

© С. Д. ЗАЙКО, 2011

УДК 616.972-078.33

С. Д. Зайко

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ СИФИЛИСА

ЗАО "Аналитика", Москва

*Представлена информация о новых диагностических тестах, основанных на методах иммуноблоттинга и иммунохроматографии, для определения антител к *Treponema pallidum*. Обсуждается вопрос о позиционировании этих тестов в алгоритме современной серологической диагностики сифилиса.*

Ключевые слова: сифилис, экспресс-тест, иммуноблоттинг

S. D. Zaiko

CURRENT METHODS FOR SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF SYPHILIS

*The paper gives information on novel diagnostic tests based on immunoblotting and immunochromatographic methods used to detect antibodies against *Treponema pallidum*. Whether these tests should be incorporated into an algorithm of the current serological diagnosis of syphilis is discussed.*

Key words: syphilis, rapid test, immunoblotting

Серологическая диагностика сифилиса имеет долгую историю — с 1906 г., когда для этой цели была впервые использована реакция связывания комплемента. В течение всего XX в. этот метод занимал главное место при первичном обследовании больных, а в России его продолжают использовать в отдельных лабораториях и в настоящее время.

Серодиагностика — важнейший инструмент в борьбе с распространением сифилиса, что обеспечивается благодаря возможности широкомасштабного обследования не только пациентов, но и доноров крови и лиц, входящих в разные группы риска. Методы, используемые для серологической диагностики сифилиса, можно разделить на 3 группы:

- тесты, в которых используется нетрепонемный кардиолипновый антиген, в разных вариантах: микрореакция преципитации, тесты RPR (Rapid Plasma Reagin test), VDRL (Venereal Disease Research Laboratory test) и др.;

- тесты, в которых используются антигены *Treponema pallidum* (штамм Никольса), нативные или рекомбинантные: реакция гемагглютинации (РПГА) или агглютинации латексных частиц, иммуноферментный анализ (ИФА), иммунохроматографические экспресс-тесты, реакция непрямого иммунофлюоресценции (РИФ), иммуноблоттинг (Вестерн-блот и лайн-блот);

- тест, в котором используются живые спирохеты: реакция иммобилизации бледных трепонем (РИТ).

Каждый вид тестов имеет свои преимущества и ограничения.

В нетрепонемных тестах используется неспецифический кардиолипновый антиген (обычно получаемый из сердца быка). Он представляет собой комплекс молекул липидов (кардиолипин, лецитин, холестерин и др.), обладающий антигенными свойствами. Выявление антител к возбудителю сифилиса с помощью кардиолипинового антигена связано, по-видимому, с перекрестной реакцией его эпитопов с липопротеиновыми антигенными детерминантами клеточной стенки спирохет. Тесты микрореакции преципитации, RPR и VDRL являются быстрыми (5–10 мин), бесприборными, чувствительными и могут быть использованы как в качественном (скрининг), так и полуколичественном (определение титра образца) вариантах анализа. Снижение титра образца после проведенного лечения, являющееся критерием его эффективности, наиболее четко фиксируется именно при помощи нетрепонемных тестов, однако специфичность этих реакций сравнительно невелика (по разным оценкам, 80–95%). Антитела к кардиолипinovому антигену или его компонентам выявляются при аутоиммунных заболеваниях (системная красная волчанка), антифосфолипидном синдроме, некоторых инфекционных заболеваниях и др. Таким образом, полученный при использовании нетрепонемных тестов положительный результат требует повторного исследования с применением других методов.

Специфичность тест-систем, основанных на использовании очищенных трепонемных антигенов, позволяет использовать их для подтверждения результатов нетрепонемных тестов. Как правило, в качестве антигенов используют следующие нативные или рекомбинантные белки *Treponema pallidum*: p15, p17, p45, p47. Проведение анализа занимает 45 мин и более, что не позволяет отнести трепонемные тесты к быстрым (за исключением тестов, основанных на принципе иммунохроматографии). Для анализа методами ИФА и РИФ требуется специальное оборудование. С помощью этих методов, а также иммуноблоттинга можно отдельно определять антитела разных классов (IgG и IgM), что важно для диагностики первичного сифилиса. Тест-системы, основанные на методе РПГА, имеют высокую чувствительность и специфичность и не требуют специального оборудования, однако раздельное определение классов антител с их помощью невозможно.

Среди трепонемных тестов в свою очередь можно выделить скрининговые, т. е. рассчитанные на одновременное проведение большого числа исследований (ИФА, РПГА, отчасти иммунохроматографические экспресс-тесты), и подтверждающие (иммуноблоттинг, РИФ, РИТ). Тест-системы, основанные на методе иммуноблоттинга, позволяют определять антитела к отдельным антигенам *Treponema pallidum* (рис. 1). Эти антигены

Для корреспонденции:

Заико Сергей Дмитриевич, вед. спец. отдела продукции
 Адрес: 129343, Москва, а/я 93
 Телефон: (495)737-03-63
 E-mail: zaiko@analytica.ru

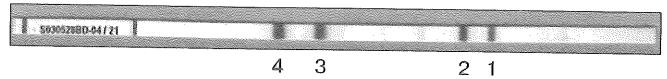


Рис. 1. Образец серопозитивной реакции на сифилис; набор Anti-*Treponema pallidum* Vwdternblot (IgG) производства компании Euroimmun.

Выявлены антитела класса IgG к антигенам: 1 — p15, 2 — p17, 3 — p45 (tprA), 4 — p47 (TnP47).

либо перенесены на нитроцеллюлозную мембрану после электрофореза в полиакриламидном геле с сохранением характерного профиля разделения белков (Вестерн-блот), либо нанесены непосредственно на мембрану (лайн-блот). Примером первых могут служить наборы для определения антител классов IgG и IgM производства компании Euroimmun AG (Германия), примером вторых — наборы INNOLIA производства компаний Inogenetics (Бельгия). Если при исследовании образца, положительно прореагировавшего в скрининговых тестах, реакция с индивидуальными трепонемными антигенами отсутствует, результат скринингового теста, вероятнее всего, является ложноположительным.

При использовании РИФ содержащиеся в исследуемом образце антитела связываются с препаратом бледных трепонем, фиксированных на предметном стекле для микроскопического исследования, и проявляются с помощью конъюгата, содержащего флуоресцентную метку. Оценку результата проводят с помощью флуоресцентной микроскопии. Специфичность метода повышается за счет предварительной абсорбции образца антигенами других видов трепонем и, в случае выявления антител класса IgM, инактивации ревматоидного фактора. Эта схема реализована в тест-системах Anti-*Treponema pallidum* IFT IgG и Anti-*Treponema pallidum* IFT IgM производства компании Euroimmun. РИФ по-прежнему считается золотым стандартом в

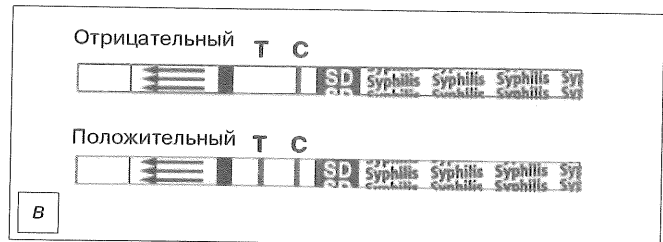
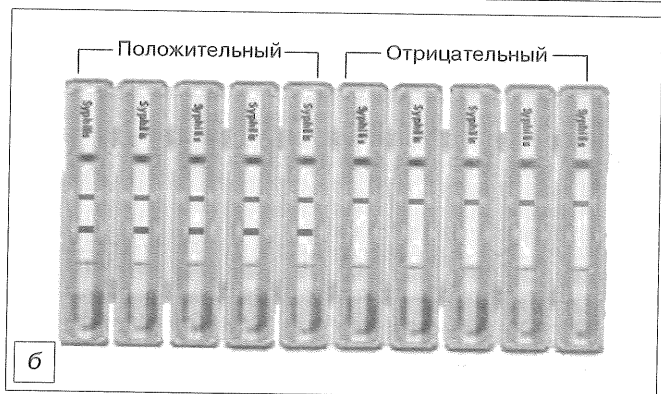
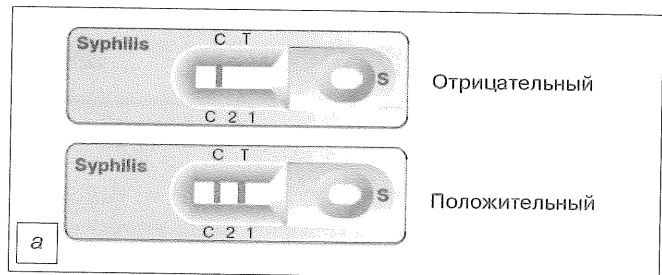


Рис. 2. Форматы экспресс-теста для серодиагностики сифилиса производства компании Standart Diagnostics.

а — тест-кассета; б — мультикассета; в — тест-полоска.

серологической диагностике сифилиса, однако ее применение ограничивается необходимостью использования специального оборудования и обязательным наличием высокой квалификации у специалистов лаборатории.

РИТ является самым старым из подтверждающих тестов, для ее проведения необходимы живые микроорганизмы. Этот вид анализа проводят только в специализированных лабораториях, и в настоящее время он выходит из употребления.

Уникальным является вариант ИФА-тест-системы, специально разработанный компанией Euroimmun, для определения антител к возбудителю сифилиса в спинномозговой жидкости. Этот тест применяют при наличии симптомов, указывающих на возможность нейросифилиса.

Согласно действующему приказу Минздрава РФ от 26.03.2001 г. № 87 "О совершенствовании серологической диагностики сифилиса", выявление антител к возбудителю сифилиса осуществляется в 2 этапа:

- первичное (отборочное) обследование проводится с помощью либо нетрепонемных тестов, либо трепонемных, таких как ИФА и РПГА;

- образцы, прореагировавшие при первичном обследовании как положительные или неопределенные, исследуют повторно с помощью трепонемных тестов РПГА, ИФА, ИФ или РИТ; положительный результат при повторном исследовании свидетельствует о наличии в образце антител к антигенам возбудителя сифилиса.

Исключение составляет профилактическое обследование беременных и пациентов специализированных стационаров, при котором применяют только трепонемные тесты, а также обследование доноров, при котором трепонемные и нетрепонем-

ные тесты с учетом особой ответственности этого исследования используют параллельно.

Обращает на себя внимание отсутствие в этом алгоритме тест-систем на основе иммуоблоттинга, а также иммунохроматографических экспресс-тестов. Ко времени выхода упомянутого приказа аттестованных тест-систем такого рода в России не было. В настоящее время такие диагностикумы зарегистрированы в Росздравнадзоре и должны найти свое место в алгоритме серодиагностики сифилиса.

Имунохроматографические экспресс-тесты сочетают в себе скорость и простоту бесприборного анализа с чувствительностью и специфичностью, близкими к соответствующим показателям ИФА. Примером могут служить экспресс-тесты SD BIOLINE производства компании Standard Diagnostics, Inc. (Корея). При постановке анализа может быть использована как сыворотка и плазма, так и цельная кровь. Тесты выпускаются в трех различных конструктивных исполнениях (рис. 2):

- тест-полоски (в групповой упаковке);
- тест-кассеты (отличаются от предыдущего варианта наличием пластикового корпуса и индивидуальной герметичной упаковкой);
- мультикасеты (стрипы в облегченном пластиковом корпусе, соединенные по 10 штук в разделяемые блоки).

Формат стрипов и кассет удобен в том случае, когда необходимо быстро проанализировать небольшое число образцов, мультикасеты же более удобны для большого потока исследований. Экспресс-тесты могут служить альтернативой тесту ИФА, если его постановка почему-либо затруднена либо требуется быстрое получение результата.

ID пациента: 1	Тест: Treponema pallidum IgG	
Дата поступления: 10.12.2003	Номер: 1	
Результат от: 15.10.2008		

EUROIMMUN	Medizinische Labordiagnostika AG	Автоматическая оценка тестовых стрипов с помощью программы EUROLineScan
------------------	----------------------------------	---

Молекулярный вес	Символ	o	(+)	
TrpN 47	+			+
trpA	+			
p 22	o			
TrpN 17	+			
TrpN 15	+			
Полоса выравнивания	o			

Класс	Комментарии
o	Нет окрашивания
(+)	Слабое окрашивание
+	Сильное окрашивание

Тест	Результат
Treponema pallidum IgG	Положительный

Подпись: _____

Рис. 3. Образец протокола, сформированного программой EuroLineScan.

Диагностикумы на основе иммуноблоттинга предназначены для подтверждения положительных скрининговых тестов. С их помощью можно следить за процессом сероконверсии. Тесты просты в постановке, методика анализа может быть автоматизирована. Компания Euroimmun для своих наборов бесплатно предоставляет специальное программное обеспечение EuroLineScan. С его помощью, просканировав окрашенные мембраны с использованием обычного планшетного сканера, можно не только количественно оценить содержание в образце антител к различным антигенам, но и документировать результаты в виде протоколов проведения анализа (рис. 3), а также создать удобную базу данных по всем исследованным образцам.

Положительный опыт применения новых трепонемных методов, таких как иммуноблоттинг и иммунохроматографические экспресс-тесты, нашел отражение в Европейских рекомендациях по диагностике и лечению сифилиса (декабрь 2008 г.), которые предусматривают следующий алгоритм серодиагностики:

— ИФА и РПГА (или ее аналог — тест агглютинации латексных частиц) в качестве скрининг-теста; нетрепонемные тесты для этой цели не рекомендованы;

— определение антител класса IgM (ИФА, иммуноблоттинг), если есть основания предполагать недавнее заражение, или повторное исследование через 1–2 нед;

— возможность использования экспресс-тестов, если это целесообразно, с обязательным подтверждением положительных результатов;

— подтверждение: анализ положительного образца другим методом (например, образца, положительного в РПГА, методом ИФА, и наоборот);

— подтверждение: использование метода иммуноблоттинга при расхождении результатов, полученных методами ИФА и РПГА;

— подтверждение: использование РИФ только в специализированных лабораториях;

— использование кардиолипидных тестов для мониторинга серологического ответа на лечение.

Внедрение в лабораторную практику новых высококачественных тест-систем расширяет возможности серодиагностики, обеспечивает более эффективное выявление сифилиса на всех его стадиях, позволяет гибко сочетать методы, основанные на разных принципах, для получения максимально достоверного результата.