

Серии научно-практических рецензируемых журналов



Медицинский АЛФАВИТ

18 (315) 2017



MEDICAL ALPHABET | Epidemiology
& Hygiene
Russian Professional Medical Journal

ЭПИДЕМИОЛОГИЯ И ГИГИЕНА

ТОМ № 2

- Инфекционные заболевания
- Эпидемиология
- Паразитология
- Профилактика
внутрибольничных инфекций
- ИСМП

Индекс в каталоге «РОСПЕЧАТЬ» 36228

www.medalfavit.ru

Технология линейного иммунного блоттинга для диагностики сифилиса

В. А. Арсеньева, ст. микробиолог отдела перспективных разработок¹

Е. А. Амелина, к.б.н., нач. отдела перспективных разработок¹

С. Г. Марданлы, д.м.н., проф. кафедры фармакологии и фармацевтических дисциплин²,

президент и директор по науке¹, академик АМТН, заслуженный работник здравоохранения России

С. В. Ротанов, д.м.н., доцент, проф. кафедры дерматовенерологии лечебного факультета³, консультант¹

¹ЗАО «ЭКОлаб», г. Электрогорск, Московская область

²ГОУ ВО Московской области «Государственный гуманитарно-технологический университет» Минобразования Московской области, г. Орехово-Зуево, Московская область

³ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, г. Москва

Linear immune blotting technology for diagnosis of syphilis

V. A. Arsenyeva, E. A. Amelina, S. G. Mardanly, S. V. Rotanov

ECOLab Co., Elektrogorsk, Moscow Region; State University of Humanities and Technology, Elektrogorsk, Moscow Region; Russian National Research Medical University n.a. N.I. Pirogov, Moscow; Russia

Резюме

Разработан новый отечественный набор реагентов «Лайн-Блот Сифилис» для определения специфических антител классов G или M к *T. pallidum* в формате линейного иммунного блоттинга (комплект 1 — IgG и комплект 2 — IgM). Исследование контрольных материалов промышленного производства с новым набором показало 100-процентные чувствительность и специфичность результатов исследований. Изучение 341 клинического образца, полученного от больных сифилисом пациентов, проходивших обследование, и лиц без указаний на наличие сифилиса, с разработанным набором позволило определить его клиническую информативность (клинические чувствительность и специфичность): с набором № 1 (IgG) — 98,8 и 98,3% и с набором № 2 — 86,7 и 100% соответственно. Полученные результаты обосновали рекомендации к его применению для диагностики сифилиса и верификации не согласующихся между собой результатов других трепонемоспецифических тестов (РИФ, ИФА и РПГА).

Ключевые слова: сифилис, линейный иммунный блоттинг, клиническая лабораторная диагностика.

Summary

A new domestic kit of "Line-Blot Syphilis" reagents was developed to determine specific antibodies of classes G or M to *T. pallidum* in linear immune blotting format (IgG in the kit No. 1 and IgM in the kit No. 2). The study of control materials of industrial production with a new set revealed 100 percent sensitivity and specificity of research results. A study of 341 clinical specimens obtained from patients with syphilis of patients who underwent examination and those without indication of the presence of syphilis, with the developed kit, made it possible to determine its clinical informativity (clinical sensitivity and specificity): with the kit No. 1 (IgG) 98.8 and 98.3% and 86.7 and 100% respectively with the the kit No. 2. The obtained results substantiated the recommendations to its application for the diagnosis of syphilis and the verification of the results of other treponemose specific tests (RIF, ELISA, and RPGA) that do not agree with each other.

Key words: syphilis, linear immune blotting, clinical laboratory diagnostics.

При скрининге населения с целью выявления сифилитической инфекции в настоящее время приоритетную роль играют иммунохимические тесты, направленные на выявление в крови или ликворе обследуемого пациента специфических антител разных классов (суммарно IgM + IgG + IgA или только IgG или IgM) к *Treponema pallidum*. В диагностических лабораториях первичный скрининг осуществляют такими методами, как иммуноферментный анализ (ИФА) или реакция пассивной геммагглютинации (РПГА), каждый из которых отличается по уровню диагностической эффективности, что обусловлено составом

иммуносорбента, классу выявляемых антител, а также разным уровнем клинической и аналитической чувствительности и специфичности метода на разных стадиях развития инфекционного процесса. При этом в любом из современных лабораторных тестов на сифилис с частотой 1–4% могут быть получены ложные отрицательные и ложные положительные результаты [1–5].

Для верификации истинных результатов трепонемоспецифических тестов от ложных и дополнительной оценки иммунологической реактивности пациента применяют медицинскую технологию линейного иммунного блоттинга (ЛИБ), что позволяет

в рамках в биологическом образце дифференцированно определять антитела к каждому из используемых специфических антигенов возбудителя [6–7].

До последнего времени для лабораторных исследований в России использовали преимущественно импортные наборы реагентов для ЛИБ с определением специфических иммуноглобулинов класса G, так как отсутствовал производственный выпуск отечественных наборов, прошедших регистрацию в Росздравнадзоре.

Целью исследования явилась создание нового отечественного набора реагентов для диагностики *in vitro* для

дифференцированного определения в сыворотке и плазме крови или цереброспинальной жидкости пациента антител классов М или G к наиболее специфичным антигенам *Treponema pallidum*.

Материалы и методы

При проектировании и разработке дизайна нового набора реагентов за основу был принят формат линейного иммуноблоттинга, при котором на твердую фазу (узкие полоски пористой нитроцеллюлозной мембраны — стрипы) в виде поперечных линий дискретно наносят и иммобилизуют рекомбинантные и синтетические антигены *Treponema pallidum* (иммуносорбент) [6–9].

Для клинической оценки разработанного нового отечественного набора реагентов применяли предварительно аттестованные в ИФА_{IgG+IgM=IgA} (или ИФА_{IgM} / ИФА_{IgG}) и РИФ_{abc/200} образцы сыворотки крови (n = 341), полученные от больных сифилисом (n = 236), лиц с противоречивыми результатами исследования в трепонемных тестах (n = 23) и от здоровых людей (n = 82), содержавшие и не содержавшие антитела к антигенам бледной трепонемы соответственно.

Результаты исследования и обсуждение

В отделе перспективных разработок предприятия ЗАО «ЭКОлаб» (г. Электрогорск Московской обл.) был разработан новый оригинальный набор реагентов «Лайн-Блот Сифилис» для диагностики сифилиса методом линейного иммуноблоттинга (рис. 1).

В соответствии с современными научными представлениями о структуре протеома возбудителя сифилиса [10–13], специфичности и иммуногенности его отдельных белков и липопротеиновых комплексов на разных стадиях развития инфекционного процесса у человека [10–11], а также на основе научных публикаций по изучению диагностической информативности наборов реагентов зарубежного и отечественного производства (ИФА и ЛИБ) были отобраны четыре наиболее изученных рекомбинантных антигена, являющихся полными аналогами антигенов *T. pallidum strain*



Рисунок 1. Внешний вид и состав набора «Лайн-Блот Сифилис» для выявления антител к *T. pallidum* методом линейного иммуноблоттинга.

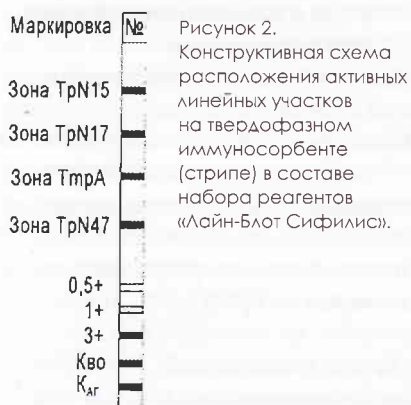


Рисунок 2. Конструктивная схема расположения активных линейных участков на твердофазном иммуносорбенте (стрипе) в составе набора реагентов «Лайн-Блот Сифилис».

Nichols. К числу иммунодоминантных специфических антигенов бледной трепонемы в настоящее время относят структурный эндоплазматический белок TrpN 15, мембранный структурный липопротеин TrpN 17, цинкзависимую карбоксипептидазу TrpN 47 и периплазматическую металлотрансферазу TrpA. Перечисленные антигены были использованы для нанесения и иммобилизации в виде дискретных линий на нитроцеллюлозные стрипы в составе нового набора реагентов для диагностики сифилиса [9, 14] (рис. 2).

Кроме этого, на стрипах были дополнительно созданы пять линейных участков для внутреннего контроля качества исследования: три из них («0,5+», «1+» и «3+») содержат человеческие IgG или IgM в разных концентрациях и служат в качестве внутренних калибраторов для

полуколичественной оценки результатов лабораторного исследования, одна линия содержит видоспецифические антитела против человеческих IgG или IgM и является контролем внесения биологического образца в реакционную среду («Кво»), еще одна линия («КАр») используется для оценки специфичности результатов исследования, так как содержит белковый композит, используемый для иммобилизации антигенов и антител на твердой фазе (стрипе).

Новое медицинское изделие «Лайн-Блот Сифилис» предусматривает два варианта комплектации: № 1 для определения IgG и № 2 для определения Ig M. Состав набора реагентов включает раствор для разведения образцов, иммуносорбент (24 нумерованных стрипа), конъюгат (козьи антитела к IgG или IgM человека, конъюгированные с щелочной фосфатазой в комплектах № 1 или № 2 соответственно), РФ-сорбент (только в комплекте № 2), 10-кратный концентрат промывочного раствора и субстратный раствор, а также пластиковые планшеты с продольными лунками (ванночками), клейкую пленку и инструкцию по применению.

Процедура исследования образцов (сыворотки крови или ликвора) человека осуществляется в следующей последовательности:

- перед определением специфических IgM (с комплектом № 2) исследуемые образцы обрабатывают РФ-сорбентом и центрифугируют для удаления осадка из IgM ревматоидного фактора, а также избытка антител класса G;
- в реакционную ванночку с раствором для разведения образцов погружают стрип и добавляют испытуемый образец, инкубируют при комнатной температуре; это приводит к образованию иммунных комплексов, фиксированных в участках иммобилизации соответствующих антигенов возбудителя сифилиса; все не вступившие в реакцию антитела сыворотки крови пациента удаляют при последующем четырехкратном промывании;
- в реакционные ванночки вносят конъюгат, что обеспечивает формирование на стрипе более сложных иммунных комплексов, содержащих также метку-фермент; после экспозиции стрипы повторно отмывают;
- в ванночки с иммуносорбентом вносят субстрат, содержащий хромоген и окислитель; на стрипах в линейных участках локализации антигенов *T. pallidum* и контрольных линиях в результате индуцированного щелочной фосфатазой восстановления хромогена происходит локальное изменение цвета; интенсивность окраски линий пропорциональна содержанию специфических антител в испытуемом образце.

Учет и интерпретация результатов исследования

Появление окрашивания контрольных линий «0,5+», «1+», «3+» и «КВО» свидетельствует о правильном проведении процедуры исследования в целом. Интенсивность окраски линии «0,5+» служит критическим уровнем *cut off*: менее интенсивное окрашивание линий в местах нанесения антигена расценивают как отрицательный, а более интенсивное — как положительный результат определения антител к соответствующему антигену возбудителя. Сопоставление интенсивности

цвета участков, соответствующих линиям нанесения каждого из антигенов с контрольными линиями «0,5+», «1+» и «3+» позволяет полуколичественно оценить содержание в исследуемом образце трепонемоспецифических антител в условных единицах «плюсах» (при визуальной оценке от 1+ до 4+) или оцифрованном формате (при использовании видеоцифровых сканеров и соответствующего программного обеспечения).

Доклиническая оценка набора реагентов «Лайн-Блот Сифилис»

Оценка диагностических свойств набора «Лайн-Блот Сифилис» была проведена с аттестованными в ИФА сериями контрольных материалов различного производства, содержащими ($n = 78$) и не содержащими ($n = 42$) антитела к возбудителю сифилиса.

При исследовании в ЛИБ с «Лайн-Блот Сифилис» сывороток контрольной панели было получено полное совпадение результатов определения специфических антител с паспортными характеристиками, что высоко охарактеризовало чувствительность и специфичность результатов исследования (по 100%).

Оценка клинической информативности исследований с набором «Лайн-Блот Сифилис — IgG», комплект № 1

Клиническую информативность по ГОСТ Р 53022.3–2008 [15] комплекта № 1 нового набора оценивали на 241 сыворотке крови, охарактеризованной в ИФА_(IgG + IgM + IgA) и РИФ_{abc/200}: 160 образцов были получены от больных сифилисом (содержали антитела в антигенам *T. pallidum*); 58 образцов были взяты от лиц без указаний на наличие сифилиса (при обследовании трепонемоспецифические антитела в них не были определены); 23 образца были получены от лиц, проходивших диагностическое обследование (они показали несоответствие результатов в ИФА_(IgG + IgM + IgA) и РИФ_{abc/200}).

Исследование 160 образцов (аттестованных как содержавшие трепонемоспецифические антитела) в ЛИБ

с «Лайн-Блот Сифилис — IgG» позволило получить 158 (98,8%) положительных и 2 (1,2%) неопределенных результата. В соответствии с инструкцией по применению набора заключение о неопределенном результате исследования в ЛИБ выдается при выявлении антител выше уровня *cut off* лишь к одному из нанесенных на стрип антигенов возбудителя, в то время как в ИФА_(IgG + IgM + IgA) и РИФ_{abc/200} результат отражает суммарное содержание антител ко всем используемым в исследовании антигенам возбудителя. Проведение ЛИБ («Лайн-Блот Сифилис — IgG») с 58 образцами, полученными от пациентов без указаний на наличие сифилиса, дало 57 (98,3%) отрицательных и 1 (1,7%) неопределенный результат. Исследование 23 образцов с противоречивыми результатами исследования в ИФА_(IgG + IgM + IgA) и РИФ_{abc/200} позволило получить 15 (65,2%) положительных, 5 (21,7%) отрицательных и 3 (13,1%) неопределенных результата, что в значительном числе случаев позволяет клиницисту прийти к определенному диагностическому решению.

Установленные в исследовании высокие показатели клинической чувствительности (98,8%) и специфичности (98,3%) позволили рекомендовать набор «Лайн-Блот Сифилис — IgG» для диагностики сифилиса и верификации не согласующихся между собою результатов трепонемоспецифических тестов (ИФА, РИФ, РПГА).

Оценка клинической информативности исследований с набором «Лайн-Блот Сифилис — IgM, комплект № 2

При изучении клинической информативности комплекта № 2 проводили исследование образцов крови, полученных до начала терапии только от больных сифилисом первичным ($n = 76$), так как именно при этой стадии инфекции гуморальный иммунитет с участием антител класса М наиболее выражен, и образцов крови здоровых доноров ($n = 24$). Исследование 76 образцов больных сифилисом первичным в ИФА_(IgG + IgM + IgA) и РИФ_{abc/200} выявило положительные результаты обоих

тестов в 74 случаях, отрицательные результаты обоих тестов в одном случае и в одном случае положительный результат в РИФ_{abc/200} при отрицательном в ИФА_(IgG + IgM + IgA). Результаты обследования крови 24 здоровых доноров показали отрицательные результаты обоих тестов одновременно.

Исследование в ЛИБ с «Лайн-Блот Сифилис — IgM» образцов крови больных сифилисом первичным позволило получить 65 (85,5%) положительных, 8 (10,9%) неопределенных и 2 (2,6%) отрицательных результата. Неопределенные результаты в ЛИБ характеризовались интенсивным окрашиванием полосы, соответствовавшей TrpA-антигену, и незначительным (слабее «0,5+») — полосы TrpN 17. Отрицательные результаты в ЛИБ наблюдали с двумя образцами, показавшими также отрицательные результаты в ИФА_(IgG + IgM + IgA).

Таким образом, на основании результатов трех специфических тестов один образец больного сифилисом первичным был оценен как не содержащий специфические антитела, что послужило основанием для пересчета показателя клинической чувствительности в отношении 75 обследованных образцов; он составил 86,7%.

Обследование крови 24 доноров с набором «Лайн-Блот Сифилис — IgM» дало отрицательные результаты во всех случаях (100%).

Расчетные показатели клинической чувствительности (86,7%) и специфичности (100%) результатов исследований с набором «Лайн-Блот Сифилис — IgM» являются высокой характеристикой при выявлении антител класса М. Полученные показатели позволили рекомендовать применение комплекта № 2 (IgM) при диагностике первичного сифилиса, а также для верификации не согласующихся между собой результатов тремонемоспецифических тестов при раннем сифилисе (РИФ, ИФА и РПГА).

Выводы

1. Для дифференцированного определения специфических антител к иммунодоминантным рекомбинантным антигенам *Treponema*

pallidum в образцах крови или ликвора человека на предприятии ЗАО «ЭКОлаб» (г. Электрогорск Московской области) разработан новый отечественный набор реагентов в формате линейного иммунного блоттинга «Лайн-Блот Сифилис» (комплект № 1 — IgG и комплект № 2 — IgM). В установленном порядке осуществлена его регистрация в Росздравнадзоре, что дает разрешение на его обращение на территории Российской Федерации (производство, продажа и применение в медицинских организациях) в качестве диагностического и подтверждающего теста при выявлении сифилиса (РУ № РЗН 2014/1657 от 05.06.2014).

2. При исследовании аттестованных контрольных материалов различного производства, содержащих и не содержащих антитела к *T. pallidum*, с набором «Лайн-Блот Сифилис» установлены 100-процентные чувствительность и специфичность результатов.
3. Изучение клинических образцов крови, полученных от больных сифилисом пациентов, проходивших диагностическое обследование, и лиц без указаний на наличие сифилиса, позволило определить высокие показатели клинической информативности исследований с новым отечественным набором реагентов «Лайн-Блот Сифилис» для линейного иммуноблоттинга. Применение этого набора позволяет осуществлять верификацию не согласующихся между собой результатов других тремонемоспецифических тестов (РИФ, ИФА и РПГА).

Список литературы

1. UK National Guidelines on the Management of Syphilis, 2008. [http://www.bashh.org/documents/1879].
2. Sokolovskiy E., Frigo N., Rotanov S., Savicheva A., Dalia O., et al. Guidelines for the laboratory diagnosis of syphilis in East-European countries. *J. Eur. Academy Dermatol. Venereol.* 2009; 23 (6): 623–632.
3. Бондарева В. П., Дерябина В. П., Захарова Е. Н. и др. Современные подходы к лабораторной диагностике сифилиса. *Клин. лаборат. диагностика* 2010; 11: 46–48.

4. Ткачев В. К. Современный алгоритм серологической диагностики сифилиса: возможности и проблемы. *Новости «Вектор-Бест* 2012; 3 (65): 2–6. [http://www.vector-best.ru/nvb/n65/st65_1.htm].
5. Фриго Н. В., Ротанов С. В., Манукьян Т. Е., Катунин Г. Л., Суворова А. А., и др. Лабораторная диагностика сифилиса: вчера, сегодня, завтра. *Вестник дерматол. и венерол.* 2012; 4: 16–23.
6. 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 (3): 973–978.
7. Чернова Т. А., Гордеева Г. В., Прокольева А. Е. Линейный иммуноблот — новый диагностический тест для серодиагностики сифилиса. *Клин. дерматол. и венерол.* 2005; 1: 21–22.
8. Фриго Н. В., Дударева Л. А., Ротанов С. В., Иванов А. М. Иммуноблоттинг в диагностике ранних форм сифилиса. *Вестник дерматол. и венерол.* 2008; 4: 57–62.
9. Марданлы С. Г., Ротанов С. В., Амелина Е. А. и др. Разработка нового набора реагентов для линейного иммуноблоттинга с целью диагностики сифилиса. II Конгресс Евроазиатской ассоциации дерматовенерол. М., 2012: 120.
10. Brinkman M. B., McKeivitt M., McLoughlin M. et al. Reactivity of Antibodies from Syphilis Patients to a Protein Array Representing the *Treponema pallidum* Proteome. *J. Clin. Microbiol.* 2006 (Mar); 44 (3): 888–891.
11. McGill M. A., Edmondson D. G., Carroll J. A. et al. Characterization and Serologic Analysis of the *Treponema pallidum* Proteome. *Infection and immunity* 2010; 78 (6): 2631–2643.
12. Ротанов С. В., Хайруллин Р. Ф., Фриго Н. В. Изучение протеома *T. pallidum* с целью совершенствования лабораторных исследований для диагностики сифилиса. *Вестник дерматол. и венерол.* 2012; 4: 10–15.
13. Хайруллин Р. Ф., Ротанов С. В., Фриго Н. В., Белоусова А. В. Биоинформатический анализ специфических антигенов *T. pallidum*. *Вестник дерматол. и венерол.* 2012; 5: 56–64.
14. Марданлы С. Г., Арсеньева В. А. Новая тест-система «Лайн-Блот Сифилис — IgM» для определения IgM-антител к *Treponema pallidum* методом линейного иммуноблоттинга. *Вестник службы крови* 2014; 1: 44–47.
15. Национальный стандарт Российской Федерации. ГОСТ Р 53022.3–2008. «Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов».

