

## **СРАВНИТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА, РЕАКЦИИ ПАССИВНОЙ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ И МИКРОРЕАКЦИИ В СЕРОДИАГНОСТИКЕ СИФИЛИСА**

Проанализированы результаты параллельной постановки общепринятого комплекса серологических реакций на сифилис (КСР), а также иммуноферментного анализа (ИФА), реакции пассивной гемагглютинации (РПГА) и отдельно микрореакции (МР) с использованием тест-систем, выпускаемых НПО «Диагностические системы», Нижний Новгород (ИФА-АНТИ-LUES и LUES-ТЕСТ.) и фирмы «Ниармедик», Москва (Люис-РПГА-тест) у 122 больных первичным, вторичным и ранним скрытым сифилисом, а также у 100 контрольных лиц, свободных от сифилитической инфекции. Показана высокая чувствительность ИФА (98,4%), РПГА (100%) и МР (вариант LUES-ТЕСТ, 94,3%), позволившая при сочетанном применении двух тестов (ИФА и МР или РПГА и МР) серологически верифицировать сифилис у всех пациентов. Рекомендовано внедрение примененных реакций и испытанных тест-систем в составе нового комплекса серологических реакций на сифилис.

*Ключевые слова: сифилис, серодиагностика, комплекс серологических реакций, иммуноферментный анализ, реакция пассивной гемагглютинации, микрореакция*

This paper is devoted to the analysis of the results, obtained with a standard complex of serological reactions for the diagnosis of syphilis. The diagnostic value of the combined procedure has been estimated in parallel with that of enzyme immunoassay (EIA), passive hemagglutination reaction (PHAR), and microreaction (MR) using commercial test-systems of NPO Diagnosticheskie sistemy (Diagnostic systems), Nizhny Novgorod (EIA/ANTI-LUES and LUES-TEST) and Niarmedik, Moscow (Lues-PHAR test). One hundred and twenty two patients with primary/ secondary, and early latent syphilis were enrolled in the study. The control group comprised 100 subjects, showing no signs of syphilitic infection. The study has demonstrated very high sensitivity of EIA (98.4%), PHAR (100%), and MR (LUES-TEST version, 94.3%) which allowed serological verification of the diagnosis of syphilis in all the patients (100%) by combining two procedures (EIA and MR or PHAR and MR). It is recommended that the above procedures and test-systems be included in a new complex of serological reactions for the diagnosis of syphilis.

*Key words: syphilis, serodiagnosis, complex of serological reactions, enzyme immunoassay, passive hemagglutination reaction, microreaction.*

В лабораторной диагностике сифилиса ведущее место занимает серодиагностика. Принятая в нашей стране Инструкция по постановке серологических тестов на сифилис (приказ Минздрава СССР от 2 сентября 1985 г. «О совершенствовании серологической диагностики сифилиса») предусматривает применение для скрининга и диагностики инфекции комплекса стандартных серологических реакций (КСР), состоящего из микрореакции преципитации с кардиолипидным антигеном (МР), реакции связывания комплемента с трепонемным (РСКт) и кардиолипидным (РСКк) антигенами; для подтверждения или опровержения диагноза в сложных случаях - специфических тестов РИТ и РИФ.

Однако наличие ложноположительных результатов, сложность, громоздкость и длительность постановки КСР, необходимость в антигене из патогенных трепонем для РИТ и РИФ существенно ограничивают применение указанных реакций в современных условиях.

В литературе последних лет обсуждается возможность замены общепринятого КСР на сифилис более компактным и достаточно чувствительным комплексом, состоящим из иммуноферментного анализа (ИФА) или реакции пассивной гемагглютинации (РПГА) и микрореакции (МР) [1,2], в связи с чем апробация этих методов диагностики представляется актуальной.

В последние годы в НПО «Диагностические системы» (Нижний Новгород) разработан ряд тест-систем для диагностики сифилиса, утвержденных и получивших разрешение Минздрава РФ

к использованию в медицинской практике, которые были опробованы в Центральном кожно-венерологическом институте Минздрава РФ и Нижегородском научно-исследовательском кожно-венерологическом институте. К их числу относятся рекомбинантная иммуноферментная тест-система «ИФА-ARTVL-LUES» и «LUES-TECT» для МР.

Целью настоящего исследования явилась сравнительная оценка диагностической эффективности ИФА, МР (с использованием упомянутых выше тест-систем) и РПГА (тест-система «Люис-РПГА-тест», фирма «Ниармедик», Москва) с общепринятым КСР у больных сифилисом.

Исследовано 222 образца сыворотки крови, в том числе 25 — от больных первичным, 53 — от больных вторичным и 44 — от больных ранним скрытым сифилисом (РСС), 100 - от доноров и больных с кожными заболеваниями, не болеющих сифилисом (контроль).

#### **Характеристика примененных тестов**

**LUES-TECT** Набор рассчитан на проведение 2000 МР на присутствие реакиновых антител (АТ) в сыворотке (плазме) крови человека и включает: 1) кардиолипиновый реагент - суспензию, содержащую 0,033% кардиолипина, 0,02% лецитина, 0,09% -холестерина, 10% холинхлорида и консервант - 0,1% тиомерсал; 2) положительный контрольный образец сыворотки крови (К+).

**Принцип:** кардиолипиновый реагент взаимодействует с присутствующими в сыворотке крови больного сифилисом реакинами с образованием легко визуализируемых агрегатов (хлопьев) разной величины.

Сыворотка крови получается стандартными методами и может быть нагрета при температуре 56°C в течение 30 мин без неблагоприятного воздействия на результат анализа либо применяться в непрогретом виде.

Реакция ставится на поверхности стекла или в углублении пластины из плексигласа путем последовательного нанесения 50 мкл испытуемой сыворотки и 16 мкл гомогенной суспензии КР. Ингредиенты реакции встряхивают в течение 8—10 мин с использованием шуттель-аппаратов или встряхивателей с частотой 100±2 колебания в минуту.

Перед анализом образцов согласно инструкции к тест-системе ставят контроли кардиолипинового реагента: 1) с положительным контрольным образцом (К+) и 2) с физиологическим раствором — контроль антигена — (КА-).

Учет результатов с опытными или контрольными образцами проводится немедленно во влажном состоянии при интенсивном освещении снизу.

При необходимости может быть проведено определение титра реакиновых АТ.

**ИФА-АНТИ-LUES** Тест-система рассчитана на проведение 96 анализов и представляет собой многокомпонентный набор, включающий следующие реагенты: иммуносорбент рекомбинантные аналоги трансмембранных белков *Treponema pallidum* с мол. м. 17 и 41 кД, сорбированные на полистироловом планшете; конъюгат анти-IgG человека с пероксидазой хрена (10-кратный концентрат); положительный контрольный образец (К+) — сыворотка крови человека в разведении 1:10, содержащая АТ к *Tr.pallidum* (Анти-Lues), отрицательный контрольный образец (К—) - сыворотка крови человека в разведении 1:10, не содержащая противосифилитических АТ; блок-раствор (100-кратный концентрат); раствор для разведения конъюгата; фосфатно-солевой раствор с твином-80 (25-кратный концентрат); субстратный буферный раствор; индикатор — ортофенилендиамин; стоп-реагент (серная или соляная кислота в концентрации 2 моль/л).

**Принцип:** Тест-система выявляет специфические IgG к возбудителю сифилиса *Tr.pallidum* в сыворотке (плазме) крови людей при помощи ИФА.

Реакция проводится в 3 фазы, рабочее разведение сывороток 1:10, учет результатов — количественный (с помощью спектрофотометра) при длине волны 492 нм с предварительной установкой «нуля» прибора по воздуху. Параллельно с использованием испытуемой сыворотки крови ставятся положительный и отрицательный контроли, а также контроли субстрата и конъюгата.

**Люис-РПГА-тест** Набор рассчитан на 80 определений и представляет 2,5% взвесь формализированных тонизированных эритроцитов барана, сенсibilизированных обработанным ультразвуком антигеном из культуральных бледных трепонем.

Набор состоит из диагностикума, контрольных эритроцитов, восстановителя диагностикума и контрольных эритроцитов, раствора для постановки РП ГА и положительной контрольной сыворотки крови.

**Принцип:** метод основан на феномене агглютинации эритроцитов, сенсibilизированных бледной трепонемой, в присутствии специфических противотрепонемных АТ.

Реакция ставится в макро- и микроварианте с качественным, а при необходимости и количественным определением АТ, оценивается по 4+ системе. Подробный ход анализа описан в работе [3].

**Результаты и обсуждение.** Как показали исследования, наиболее чувствительными из серологических реакций общепринятого КСР у больных сифилисом были МР и РСКт, давшие по 98,4 и 97,5% положительных результатов со значениями титров 1:4—1:128 и 1:5—1:160 (см. таблицу).

Таблица

**Частота (в %) положительных результатов общепринятого КСР, а также ИФА (ИФА-АНТИ-*LUES*), РПГА (Люис-РПГА-тест) и МР (*LUES*-ТЕСТ) у больных сифилисом и лиц контрольной группы**

Группа обследованных	КСР			ИФА (тест-система ИФА-АНТИ- <i>LUES</i> )	РПГА (тест-система Люис-РПГА-тест)	МР ( <i>LUES</i> -ТЕСТ)
	РСКк	РСКт	МР			
Сифилис первичный ( <i>n</i> =25)	96	96	96	96(КП = 3,3± 0,4)	100	100
Сифилис вторичный ( <i>n</i> =53)	100	100	100	100 (КП = 4,4± 0,09)	100	96
Сифилис ранний скрытый ( <i>n</i> =44)	95	97,7	100	100 (КП = 4,8± 0,12)	100	88,6
Всего ( <i>n</i> =22)	96,7	97,5	98,4	98,4 -	100	94,3
Контроль ( <i>n</i> =100)	0	0	0	1 (КП = 0,7± 0,02)	0	0

Частота положительных реакций, входящих в КСР, и титры определявшихся в них АТ возрастали от первичного к вторичному сифилису, что отражало известные закономерности усиления антителопродукции с прогрессированием инфекции.

У всех больных РСС отмечены положительные значения МР, которая оказалась наиболее чувствительной реакцией КСР у больных с этой формой инфекции. Меньшее число положительных значений выявлено при постановке РСКт (97,7%) и РСКк (95%).

Положительные значения ИФА наблюдались у 98,4% пациентов, при этом у всех (100%) больных вторичным и ранним латентным сифилисом они были позитивными.

Количественный анализ уровня АТ с помощью коэффициента позитивности [4] показал возрастание их продукции от первичного к вторичному сифилису и РСС.

Результаты ИФА у 99% пациентов совпали с данными единственного трепонемного теста в КСР - РСКт. Расхождения отмечены лишь у 1 пациентки с РСС, самостоятельно употреблявшей в прошлом антибиотики, при этом результат ИФА у нее был положительным.

Исследование сыворотки с помощью РПГА, проводившейся в качественном варианте, показало ее высокую (100%) чувствительность у больных со всеми формами сифилиса, превосходящую аналогичные показатели РСКт (96 и 97,7% положительных результатов у больных первичным и ранним скрытым сифилисом) и ИФА (96% положительных результатов при первичном сифилисе). Это соответствует данным [5, 6] о возможности широкого использования вышеназванной реакции для диагностики как ранних, так и более поздних стадий инфекции.

*LUES*-ТЕСТ несколько (недостаточно) уступал в чувствительности МР и РСКк у больных вторичным (96%) и в особенности латентным сифилисом (88, 6%), что могло объясняться избытком АТ и конкурентными взаимоотношениями IgG и IgM на этих стадиях инфекции, однако у пациентов с первичным сифилисом его чувствительность превосходила результаты МР и РСКк (100%). Совпадение результатов *LUES*-ТЕСТ с результатами МР и РСКк отмечено

соответственно в 95 и 96% случаев.

Положительные значения 2 либо 3 из 3 примененных реакций позволили верифицировать сифилис серологически у всех пациентов, и показали возможность и своевременность замены рутинного КСР современным - более доступным, быстрым в исполнении и достаточно чувствительным.

Следует отметить, что каждая из примененных тест-систем имеет ряд преимуществ перед тестами, входящими в состав общепринятого КСР.

Тест-система ИФА-АНТИ- *LUES* включает блок-раствор, сорбирующий групповые АТ, что позволяет снизить число неспецифических результатов. В ее состав входит конъюгат моноклональных IgG, выявляющий специфические противотрепонемные АТ. Сыворотки разводятся непосредственно в планшете, что значительно упрощает исследование и сокращает его время. Высокая чувствительность и специфичность реакции за счет перечисленных выше усовершенствований, а также применения в составе иммуносорбента рекомбинантных аналогов трансмембранных протеинов *Tr.pallidum* позволяют рекомендовать ее использование в качестве подтверждающего теста.

Техническая простота и высокая воспроизводимость феномена агглютинации в РПГА обеспечивается применением эритроцитарных диагностикумов, представляющих собой сенсibilизированные антигеном эритроциты животных или птиц. Быстрота постановки и объективность результатов при высокой чувствительности и специфичности позволяют применять ее в качестве как специфической реакции, так и скринингового теста.

*LUES*-ТЕСТ, являющийся аналогом МР, содержит стандартизированный антиген с уже добавленным холинхлоридом и консервантом, что исключает стадию его предварительного приготовления. Простота и быстрота (8—10 мин) выполнения анализа наряду с высокой чувствительностью делают ее очень удобной для массовых исследований.

Несомненным преимуществом применения сочетания ИФА (тест-система ИФА-АНТИ-*LUES*) или РПГА (тест-система Люис-РПГА-тест) с МР (тест-система *LUES*-ТЕСТ) как одного из вариантов адекватной замены общепринятого КСР является заложенная в нем возможность скрининга и подтверждения диагноза, а также количественного анализа АТ, что особенно важно при контроле за эффективностью терапии.

Полученные сравнительные результаты постановки ИФА или РПГА в сочетании с МР с использованием тест-систем, разработанных НПО «Диагностические системы» (Нижний Новгород) и «Ниармедик» (Москва), позволяют рекомендовать их внедрение в составе нового комплекса серологических реакций на сифилис.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Дмитриев Г.А. Лабораторная оценка новых тест-систем для диагностики болезней, передаваемых половым путем: Тезисы докладов 7-го Российского съезда дерматологов и венерологов. Казань 1996; 3: 166.
2. Ткачев В.К., Баранова С.Г., Курлаева Т.Е. Новые методы серодиагностики сифилиса. Иммунопатология и иммунореабилитация в дерматовенерологии: Тезисы Российской научно-практической конференции дерматовенерологов. Екатеринбург 1997; 1: 91-92.
3. Реакция пассивной гемагглютинации для серодиагностики сифилиса. Пособие для врачей. М: ЦКВИ 1998; 12.
4. Киселева Г.А., Аковбян В.А., Резайкина А.В., Чимитова И.А. Оценка эффективности инфекционного сифилитического процесса у лиц с серорезистентностью. Современные аспекты клиники, диагностики и лечения инфекций, передаваемых половым путем, наиболее распространенных дерматозов и микозов. Эпидемиологические подходы к анализу заболеваемости и деятельности ЛПУ. Тезисы докладов. М 1999; 15-16.
5. Tomizawa T., Kasamatsu S. Haemagglutination tests for diagnosis of syphilis. Jap J Med Sci Biol 1966; 19: 305-308.
6. Tomizawa T., Kasamatsu S., Yamaya S. Usefulness of the haemagglutination test using *T. pallidum* antigen (ТРНА) for the diagnosis of syphilis. Jap J Med Sci Biol 1969; 22: 341.

Опубликовано: Ж. «Вестник дерматологии и венерологии» – 2000.-№4- С.34-36