петербурга от 27.08.2002 № 309-р «О совершенствовании лабораторной диагностики сифилиса, гонореи, других инфекций, передаваемых половым путем (ИППП), дерматозов и различных кожных заболеваний».