

**ЗАО «Вектор-Бест»**

В.К. Ткачёв  
Т.Г. Вяткина

# **ИФА-диагностика сифилиса**

Информационно-методическое пособие

3-е издание, переработанное и дополненное

Кольцово  
2005

ББК 28  
Т48

*Уважаемые коллеги!*

*В последние годы иммуноферментный анализ занял устойчивое положение среди других методов серологической диагностики сифилиса и прочно вошел в повседневную медицинскую практику во многих регионах России. В данной брошюре мы попытались ответить на некоторые вопросы, которые наиболее часто возникают у специалистов, занимающихся диагностикой сифилиса.*

Ткачѐв Вячеслав Константинович,  
директор по производству ЗАО «Вектор-Бест»

Вяткина Тамара Геннадьевна,  
начальник отделения  
ИФА сифилиса ЗАО «Вектор-Бест»

630128, г. Новосибирск, а/я 102, ЗАО «Вектор-Бест» тел.: (383) 2276-030,  
3328-134 тел./факс: (383) 3329-444

**Т48 Ткачѐв В.К., Вяткина Т.Г.**

ИФА-диагностика сифилиса. Информационно-методическое пособие. 3-е издание, переработанное и дополненное – г. Новосибирск: ЗАО «Вектор-Бест». 2005. – 48 с.

© ЗАО «Вектор-Бест», 2005

## ВВЕДЕНИЕ

Заболееваемость инфекциями, передаваемыми половым путем (ИППП), среди которых немалая доля принадлежит сифилису, во всем мире продолжает расти. Россия в этом смысле не является исключением. Достаточно вспомнить 1997 год, когда уровень заболеваемости сифилисом в РФ достиг катастрофических размеров. В последующие годы наметились некоторые положительные тенденции: заболеваемость сифилисом начала снижаться, достигнув в 2002 году 119,5 случаев на 100 тыс. населения. Однако эпидемиологическая ситуация по сифилису по-прежнему остается тревожной. При этом в последние десятилетия во всём мире отмечается увеличение доли бессимптомного сифилиса и сифилиса со стёртой клинической картиной, что в конечном итоге приводит к росту поздних форм заболевания, таких как висцеральный сифилис и нейросифилис. В таких условиях по-прежнему актуальной остается проблема эффективной диагностики данного заболевания. Особая роль при этом должна отводиться методам массового профилактического обследования населения (скрининга) с целью раннего выявления инфекции, что диктует необходимость повышения требований к чувствительности скрининговых тестов на сифилис. Кроме того, в связи со сложным экономическим положением в стране опасная ситуация сложилась в службе крови: оплата кроводачи стимулирует вовлечение в контингент доноров группы лиц с повышенным риском заболеваний, передающихся половым путем. Предупреждение передачи возбудителя сифилиса с компонентами крови – важная составная часть проблемы профилактики гемотрансмиссивных инфекций. В настоящее время в практике службы крови широко используются высокочувствительные и специфичные диагностические тесты на сифилис. Актуальной задачей сегодняшнего дня остается повсеместное внедрение тех же тестов в практику серологических лабораторий дерматовенерологической службы.

Существующие на отечественном рынке диагностических средств иммуноферментные тест-системы для выявления анти-трепонемных антител в сыворотке (плазме) крови и ликворе сегодня приходят на смену либо встают в один ряд с традиционными классическими методами серодиагностики сифилиса.

## АНТИТЕЛООБРАЗОВАНИЕ ПРИ СИФИЛИТИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ

Динамика антителообразования при сифилисе изучена достаточно хорошо. Первыми после заражения вырабатываются иммуноглобулины М, выявляемые в определяемых количествах на второй неделе и достигающие максимальной концентрации в крови на 6—9 неделе [1]. Затем концентрация их даже без лечения начинает снижаться вследствие замены их иммуноглобулинами класса G, достигая с течением времени подпорогового уровня. Рецидив заболевания или повторное заражение приводят к новому нарастанию концентрации IgM, причем в случае рецидива антитела этого класса часто вырабатываются даже в более высоких концентрациях, чем при первичном инфицировании. После проведения эффективного лечения концентрация IgM быстро падает, и, обычно, через 3—9 месяцев они перестают определяться в сыворотке крови [2].

Иммуноглобулины G в определяемых количествах появляются в крови через 3—4 недели от момента инфицирования. Концентрация их нарастает, на 6-ой неделе начинает преобладать над концентрацией IgM, и, достигая максимума, сохраняется на определенном уровне в течение длительного времени. После проведения эффективного лечения концентрация иммуноглобулинов постепенно снижается, но происходит это гораздо медленнее, чем в случае с IgM. Как правило, IgG в определяемых количествах могут обнаруживаться спустя год и более после проведенной терапии, а в отдельных случаях – даже спустя десятилетия.

У новорожденного первые антитела также относятся к классу иммуноглобулинов M [3]. Известно, что при инфицировании плода они могут синтезироваться, начиная с 3 месяца беременности, а инфицирование может произойти на любой стадии; пассивно же перенесенные через плаценту материнские иммуноглобулины G у здорового неинфицированного ребенка катаболизируются и исчезают только через 12—18 месяцев [4]. Принципиальных отличий в динамике антителообразования при сифилисе у детей в литературе не встречается.

## СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ СЕРОДИАГНОСТИКИ СИФИЛИСА

Действующий приказ Министерства Здравоохранения РФ № 87 от 26 марта 2001 года «О совершенствовании серологической диагностики сифилиса» предусматривает использование для серо- и ликвордиагностики сифилиса следующих реакций:

- Микрореакция преципитации (МР) с кардиолипидным антигеном.
- Иммуноферментный анализ (ИФА).
- Реакция пассивной гемагглютинации (РПГА).
- Реакция иммунофлюоресценции (РИФ) в модификациях.
- Комплекс серологических реакций на сифилис (КСР), состоящий из реакции связывания комплемента (РСК) с трепонемным и кардиолипидным антигенами и МР.
- Реакция иммобилизации бледных трепонем (РИТ).

При этом нетрепонемные тесты (МР и РСК с кардиолипидным антигеном) используются лишь как отборочные, в то время как трепонемные тесты служат для подтверждения их результатов. Трепонемные тесты обладают более высокими чувствительностью (РИФ) и специфичностью (РИФ, РИТ), но технически сложны, поэтому их применение ограничено рамками специализированных учреждений. Реакции с кардиолипидным антигеном при простоте их постановки, относительной дешевизне, удобстве для исследования большого количества образцов имеют существенное ограничение – низкую чувствительность при первичном, третичном и позднем латентном сифилисе, а также наличие ложноположительных результатов [5]. По имеющимся литературным данным чувствительность кардиолипидных тестов при первичном сифилисе, например, составляет около 70% [6]. Высокий процент ложноположительных результатов кардиолипидные тесты дают при обследовании беременных женщин, по некоторым данным – до 27% от общего количества положительных результатов [7]. Кроме того, ложноположительные результаты могут быть вызваны заболеваниями соединительной ткани (такими как системная красная волчанка), диабетом, возрастными изменениями, онкологическими заболеваниями и другими [8].

Трепонемные тесты (РИФ и, особенно, РСК) также могут давать ложноположительные результаты, обусловленные перекрёстными реакциями. Показано, например, что в РИФ они могут быть связаны

с боррелиозом, генитальным простым герпесом [9, 10]. Кроме того, причиной ложноположительного результата может быть наличие в исследуемом образце антител к общим антигенам спирохет, так как некоторые спирохеты являются частью нормальной человеческой флоры [11].

Существенным недостатком всех перечисленных классических тестов (в отечественном варианте) является то, что они не унифицированы. Приобретая или получая различные компоненты, необходимые для проведения анализа, специалисты диагностической лаборатории вынуждены самостоятельно «подтитровывать» их, подбирать соответствующие контрольные сыворотки и т.д. При этом точность проводимого анализа зависит от множества факторов, начиная от качества приобретённых реагентов и заканчивая уровнем квалификации персонала лаборатории.

Единственный путь преодоления данного недостатка – выпуск коммерческих тест-систем. За рубежом в медицинской практике давно и успешно используются коммерческие наборы для постановки реакций RPR и VDRL (аналоги нашей МР), а также FTA-ABS (аналог РИФаБс). Совсем недавно появилась первая отечественная коммерческая тест-система для определения антитрепонемных антител в реакции иммунофлуоресценции в модификациях РИФаБс и РИФ200 (ЗАО «Вектор-Бест»), которая находится на регистрации в МЗ РФ.

В настоящее время в отечественной практике, кроме перечисленных выше реакций, широко применяются и другие тесты, в частности – реакции, основанные на гемагглютинации (реакция пассивной гемагглютинации (РПГА) или её зарубежные аналоги – the T. pallidum hemagglutination assay (ТРНА) и др.), а также иммуноферментный анализ (ИФА). Являясь специфическими трепонемными тестами и обладая высокими чувствительностью и специфичностью, они легко выполняются, не требуют высокой профессиональной подготовки персонала и могут быть использованы при обследовании большого количества образцов. За рубежом эти тесты широко и успешно используются для скрининга и диагностики сифилиса. Однако многие исследователи отмечают более низкую по сравнению с РИФаБс чувствительность РПГА на ранних стадиях заболевания [1;2]. Еще одним недостатком этого метода, по сравнению с ИФА, является субъективность в оценке результатов. Попытки автоматизировать учет результатов приведут к снижению доступности

этого теста для мелких лабораторий. По чувствительности и специфичности проводимого анализа ИФА-тесты наиболее приближены к РИФабс, которая до сих пор считается «золотым стандартом» при испытании новых методов диагностики сифилиса. В то же время, работа с ИФА-тест-системами не требует высокой профессиональной подготовки специалистов, так как диагностические наборы, предлагаемые производителями, укомплектованы всеми материалами и реагентами, необходимыми для постановки реакции, в оттитрованном виде. Кроме того, все ИФА-тест-системы предусматривают автоматический учёт результатов, что исключает субъективность в их оценке. Относительная дешевизна, простота постановки реакции, удобство использования для обследования большого количества образцов позволяют применять тест-системы для серодиагностики сифилиса методом ИФА как скрининговые, обладающие, в то же время, высокими диагностическими качествами.

Приказ № 87 предписывает применение МР лишь в качестве отборочного теста при обследовании населения на сифилис, а в количественном варианте и для контроля эффективности лечения, заменив ею количественную постановку РСК с кардиолипидным антигеном. В качестве отборочных тестов для профилактического обследования населения можно также использовать КСР и специфические трепонемные реакции – ИФА и РПГА.

РИТ, РИФ, ИФА и РПГА, являясь высокочувствительными и высокоспецифичными реакциями, применяются в качестве диагностических подтверждающих тестов.

При обследовании доноров необходимо использовать комплекс серологических реакций, включающий МР и РСК либо МР и ИФА, либо МР и РПГА.

При диагностике скрытого сифилиса необходимо осуществлять постановку двух специфических тестов одновременно.

Поскольку ИФА и РПГА являются более высокочувствительными, специфическими и воспроизводимыми тестами, которые можно использовать в качестве отборочных и подтверждающих тестов, предполагается осуществить до 2006 года замену комплекса серореакций (КСР) вышеуказанными реакциями при диагностике сифилиса [12].

## ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ИФА

В основе метода ИФА лежит следующий принцип: на твердофазном носителе (в отечественных тест-системах и в большинстве тест-систем зарубежного производства в качестве носителя используется поверхность лунок полистиролового планшета) фиксируется антиген возбудителя инфекции, антитела к которому необходимо выявить. Антиген, иммобилизованный на поверхности твёрдого носителя, принято называть иммуносорбентом. Как правило, в состав набора тест-системы входит уже готовый иммуносорбент. Схема иммунологической реакции, которая происходит в лунках планшета при проведении анализа, представлена на рис. 1. В ходе инкубации иммуносорбента с испытуемой сывороткой при наличии в ней антител к данному антигену происходит их связывание в комплекс «антиген–антитело». После удаления несвязавшихся иммуноглобулинов следует инкубация с мечеными ферментом антителами к иммуноглобулинам человека (конъюгатом), в ходе которой

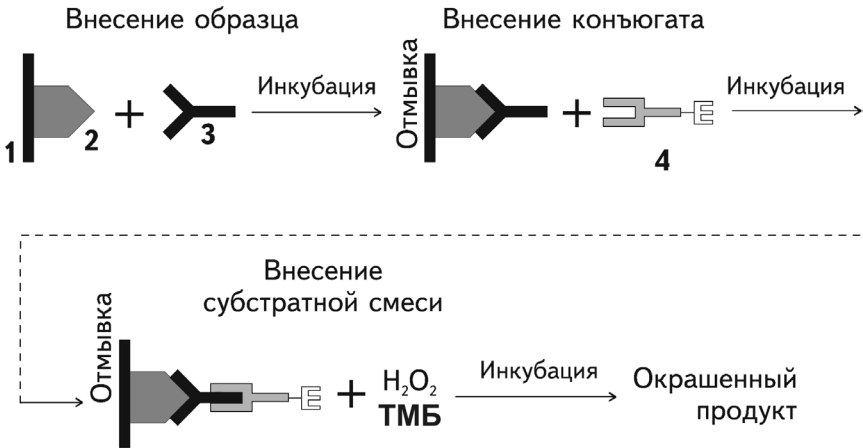


Рис. 1. Схема иммуноферментного анализа на иммуноглобулины класса G (IgG).

- 1 – носитель (поверхность лунки планшета);
- 2 – антиген;
- 3 – специфические IgG сыворотки крови;
- 4 – моноклональные анти-IgG-антитела, меченые пероксидазой хрена (конъюгат).



на поверхности носителя происходит присоединение к имеющимся комплексам «антиген–антитело» антител, меченых ферментом (в качестве фермента чаще всего используется пероксидаза хрена). После удаления несвязавшегося конъюгата в ходе инкубации с раствором субстрата происходит взаимодействие фермента с субстратом, в результате чего развивается цветная реакция, интенсивность которой зависит от количества связанных сывороточных антител (в случае использования пероксидазного конъюгата в качестве субстрата применяют перекись водорода в сочетании с ортофенилендиамином (ОФД), 5-аминосалициловой кислотой (5-АСК) или тетраметилбензидином (ТМБ)). Результат реакции оценивается спектрофотометрически с выводом цифровых данных, что исключает субъективность оценки. Некоторые иммуноферментные тест-системы допускают визуальную оценку результатов, что может быть полезно при отсутствии соответствующего оборудования.

Конъюгат, применяемый в таких тест-системах, может быть получен на основе поликлональных антивидовых антител (например, кроличьи антитела против иммуноглобулинов человека) или на основе поли- или моноклональных антител, направленных против человеческих иммуноглобулинов определённого класса (M, G, A). В зависимости от того, какие антитела использованы, тест-система будет выявлять в исследуемом образце или любые специфические антитела независимо от их класса, или антитела лишь определённого класса (например, только IgG или только IgM).

По такому принципу построена основная масса отечественных ИФА-тест-систем для диагностики различных инфекций (ВИЧ-инфекция, вирусные гепатиты, цитомегаловирусная, герпесная, токсоплазменная и др. инфекции), в том числе и сифилиса.

В то же время, существуют тест-системы, в которых использована несколько другая схема (рис. 2) – ИФА с фиксированными антителами или «ловушка для антител» (Antibody capture ELISA). Она основана на том, что на твердофазном носителе фиксируются аффинно очищенные антитела, специфически реагирующие с человеческими антителами определённого класса (IgM, IgG или IgA). В результате инкубации с тестируемой сывороткой антитела этого класса связываются с носителем. Наличие среди них антител, специфических для какого-либо антигена (например, трепонемного), выявляется в ходе инкубации с этим антигеном, меченым ферментом. При инкубации с субстратом в том случае, когда в исследуемом

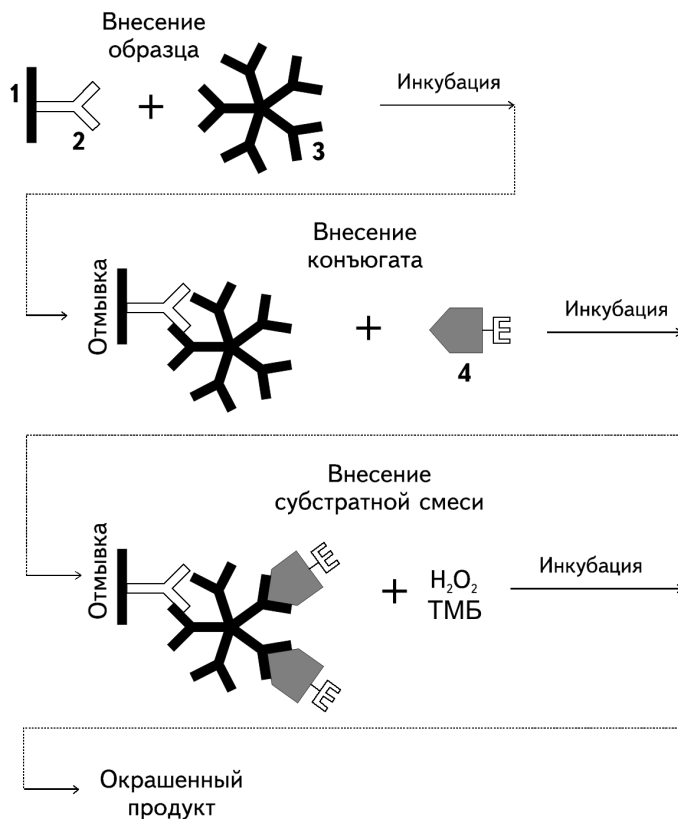


Рис. 2. Схема иммуноферментного анализа на иммуноглобулины класса М (IgM).

- 1 – носитель (поверхность лунки планшета);
- 2 – моноклональные анти-IgM-антитела;
- 3 – IgM сыворотки крови;
- 4 – антиген, меченый пероксидазой хрена (конъюгат).

образце присутствовали специфические антитела, развивается окрашивание раствора. По такой схеме построены, например, коммерческие зарубежные тест-системы «Captia Syph G EIA», «Captia Syph M EIA» для выявления антител, соответственно, классов G и M к возбудителю сифилиса. На отечественном рынке диагностической продукции также существуют иммуноферментные тест-системы для выявления антитрепонемных иммуноглобулинов класса M,

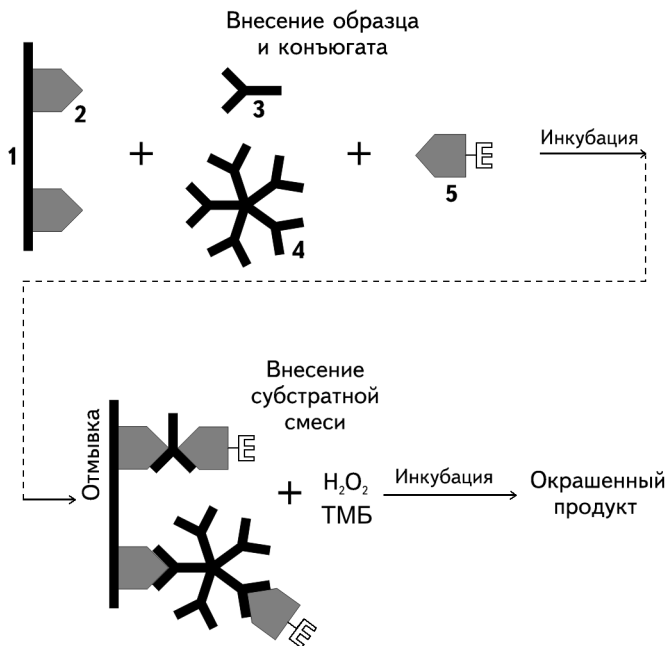


Рис. 3. Схема иммуноферментного анализа на суммарные антитела.

- 1 – носитель (поверхность лунки планшета);
- 2 – антиген;
- 3 – специфические IgG;
- 4 – специфические IgM;
- 5 – антиген, меченый пероксидазой хрена (конъюгат).

работающие по такой схеме, например, тест-система «РекомбиБест антипаллидум–IgM –стрип» производства ЗАО «Вектор-Бест».

Третья схема ИФА (рис. 3) используется в некоторых тест-системах для выявления суммарных антител, специфических для определенного антигена, независимо от их класса. Её суть заключается в том, что специфические сывороточные антитела одновременно взаимодействуют с антигеном, зафиксированным на твердофазном носителе, и с тем же антигеном, меченым ферментом, при совместной инкубации сыворотки и конъюгата.

В зависимости от того, какие антигены используются, все иммуноферментные тест-системы для выявления антител подразделяются на:

- лизатные – в которых в качестве антигена, иммобилизованного на твердой фазе или входящего в состав конъюгата, используется нативный антиген (лизированный или обработанный ультразвуком возбудитель инфекции, полученный в культуре);
- рекомбинантные – в которых используются полученные генно-инженерным способом белки – аналоги определенных белковых антигенов возбудителя;
- пептидные – использующие химически синтезированные фрагменты белков.

Общее направление развития ИФА-диагностикумов – это направление от лизатных тест-систем, которые принято называть тест-системами первого поколения, к рекомбинантным и пептидным.

Основными факторами, определяющими качество лизатной тест-системы, являются антигенная природа возбудителя и качество очистки лизата от посторонних примесей. В случае сифилиса первый фактор имеет особое значение. Антигенная природа бледной спирохеты такова, что наряду со специфическими, свойственными только ей, антигенами, существуют и такие, которые гомологичны антигенам других спирохет, антитела к которым могут присутствовать в организме человека. В трепонемном лизате представлены как одни антигены, так и другие, что может послужить причиной ложноположительных результатов при работе с лизатными тест-системами на сифилис. Так как антиген, используемый в таких тест-системах, аналогичен антигену, применяемому в РСК или РИФ, природа получаемых ложноположительных результатов та же, что и в указанных тестах.

Технология получения рекомбинантных белков позволяет получить в достаточно чистом виде аналог любого отдельного антигена. Для создания высококачественной рекомбинантной тест-системы необходимо из всего антигенного многообразия возбудителя выбрать антигены, которые отвечали бы следующим требованиям:

- они должны быть высоко иммуногенными, т.е. в организме инфицированного человека должны вырабатываться антитела к этим антигенам в достаточно большом количестве;
- антитела к этим антигенам должны присутствовать в определяемых количествах в крови больного в течение всего заболевания;

- эти антигены должны быть высоко специфичными, т.е. характерными лишь для данного возбудителя и не дающими перекрестных реакций с антителами другой природы.

Кроме того, большое значение имеет качество очистки рекомбинантных белков.

В идеальном случае (при выполнении всех указанных требований) возможно получение рекомбинантной тест-системы практически со 100%-ной специфичностью при высокой чувствительности. На практике этого не всегда удаётся достичь, однако специфичность лучших рекомбинантных тест-систем приближается к 100%.

## ИММУНОФЕРМЕНТНЫЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ СИФИЛИСА

В настоящее время Министерством здравоохранения России рекомендованы к применению в медицинской практике 10 иммуноферментных тест-систем для диагностики сифилиса отечественного производства:

- «РекомбиБест антипаллидум», ЗАО «Вектор-Бест», п. Кольцово, Новосибирская обл.;
- «РекомбиБест антипаллидум – суммарные антитела», ЗАО «Вектор-Бест», п. Кольцово, Новосибирская обл.;
- «ИФА–АНТИ–LUIS», НПО «Диагностические системы», г. Нижний Новгород;
- Тест-система иммуноферментная для выявления антител к возбудителю сифилиса (*Treponema pallidum*) на основе рекомбинантных белков, БТК «Биосервис», г. Москва;
- «ЛюисСкрин», ЗАО «Ниармедик» и АЗОТ «Диаклон», г. Москва;
- «ЭКОлаб–антипаллидум–скрин», ТОО «ЭКОлаб», г. Электрогорск, Московская обл.;
- «ИФА–анти-трепонема», ЗАО «Вектор-Майстар», п. Кольцово, Новосибирская обл.;
- «АТ–Треп.–ИФТС», ГП «Аллерген», г. Ставрополь;
- «Сиф–Ат–№1, 2», ТОО НИИ «Аквапаст», г. Санкт-Петербург;
- «ИФАанти-СИФ», НПК «Препарат», г. Нижний Новгород.

Все эти тест-системы прошли государственные испытания в Центральном научно-исследовательском кожно-венерологическом институте (ЦНИКВИ), имеют утверждённую Фармакопейным комитетом Минздрава РФ нормативно-техническую документацию и Приказом № 87 Министерства здравоохранения рекомендованы к практическому применению.

Большинство из перечисленных тест-систем являются рекомбинантными. В них в качестве специфического антигена, иммобилизованного на поверхности планшета, используются рекомбинантные белки – аналоги отдельных антигенов *Treponema pallidum*. Две тест-системы («АТ–Треп.–ИФТС» и «ЛюисСкрин») – лизатные. Основу тест-системы «Сиф–Ат–№1, 2» составляют химически синтезированные пептиды.

Часть перечисленных тест-систем предназначена для выявления трепонемоспецифических иммуноглобулинов класса G. Однако

следует отметить, что благодаря высокой чувствительности, присущей иммуноферментному методу, позволяющей выявлять антитела в низкой концентрации, такие тест-системы не уступают в сроках диагностирования заболевания тем методам серодиагностики сифилиса, которые выявляют суммарные антитела (РСК, РПГА), но при их более высокой концентрации.

Безусловно, этот перечень далеко не полный. С каждым годом список разрешенных к применению тест-систем для серодиагностики сифилиса растет и видоизменяется. Сегодня на отечественном рынке присутствуют зарегистрированные иммуноферментные тест-системы для выявления иммуноглобулинов класса М, которые позволяют диагностировать приобретенную инфекцию в наиболее ранние сроки (IgM появляются уже через 2 недели после заражения, тогда как IgG – обычно через 4 недели). Выработка IgM в значительных количествах происходит не только при первичном заражении, но и при рецидивах и реинфекции, поэтому персистенцию IgM рассматривают как показатель наличия в организме вирулентного возбудителя [13]. Снижение титра и исчезновение IgM являются критерием эффективности терапии. Но особенно ценны такие тест-системы для диагностики врожденного сифилиса. Серологическое подтверждение врожденного сифилиса в ранние сроки после рождения ребёнка возможно лишь при выявлении в его крови возбудителя инфекции или специфических антирепонемных IgM, которые, в отличие от IgG, не передаются от матери ребёнку, и их присутствие свидетельствует о наличии возбудителя инфекции в организме самого ребёнка [13].

В настоящее время утверждены и разрешены к применению отечественные тест-системы для выявления специфических IgM: «ЛюисСкрин» (ЗАО «Ниармедик» и АЗОТ «Диаклон») и «РекомбиБест антипаллидум-IgM-стрип» (ЗАО «Вектор-Бест»).

Министерством здравоохранения и медицинской промышленности России, с учётом мировой и отечественной практики, рекомендуется более широкое использование ИФА как в скрининговых исследованиях (в том числе при проверке донорской крови), так и в диагностических целях. В последнем случае он может быть использован как специфический подтверждающий тест наравне с РИФ, а рекомбинантные ИФА-тест-системы могут быть особенно ценны для распознавания ложноположительных результатов, по-

лучаемых в тестах, использующих нативный трепонемный антиген. Рекомендуется замена общепринятого КСР на сифилис комплексом ИФА с МР преципитации с кардиолипидным антигеном.

Иммуноферментные тест-системы для диагностики сифилиса выпускаются в виде многокомпонентных наборов, содержащих все реагенты, необходимые для проведения анализа, и инструкцию по их применению. В каждом диагностическом наборе содержатся положительный и отрицательный контрольные образцы сывороток, которые позволяют оценить качество набора и правильность проведения анализа. Оптическая плотность (ОП) в лунках с контрольными образцами должна соответствовать нормам, предусмотренным нормативно-технической документацией (НТД) на данную тест-систему и указанным в инструкции по применению диагностического набора. Только в этом случае набор считается пригодным к использованию, а полученные результаты состоятельными. К каждой партии наборов производителем должен прилагаться паспорт ОБТК на данную серию наборов, в котором отражается её соответствие требованиям НТД и основные контрольные показатели, полученные при выпуске тест-системы. Значительные отклонения получаемых контрольных значений ОП от паспортных свидетельствует либо об изменении качества наборов, либо о допущенных при постановке анализа ошибках.

Хотя все ИФА-тест-системы для диагностики сифилиса построены по единой схеме, каждая тест-система имеет свои особенности. Различия могут заключаться в степени рабочего разведения образца (1:10, 1:100, 1:200), в подходе к определению критической оптической плотности (ОП<sub>крит</sub> или Cut'off), по отношению к которой оценивается результат реакции. Предоставляемые аналитические возможности отдельных тест-систем также могут быть различны (например, т/с «РекомбиБест антипаллидум» производства ЗАО «Вектор-Бест» позволяет исследовать не только сыворотку или плазму крови, но и ликвор). Кроме того, различаться могут составы и способы приготовления используемых растворов, методические детали проведения анализа (число промывок планшета на каждой стадии, продолжительность инкубаций, условия хранения рабочих растворов и т.д.), поэтому при работе с любой тест-системой необходимо строгое соблюдение требований инструкции по её применению.

В то же время существуют общие требования, соблюдение которых способно снизить вероятность получения неправильных резуль-



татов анализа (см. раздел «Требования и рекомендации, соблюдение которых повышает достоверность результатов анализа»).

При оценке результатов ИФА необходимо помнить о существовании «серой зоны» – зоны сомнительных результатов, требующих дополнительных исследований. Если в инструкции по применению тест-системы рамки «серой зоны» особо не оговорены, «серой зоной» следует считать интервал  $ОП_{крит} \pm 10\%$ . Те значения ОП, которые лежат выше этой зоны, соответствуют положительному результату, те, которые ниже, – отрицательному. В зависимости от конкретных условий и конкретных задач исследования рамки «серой зоны» могут быть расширены (например, до 20%). Это имеет смысл при скрининговых исследованиях, особенно при скрининге донорской крови, а также при использовании оборудования с повышенной ошибкой измерения.

Образцы, для которых получен сомнительный результат (соответствующая им ОП находится в пределах «серой зоны») подлежат повторному анализу. Рекомендуется также повторить анализ образцов, давших положительный результат. При использовании ИФА в качестве скринингового теста воспроизводящийся сомнительный результат, так же как и положительный результат, является основанием для направления на обследование к дерматовенерологу и для исследования сыворотки крови другими методами. При этом необходимо иметь ввиду высокую чувствительность ИФА – часто подтвердить результат можно только в РИФабс, а при использовании других методов (МР, РСК) – лишь через некоторое время (в случае IgG – примерно через 1 неделю, в случае суммарных антител – через 1—2 недели). При использовании ИФА в качестве диагностического теста в случае получения воспроизводящегося сомнительного результата рекомендуется повторить анализ с новой порцией сыворотки крови, взятой через 3—7 дней. Относительное возрастание оптической плотности свидетельствует о ранней стадии инфекции; сохранение её на том же уровне возможно в двух случаях: сифилис в анамнезе, когда сомнительный результат связан с наличием в сыворотке крови остаточных антител, или ложноположительный результат.

Образец, давший положительный результат, может быть разтитрован – при этом ИФА ставят с последовательными 2-кратными разведениями образца, начиная с рабочего разведения сыворотки в данной тест-системе. За титр антитрепонемных антител принимают

наибольшее разведение сыворотки крови, дающее положительный результат. Титр является количественным показателем уровня специфических антител в данном образце и степени его позитивности. Он обозначается выражением, характеризующим степень разведения испытуемой сыворотки: 1:10, 1:20, 1:40 и т.д. (в тест-системе с рабочим разведением сыворотки 1:10) или 1:100, 1:200, 1:400 и т.д. (в тест-системе с рабочим разведением сыворотки 1:100). Прямое титрование образца значительно увеличивает стоимость анализа. В целях сокращения финансовых и трудовых затрат отдельные производители предлагают использовать сокращенную схему определения титра антител. Так в тест-системе «РекомбиБест антипаллидум» производства ЗАО «Вектор-Бест» возможно определение титра антител с использованием коэффициента позитивности (КП). Для этого положительный образец анализируется в двух разведениях – 1:10 и 1:100. Затем коэффициент позитивности вычисляется по формуле:

$$\text{КП} = \text{ОП}_{\text{обр.}(1:100)} / \text{ОП}_{\text{крит.}}$$

где ОП<sub>обр.(1:100)</sub> – оптическая плотность образца в разведении 1:100;  
 ОП<sub>крит.</sub> – критическая оптическая плотность.

Соответствие между полученным значением КП и титром антител определяется по таблице:

<b>Значения КП</b>	до 0,3	0,31–0,6	0,61–1,2	1,21–2,4	2,41–4,8	4,81–9,6	Выше 9,61
<b>Титр образца</b>	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280 и выше

Определение уровня специфических антител имеет значение при наблюдении за динамикой инфекционного процесса и при оценке эффективности противосифилитического лечения. Эффективным следует считать снижение титра антител не менее чем в 4 раза. Быстрое снижение титра антител при начальном его высоком значении свидетельствует об успешности терапии. Однако при этом антитела в низком титре могут сохраняться длительное время (до года и более), полная негативация результатов в ИФА наступает позднее по сравнению с МР или РСК.

Учитывая, что каждая иммуноферментная тест-система для диагностики сифилиса имеет свои особенности и титр антител

в одном и том же образце может быть различным в разных тест-системах, необходимо исследование сыворотки крови каждого больного в динамике проводить в одной тест-системе.

Практически все отечественные ИФА-тест-системы для диагностики сифилиса выпускаются в нескольких вариантах комплектации. Как правило, это: вариант для одновременного тестирования большого количества образцов, в котором использованы цельные 96-луночные планшеты, и вариант со стрипированными (разборными) планшетами, позволяющий делать несколько независимых постановок ИФА меньшего объёма.

## РЕКОМЕНДУЕМЫЙ АЛГОРИТМ СЕРОЛОГИЧЕСКОГО ОБСЛЕДОВАНИЯ НА СИФИЛИС

Имеющийся на рынке широкий выбор иммуноферментных тест-систем, позволяющих выявлять как суммарные антитела, так и антитела определенных классов, требует осознанного подхода и рационального использования предлагаемых тестов для получения наиболее объективной серологической картины сифилитического процесса и эффективной серодиагностики сифилиса. Рассмотрим алгоритм серологического обследования на сифилис с использованием метода иммуноферментного анализа на примере тест-систем производства ЗАО «Вектор-Бест».

Иммуноферментные тест-системы для выявления суммарных антител, как правило, выявляют антитела одновременно к нескольким антигенам, с одной стороны, с другой – они выявляют антитела разных классов, которые вырабатываются в различные сроки от момента инфицирования. Такие системы нужно использовать для проведения скрининговых исследований на сифилис и качественной оценки образцов. Результат анализа следует расценивать только как «положительный» или «отрицательный». Титрование образцов в таких тест-системах не имеет практического смысла, так как в разные периоды инфекционного процесса будут определяться антитела к различным антигенам, кроме того, эти антитела будут принадлежать к различным классам. В этом случае концентрация суммарных антител может сохраняться на одном уровне в течение длительного промежутка времени, и исследователь не сможет получить нужную информацию о ходе инфекционного процесса.

При отрицательном результате скринингового теста обследование пациента с существующим риском недавнего заражения сифилисом следует повторить через 1—2 недели. Образцы, давшие положительный результат в тест-системе для выявления суммарных антител, необходимо проанализировать в системах, выявляющих конкретные классы иммуноглобулинов (IgG и/или IgM). Положительный результат на IgG или IgM является подтверждением положительного результата, полученного в скрининговом тесте, и свидетельствует о наличии специфических антитрепонемных антител. Образцы, содержащие IgG и/или IgM, подлежат титрованию, если это предусмотрено инструкцией по применению к иммуноферментной тест-системе. Определение титров антител в конкретном

## Схема обследования на сифилис методом ИФА



образце позволяет в дальнейшем наблюдать больного в динамике и контролировать эффективность проведенного лечения.

Пациенты, в сыворотке которых при положительном результате исследования на суммарные антитела ни IgG, ни IgM не обнаружены, подлежат обязательному наблюдению в динамике. Через 5—7 дней у них следует взять новую порцию крови и повторить исследование на сифилис по полной схеме. В случае воспроизведения положительного результата в исследовании на суммарные антитела при одновременном подтверждении его в каком-либо из двух тестов (IgG или IgM) можно говорить о наличии специфических антител к бледной трепонеме и ранней стадии сифилитического процесса. Если же положительный результат в тест-системе для выявления суммарных антител не удалось подтвердить ни в одной из систем, выявляющих отдельные классы иммуноглобулинов (IgG или IgM), то такой результат либо является ложноположительным, либо свидетельствует о сифилисе в анамнезе. Образец, полученный от такого пациента, необходимо дополнительно исследовать в других специфических реакциях (РИФабс, РПГА, РИТ). Только

комплексная оценка всех полученных результатов в совокупности с клинической картиной позволит сделать правильные выводы.

### ИФА-диагностика сифилиса

Варианты	Суммарные антитела	IgM	IgG	Интерпретация результатов ИФА
1	+	+	–	Ранняя стадия сифилиса (конец инкубационного периода — начало первичного серонегативного)
2	+	+	+	Манифестный сифилис (первичный серопозитивный, вторичный свежий, вторичный рецидивный)
3	+	–	+	Скрытый сифилис либо пролеченный
4	+	–	–	Сифилис в анамнезе (сероконтроль) или неспецифическая реакция в т/с на суммарные а/т

## ОСОБЕННОСТИ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ВРОЖДЕННОГО СИФИЛИСА

Диагностика врожденного сифилиса у детей длительное время представляла достаточно сложную задачу. Классические методы серодиагностики сифилиса, как правило, позволяют выявлять либо суммарные антитела к *Treponema pallidum*, либо только иммуноглобулины G.

Поскольку IgG могут свободно проникать через плаценту, то положительный результат в классических серологических реакциях не может служить основанием для постановки диагноза врожденного сифилиса. Безусловно, что в таком случае необходимо использовать тесты, позволяющие выявлять иммуноглобулины M. Как уже говорилось, в силу своих более крупных по сравнению с IgG размеров иммуноглобулины M не проникают через плаценту, следовательно, не могут передаваться от матери к ребенку. Наличие IgM свидетельствует о присутствии в организме активного возбудителя и должно служить основанием для постановки диагноза врожденного сифилиса.

Однако от того, на каком сроке беременности произошло заражение плода, будет зависеть, какие серологические маркеры сифилитической инфекции можно определить в крови новорожденного.

- Инфицирование плода произошло во второй половине беременности, мать не состояла на диспансерном учете по беременности, не получала лечения ни на себя, ни на ребенка. Новорожденный, как правило, имеет клинические симптомы сифилитической инфекции. Результаты серологического исследования будут следующими: суммарные антитела – положительные, IgG – положительные, IgM – положительные. В случае если мать состояла на учете и получила адекватное противосифилитическое лечение, но при этом у ребенка все же имеются клинические симптомы врожденного сифилиса, существует вероятность получения отрицательного результата при обследовании такого новорожденного на наличие IgM.
- Заражение плода произошло на ранних сроках беременности. Независимо от того, получила ли мать полный курс на себя и на ребенка либо не получала лечения вовсе, достаточно велика вероятность отрицательного результата при тестировании новорожденного на наличие специфических IgM. В таком случае

желательно провести параллельное исследование образцов сыворотки матери и ребенка на наличие IgG с определением титров антител. Если концентрация иммуноглобулинов G у ребенка равна или меньше, чем у матери, то антитела, которые определяются у ребенка, являются пассивно перенесенными через плаценту материнскими антителами. Более высокие, по сравнению с матерью, титры IgG свидетельствуют о том, что у ребенка идет синтез собственных иммуноглобулинов G, и, значит, ребенок инфицирован. Согласно рекомендациям американского центра по контролю за заболеваниями (CDC) в этом случае титр IgG у ребенка должен не менее чем в 4 раза превышать аналогичный показатель у матери.

- Инфицирование произошло в родах. В этом случае на момент рождения иммуноглобулинов M в крови ребенка не обнаруживается, а положительные результаты при обследовании на наличие суммарных антител и иммуноглобулинов G обусловлены трансплацентарно перенесенными материнскими IgG. У такого ребенка требуется контролировать серологические маркеры в динамике.

Таким образом, присутствие в крови ребенка антитрепонемных иммуноглобулинов M свидетельствует о наличии у него врожденного сифилиса и требует проведения специфического лечения по рекомендованным схемам. Отсутствие IgM не является основанием для исключения диагноза «врожденный сифилис», а требует дополнительного обследования матери и ребенка, наблюдения за ними в динамике и, с учетом совокупности результатов серологических исследований и клинической картины, выбора соответствующей тактики ведения пациентов.

С целью определения ценности выявления IgM для диагностики врожденного сифилиса нами были проведены исследования по выявлению трепонемоспецифических антител у пациентов детского отделения МКВД № 1 г. Новосибирска. Было обследовано 42 ребенка в возрасте от 7 дней до 3 лет с диагнозами: 6 – сифилис врожденный ранний активный (СВРА), 16 – сифилис врожденный ранний скрытый (СВРС), 20 – контрольная группа (здоровые дети и дети от инфицированных матерей, получавшие превентивное лечение). Комплексное обследование методом ИФА проводилось на коммерческих тест-системах производства ЗАО «Вектор-Бест». Параллельно дети обследовались в классических серологических тестах на сифилис.



Таблица 1

**Выявление трепонемоспецифических антител  
в различных группах обследованных детей**

Группы обследованных	Количество в группе	Результаты ИФА		
		Суммарные антитела	IgG	IgM
СВРА	6	6(100%)* 0	6(100%) 0	5(83,3%) 1(16,7%)
СВРС	16	16(100%) 0	16(100%) 0	12(75%) 4(25%)
Контрольная	20	0 20(100%)	0 20(100%)	0 20(100%)

\* здесь и далее в числителе указано количество образцов, для которых получен положительный результат, в знаменателе - число образцов, давших отрицательный результат.

У детей контрольной группы ни в одном случае не было выявлено трепонемоспецифических антител. У 5 детей (83,3%) с СВРА, матери которых не состояли на учете и не получали специфического лечения, были выявлены трепонемоспецифические IgG и IgM. Один ребенок (16,7%) этой группы, мать которого до родов получила полный курс противосифилитического лечения на себя и на ребенка, дал положительный результат по IgG и отрицательный – по IgM. 12 детей (75%) с СВРС имели антитела обоих классов, у 4 детей (25%), были обнаружены IgG, но не обнаружены IgM.

Что касается концентрации иммуноглобулинов М в положительных образцах, получаемых от обследуемых детей, то она чаще всего невысокая. Вероятно, это определяется, состоянием иммунной системы в целом, с одной стороны, и стадией инфекционного процесса, с другой. Безусловно, это не единственные факторы, влияющие на интенсивность иммунного ответа. Отдельные исследователи выражают сомнение в зрелости иммунной системы детей первого года жизни и, как следствие, в возможности полноценного иммунного ответа на сифилитическую инфекцию. Однако существуют примеры, демонстрирующие возможность мощного иммунного ответа у таких детей.

**Приведём один из них:** больная Г.А. родилась 27.09.2003 г. Мать в родах имела положительные результаты серологических тестов на сифилис. Вместе с ребенком исчезла из поля зрения врачей. Специфического лечения девочка не получала. Мать обратилась к врачам в ноябре 2003 г. У ребенка яркие клинические симптомы врожденного сифилиса. Результаты серологического обследования в ИФА: суммарные антитела – положительный, IgG – положительный, титр – 1/5120, IgM – положительный, титр – 1/10240. Ребенок получил полный курс лечения по схеме раннего врожденного сифилиса. Результаты клинико-серологического контроля: 18.02.04 (спустя 3 мес. после лечения) – суммарные антитела – положительный, IgG – положительный, титр – 1/640, IgM – отрицательный; 28.04.04 (спустя 5 мес) – суммарные антитела – положительный, IgG – положительный, титр – 1/80, IgM – отрицательный. В настоящее время больная состоит на диспансерном учете.

Для обобщений и выводов, касающихся особенностей протекания сифилитической инфекции у детей, требуются дальнейшие исследования с целью получения достоверных статистических данных. Надеемся, что такие исследования будут продолжены и в других регионах России.

Авторы выражают благодарность **Вылегжаниной Ольге Анатольевне**, заведующей детским отделением КВД № 1 г. Новосибирска, за сотрудничество и любезно предоставленные данные, которые были использованы при написании этого раздела.

## СРАВНЕНИЕ ИФА С ДРУГИМИ МЕТОДАМИ СЕРОДИАГНОСТИКИ СИФИЛИСА

В данном разделе представлены результаты исследований, целью которых было сравнение иммуноферментного анализа на примере тест-системы «РекомбиБест антипаллидум» с другими методами серодиагностики сифилиса.

Исследования были проведены на базе серологической лаборатории КВД № 1 города Новосибирска. В работе использовались образцы сыворотки крови, принадлежавшие лицам в возрасте от 10 дней до 70 лет с подозрением на сифилис (по клиническим данным или положительному результату серологических реакций) или имевшим контакты с больными сифилисом.

На первом этапе работы 584 образца сыворотки крови параллельно исследовали с использованием следующих тестов:

- микрореакция преципитации с кардиолипиновым антигеном (МР);
- реакция связывания комплемента с трепонемным и кардиолипиновым антигенами (РСК);
- реакция иммунофлюоресценции (РИФ) в модификации «РИФ с абсорбцией»;
- иммуноферментный анализ (ИФА) с применением тест-системы «РекомбиБест антипаллидум».

Учитывая тот факт, что РИФ считается наиболее чувствительным и специфичным из применяемых в отечественной медицине методов серодиагностики сифилиса, результаты анализа, полученные другими методами, оценивались по совпадению с результатами РИФ. Эти данные приведены в таблице 2.

Как видно из таблицы, из всех использованных серологических тестов наиболее приближенным к РИФ по диагностическим качествам является ИФА (совпадение результатов анализа – 95%), в то время как МР и РСК существенно ему уступают (81% и 85% совпадения, соответственно).

На основании тех случаев, когда достоверно был диагностирован сифилис в той или иной форме (по клиническим данным с серологическим подтверждением в РИФ), было проведено сравнение чувствительности использованных серологических тестов при различных формах сифилиса (см. табл. 3).

ИФА-тест-система «РекомбиБест антипаллидум» продемонстрировала 100%-ную чувствительность при вторичной и латентной

Таблица 2

**Сравнение ИФА с классическими методами  
серодиагностики сифилиса  
(совпадение результатов с результатами РИФ)**

	РИФ	МР	РСК	ИФА
Образцы, положительные в РИФ	398	289 109	331 67	374 24
Образцы, отрицательные в РИФ	186	182 4	168 18	179 7
% совпадения с РИФ	100	81	85	95

Таблица 3

**Чувствительность ИФА и классических серологических  
тестов при различных формах сифилиса  
(в процентах от числа обследованных образцов)**

Форма заболе- вания Тест	Первичный сифилис (93 образца)	Вторичный сифилис (64 образца)	Латентный сифилис (18 образцов)
МР	83%	91%	94%
РСК	91%	95%	100%
ИФА	99%	100%	100%

формах заболевания. Её чувствительность при первичном сифилисе составила 99%. Чувствительность МР и РСК существенно ниже, особенно при первичном сифилисе (83% и 91%, соответственно).

На следующем этапе работы кроме перечисленных выше методов был использован тест специфической гемагглютинации (ТРНА, *Treponema pallidum hemagglutination assay*) (тест-система

Таблица 4

**Совпадение результатов, полученных разными методами  
серодиагностики сифилиса, с результатами РИФ**

	РИФ	ТРНА	МР	РСК	ИФА
Образцы, положительные в РИФ	69	58 11	41 28	57 12	61 8
Образцы, отрицательные в РИФ	55	52 3	55 0	49 6	55 0
% совпадения с РИФ	100	89	77	85	94

«SYPHILIA ТРНА» фирмы «SANOFI DIAGNOSTICS PASTEUR», Франция). Подобные тесты широко используются за рубежом для скрининга донорской крови и как подтверждающий тест.

124 образца сыворотки крови параллельно тестировали в МР, РСК, ИФА, РИФ и ТРНА. Результаты анализа, полученные в разных тестах, сопоставляли с результатами РИФ (табл. 4), ТРНА (табл. 5) и комплекса РИФ-ТРНА (табл. 6).

Наибольшую сходимость результатов с результатами РИФ, ТРНА и комплекса РИФ-ТРНА продемонстрировала иммуноферментная тест-система «РекомбиБест антипаллидум». Обращает на себя внимание тот факт, что два теста, РИФ и ТРНА, каждый из которых используется как подтверждающий тест, имеют сходимость результатов лишь 89%. Это лишний раз подтверждает, что не существует идеального теста на сифилис, и при постановке диагноза необходимо руководствоваться совокупностью клинических данных и результатов комплексного серологического обследования.

Представленные данные свидетельствуют о целесообразности включения ИФА как теста, обладающего высокими диагностическими качествами, в комплекс серологических реакций на сифилис. Кроме того, они наглядно демонстрируют существенные преиму-

Таблица 5

**Совпадение результатов, полученных разными методами  
серодиагностики сифилиса, с результатами ТРНА**

	ТРНА	РИФ	МР	РСК	ИФА
Образцы, положительные в ТРНА	61	58 3	39 22	49 12	56 5
Образцы, отрицательные в ТРНА	63	52 11	62 1	52 11	60 3
% совпадения с ТРНА	100	89	82	82	94

Таблица 6

**Совпадение результатов, полученных разными методами  
серодиагностики сифилиса, с результатами  
комплекса РИФ-ТРНА**

	РИФ - ТРНА	МР	РСК	ИФА
Образцы, положительные в РИФ и ТРНА	58	39 19	49 9	56 2
Образцы, отрицательные в РИФ и ТРНА	52	52 0	46 6	52 0
% совпадения с РИФ - ТРНА	100	83	86	98

щества ИФА по сравнению с МР и РСК, на основании чего можно утверждать, что более широкое внедрение ИФА в практику первичного обследования населения и донорской крови на сифилис может значительно повысить уровень выявляемости больных и, тем самым, способствовать снижению темпов роста заболеваемости и вероятности использования инфицированной крови в донорстве.

*Авторы выражают благодарность Курлаевой Татьяне Борисовне, заведующей серологической лабораторией КВД № 1 г. Новосибирска, за любезно предоставленные данные, которые были использованы при написании этого раздела.*

## ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Основными показателями качества иммуноферментной тест-системы являются:

- чувствительность;
- специфичность;
- воспроизводимость.

**Чувствительность** – доля больных (в данном случае – сифилисом), для которых получен положительный результат в данной тест-системе, от общего количества обследованных больных.

**Специфичность** – доля здоровых, для которых получен отрицательный результат в данной тест-системе, от общего количества обследованных здоровых людей.

Понятия «чувствительность» и «специфичность» тесно связаны с понятиями «ложноотрицательный результат» и «ложноположительный результат».

*Ложноотрицательный результат* – отрицательный результат, полученный в данной тест-системе для образца, который на самом деле является положительным.

*Ложноположительный результат* – положительный результат, полученный в данной тест-системе для образца, который на самом деле является отрицательным.

Таким образом, более чувствительной является та тест-система, которая даёт меньше ложноотрицательных результатов, а более специфичной – та, которая даёт меньше ложноположительных результатов.

Чувствительность тест-системы для диагностики сифилиса оценивают на некоторой выборке сывороток крови, взятых от больных, которым достоверно поставлен диагноз «сифилис» (по совокупности клинических данных и результатов серологических реакций). Чем больше образцов используется, тем точнее оценка данного показателя. Чувствительность тест-системы при этом рассчитывают по формуле:

$$\text{Ч} = \frac{P}{S} \times 100\%,$$

где P – количество образцов, давших положительный результат в данной тест-системе; S – общее количество исследованных положительных образцов.



Специфичность тест-системы оценивается аналогично, но на выборке сывороток крови здоровых людей. При этом отсутствие у них сифилиса должно быть подтверждено отрицательными результатами чувствительных серологических тестов (например, РИФ). Специфичность рассчитывают по формуле:

$$C = \frac{N}{S} \times 100\%,$$

где N – количество образцов, давших отрицательный результат в данной тест-системе; S – общее количество исследованных отрицательных образцов.

При оценке специфичности иммуноферментных тест-систем необходимо иметь в виду их высокую чувствительность. Если при тестировании образцов, составляющих «отрицательную» выборку сывороток, для какого-либо образца получен положительный результат, прежде чем посчитать его ложноположительным, необходимо провести дополнительные исследования. Учитывая то, что этот образец мог быть взят от пациента с ранней стадией сифилиса, которая не могла быть диагностирована стандартными методами серодиагностики (в т.ч. и РИФ), рекомендуется повторить анализ стандартным методом через некоторое время (в случае использования РИФ – примерно через 1 неделю, РСК – примерно через 2 недели) и провести дополнительное клиническое обследование пациента.

Воспроизводимость – способность тест-системы давать устойчиво стабильный результат при многократном тестировании одного и того же образца.

При этом имеет значение как воспроизводимость результата внутри одного планшета (при внесении исследуемого образца в разные лунки), так и воспроизводимость результата при тестировании образца с использованием разных диагностических наборов (одной или разных серий). Воспроизводимость является показателем стабильности качества тест-системы – чем выше данный показатель, тем надёжней тест-система.

Если тест-система используется для качественного анализа (как скрининговая), то имеет значение лишь воспроизведение «положительного» или «отрицательного» результата, независимо от абсолютной величины получаемой оптической плотности. Оценку воспроизводимости в этом случае осуществляют на некоторой выборке сывороток (чем больше в этой выборке образцов, дающих слабopоложительный и подпороговый отрицательный результат, тем точнее оценка), каждую

из которых тестируют в разных лунках одного планшета и в разных наборах тест-системы. При этом, чтобы получить более правильную оценку, анализ желательнее проводить одновременно и «руками» одного лаборанта. Воспроизводимость вычисляют по формуле:

$$B = \frac{S \times K - M}{S \times K} \times 100\%,$$

где S – количество использованных образцов, K – число повторов, M – количество невоспроизведённых результатов.

Пример. 10 образцов сыворотки крови поставлены в 5 повторах. При этом один слабоположительный образец в 4 случаях дал положительный результат, а в 1 случае – отрицательный, и один отрицательный образец в 3 случаях дал отрицательный результат, а в 2 случаях – положительный, остальные результаты воспроизвелись все 5 раз. Воспроизводимость тест-системы при этом составит:

$$B = \frac{10 \times 5 - 3}{10 \times 5} \times 100\% = \frac{47}{50} \times 100\% = 94\%$$

Если тест-система используется для определения титра антител (полуколичественный анализ), то становится важным воспроизведение величины титра антител в данном образце при его определении в разных наборах тест-системы (в т.ч. разных серий). Это имеет существенное значение при контроле динамики инфекционного процесса (например, после лечения). В этом случае воспроизводимость можно оценить, определяя титр антител для одного образца в нескольких наборах тест-системы (по крайней мере, в двух).

Таким образом, в каждой диагностической лаборатории имеется возможность оценить качество предлагаемых тест-систем и выбрать лучшую для постоянной работы. Рекомендуется также, постоянно работая с той или иной тест-системой, периодически осуществлять контроль её качества, что повысит надёжность и достоверность получаемых результатов.

Постоянный периодический контроль качества разрешённых к производству иммуноферментных тест-систем осуществляет ЦНИКВИ, на который официально возложены функции контролирующей организации.

## **ОБОРУДОВАНИЕ, НЕОБХОДИМОЕ ДЛЯ РАБОТЫ С ИММУНОФЕРМЕНТНЫМИ ТЕСТ-СИСТЕМАМИ**

Лаборатории, в которых осуществляется ИФА, должны быть укомплектованы:

- набором автоматических пипеток (микродозаторов), который включает в себя одноканальные пипетки переменного объёма, рассчитанные на дозирование 5—40, 40—200 и 200—1000 мкл жидкости, а также 8-канальные пипетки переменного объёма на 5—50 и 50—200 мкл;
- набором мерной химической посуды;
- термостатом, рассчитанным на поддержание температуры 37°C;
- холодильником с морозильной камерой;
- дистиллятором лабораторным для получения дистиллированной воды;
- спектрофотометром планшетным (ридером), оснащённым светофильтром на 450 нм.

Кроме того, различными зарубежными и отечественными фирмами предлагается оборудование, которое может облегчить и упростить некоторые процедуры при постановке ИФА. Из такого оборудования особого внимания заслуживают вошеры – промыватели планшетов. Существуют различные их варианты от 8- или 12-канальных ручных «гребёнок», подключаемых к вакуумному насосу, до полностью автоматизированных программируемых приборов.

## **ТРЕБОВАНИЯ И РЕКОМЕНДАЦИИ, СОБЛЮДЕНИЕ КОТОРЫХ ПОВЫШАЕТ ДОСТОВЕРНОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА**

Для получения достоверных результатов при постановке ИФА необходимо соблюдать следующие требования и рекомендации:

### **1. Строгое соблюдение инструкции по применению тест-системы**

Как правило, в инструкции оговорены основные моменты, имеющие значение для получения правильных результатов при проведении ИФА с использованием данной тест-системы с учётом всех её особенностей.

Наиболее часто встречающиеся нарушения:

- изменение времени инкубации с раствором хромогена;
- изменение числа промывок планшета и способа промывания.

### **2. Соблюдение сроков и условий хранения наборов и отдельных компонентов тест-системы**

Качественная работа диагностических наборов гарантирована производителем лишь в рамках указанного срока годности и при соблюдении требуемых условий хранения.

Кроме того, необходимо строго следить за соблюдением сроков и условий хранения остатков компонентов (после вскрытия флаконов) и приготовленных рабочих растворов в промежутках между постановками анализа.

### **3. Периодический контроль работы оборудования**

Очень важным фактором, влияющим на качество проведения ИФА и получение достоверного результата, является точность работы оборудования. Поэтому необходимо периодически контролировать работу автоматических пипеток, термостатов, спектрофотометров, вошеров (методики проведения контроля см. в разделе «Контроль работы оборудования»).

### **4. Качественная подготовка посуды**

Посуда должна хорошо промываться с использованием моющих средств (без биодобавок) и тщательно прополаскиваться проточной, а затем дистиллированной водой. Нельзя мыть с использованием моющих средств посуду, использующуюся

для раствора хромогена, так как даже их следы могут привести к неконтролируемому разложению последнего. Такую посуду нужно каждый раз ополаскивать 50%-ным раствором этилового спирта и затем дистиллированной водой. Рекомендуется выделить отдельную посуду и для работы с растворами конъюгатов.

Наконечники для автоматических пипеток желательно использовать однократно. Если такой возможности нет, то их нужно после каждого использования замочить в 3—6%-ном растворе перекиси водорода на ночь, несколько раз промыть проточной водой, затем дистиллированной водой, прокипятить 15—30 мин, снова промыть дистиллированной водой и замочить в 50%-ном растворе спирта, после чего высушить. Для работы с раствором хромогена желательно иметь отдельные наконечники, которые сразу после использования промывать спиртом и дистиллированной водой.

Особенно высокие требования должны предъявляться к чистоте посуды и наконечников, применяемых для манипуляций с растворами конъюгатов, так как даже незначительные их загрязнения могут привести к падению активности конъюгата и, следовательно, к снижению чувствительности проводимого анализа.

### **5. Правильная подготовка тестируемых образцов**

Желательно тестирование свежеприготовленных образцов сывороток (плазмы). Если это невозможно, то:

- до 5 суток хранить образцы в холодильнике при 4°C;
- сразу заморозить их (при этом нельзя допускать повторного замораживания и оттаивания образцов).

Тестируемый образец должен быть прозрачным, в нём должны отсутствовать признаки гемолиза, выраженной гиперлипидемии (хилёза), бактериемии.

Необходимо исключить возможность попадания даже микроколичеств одной сыворотки в другую, в т.ч. не производить каких-либо манипуляций с сывороткой над штативом с пробирками и над рабочим планшетом, использовать для каждого образца индивидуальный наконечник для пипетки.

## **6. Исключение возможности смешивания компонентов из наборов разных серий**

Ни в коем случае не допустимо смешивание компонентов из наборов разных серий, так как все компоненты тест-системы и условия проведения анализа (в частности, рабочее разведение конъюгата) подбираются производителем индивидуально для каждой серии наборов.

## **7. Внимательность и сосредоточенность на работе лаборанта, выполняющего анализ**

Так как ИФА-тест-системы предусматривают одновременную работу с большим количеством исследуемых образцов, возможна путаница при их внесении в лунки планшета. Для того чтобы свести к минимуму такую возможность, рекомендуется перед началом анализа заполнить протокол исследования (см. Приложение), в котором на схеме планшета отразить предполагаемую последовательность внесения образцов. Такая схема поможет лаборанту контролировать себя в ходе работы.

По окончании исследования в протокол рекомендуется также внести результаты анализа (например, вклеить распечатку с принтера спектрофотометра). Таким образом Вы получите документ, удобный для сохранения информации о проведенном исследовании.

## **8. Тщательная правильная отмывка планшета на каждой стадии постановки ИФА**

Режим отмывки должен строго соответствовать инструкции по применению тест-системы. В разных тест-системах – разные требования. Нужно иметь в виду, что качество отмывки планшета – один из решающих факторов в постановке ИФА, и поэтому очень внимательно к ней относиться. Необходимо следить за равномерностью заполнения и опорожнения всех лунок планшета, за уровнем заполнения (желательно полное заполнение лунки), регулярно менять фильтровальную бумагу, используемую для подсушивания планшета.

## **9. Соблюдение температурного режима инкубации хромогена**

По инструкции инкубация раствора хромогена должна проходить при комнатной температуре. При этом необходимо учитывать, что стандартно комнатной считается температура (18—25)°С. Именно на такой температурный интервал рассчитана

указанная в инструкции продолжительность инкубации. Если температура в комнате ниже 18°C, ферментативная реакция замедляется, что может привести к снижению чувствительности проводимого анализа. В таком случае рекомендуется инкубацию хромогена проводить в термостате, настроенном на температуру (20—25)°C.

# КОНТРОЛЬ РАБОТЫ ОБОРУДОВАНИЯ

## 1. Автоматические пипетки

Допустимая погрешность измерения объёмов автоматическими пипетками при выполнении ИФА – 5%. Используемые пипетки должны соответствовать диапазону требуемых объёмов. В ходе анализа каждая операция с использованием пипетки должна тщательно контролироваться, так как любая неточность или ошибка (особенно при переносе малых объёмов) может повлиять на правильность результатов анализа.

Обязательным условием является проведение периодического контроля точности работы пипетки гравиметрическим способом.

Наконечник плотно насаживают на пипетку. Как минимум 5 раз набирают дистиллированную воду, каждый раз взвешивают выпущенную воду на весах с точностью до 0,1 мг. Пипетки переменного объёма устанавливают при этом на средний объём. При оценке точности работы пипетки исходят из того, что 1 мл воды имеет при комнатной температуре массу 1 г. Если все измерения укладываются в допустимый интервал ( $\pm 5\%$ ), то пипетка считается пригодной к использованию. В противном случае она требует настройки.

## 2. Термостаты

Поддержание термостатом нужной температуры, указанной в инструкции по применению тест-системы, также важно для получения правильных результатов анализа. Допустимые отклонения  $\pm 1^\circ\text{C}$ . При более низкой температуре снижается чувствительность проводимого анализа, при более высокой – специфичность. Показания внешнего термометра, встроенного в термостат, иногда могут не соответствовать истинной температуре на полках прибора. Поэтому необходимо контролировать работу термостата, помещая поверенный термометр внутрь его камеры на том уровне, где обычно размещают планшеты.

## 3. Автоматические промыватели планшетов (вошеры)

Качественная, правильная промывка планшета на каждой стадии работы во многом определяет успех проводимого анализа. Все лунки планшета должны равномерно заполняться промывающим раствором в требуемом объёме и полностью опорожняться. Кроме того, должны соблюдаться указанные в инструкции по применению



тест-системы количество промывок и время между заполнением лунок и их опорожнением.

При использовании автоматических промывателей важно контролировать все эти параметры. Равномерность заполнения и опорожнения всех лунок планшета контролируют визуально в процессе промывки. Кроме того, периодически проверяют объём заполнения лунок с использованием пипетки, настроенной на требуемый объём.

Для предупреждения возможности некачественной работы автоматических и ручных промывателей необходимо ежедневно по окончании работы промывать их дистиллированной водой для предотвращения оседания солей промывающего раствора и загрязнения каналов промывающей системы.

Для предотвращения микробиологических проростов в шлангах, каналах, ёмкостях необходимо, как минимум, раз в неделю промывать всю систему вошера 70% раствором этилового спирта или другим дезинфицирующим раствором, рекомендованным инструкцией к прибору. В случае, если дезинфекция прибора не проводилась, либо при обнаружении видимых микробиологических проростов (особенно в шлангах вошера) необходимо провести тщательную дезинфекцию прибора, «заросшие» шланги заменить новыми либо обработать их согласно следующей схеме:

- снятые с прибора шланги поместить в 6% раствор перекиси водорода на 6 часов, заполнив их дезраствором;
- после экспозиции в дезрастворе шланги тщательно промыть сначала водопроводной, а затем дистиллированной водой (6—8 раз);
- отмытые шланги поместить в кастрюлю с дистиллированной водой, заполнить их и прокипятить в течение 30 минут;
- остывшую воду слить, шланги освободить от остатков дистиллированной воды, при необходимости высушить при комнатной температуре или при 85°C в течение 2 часов. Шланги готовы к использованию.

#### **4. Спектрофотометры планшетные (ридеры, иммуноферментные анализаторы)**

Спектрофотометры используются для получения количественной оценки результатов анализа, поэтому они подлежат периодической (не реже одного раза в год) метрологической поверке. Тщательная проверка анализатора метрологом даёт уверенность в правильности получаемых результатов.

В повседневной практике ИФА нужно помнить о том, что спектрофотометру для выхода на рабочий режим необходим прогрев (время прогрева для каждого конкретного прибора указано в инструкции по его применению). Существуют простые приёмы проверки точности работы спектрофотометра:

- Для того, чтобы проверить воспроизводимость спектрофотометрической оценки результата в каждой лунке планшета, необходимо провести несколько повторных съёмов показаний с одного планшета. Допустимый разброс величины оптической плотности, получаемой для каждой конкретной лунки планшета, не должен превышать 10%.

- Для того, чтобы оценить равномерность учета результатов спектрофотометром по всей поверхности планшета, необходимо приготовить раствор серной кислоты, смешав в равных объёмах (1:1) дистиллированную воду и 1М раствор серной кислоты (стоп-реагент). Пустой чистый планшет предварительно промыть раствором ФСБ-Т. Затем внести во все лунки планшета по 200 мкл приготовленного раствора серной кислоты. Измерить оптическую плотность раствора спектрофотометром на длине волны 450 нм относительно воздуха. ОП раствора не должна превышать 0,05 о.е. (оптических единиц). Разброс показаний спектрофотометра внутри планшета не должен превышать 10%.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Иммуноферментный анализ уже давно и успешно используется для диагностики многих инфекционных заболеваний человека. На сегодняшний день ИФА остаётся непревзойдённым лидером среди методов, применяемых для скрининговых исследований.

Широкое использование в медицинской практике высококачественных иммуноферментных тест-систем для выявления специфических антитрепонемных антител способно поднять диагностику сифилиса на качественно новую ступень, что очень актуально в сложившихся условиях высокой заболеваемости и роста числа скрытых форм сифилиса.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Скрипкин Ю.К.** // Кожные и венерические болезни. – М., «Триада – Х», 2000, 554–556.
2. **Эглстоун С.И., Тернер А.Дж.Л.** // Инфекции, передаваемые половым путем, 2001, 3: 4–9.
3. **Под ред. У. Пола** // Иммунология. – М., Мир, 1987, т 1: 224–226.
4. **Сидорова Е.В., Ляхов В.Ф.** // Заболевания передаваемые половым путем, 1995, 4, 11–14.
5. **Дмитриев Г.А. с соавт.** // Вестник дерматологии и венерологии. 1996; № 2: 29-32.
6. **Young H. et al.** // J. Clin. Pathol. 1992; 45(1): 37–41.
7. **Lobos P. et al.** // Rev. Med. Chil. 1992; 120(10): 1121–1126.
8. **Jaffe H.W. et al.** // Sex. Transm. Dis. New York. 1990: 935–939.
9. **Carlsson B. et al.** // Acta Derm. Venereol. Stockh. 1991; 71(4): 306–317.
10. **Zierhut M. et al.** // J. Clin. Neuroophthalmol. 1989; 9(2): 71–76.
11. **Dattwyler R.I. et al.** // Ann. NY Acad. Sci. 1988; 539: 92–102.
12. **Приказ МЗ РФ № 87 от 26.03.2001** «О совершенствовании серологической диагностики сифилиса»
13. **Дмитриев Г.А., Беднова В.Н. и др.** // Кожные и венерические болезни (Сб. научн. работ). – М., 1996: 181–187.

ПРИЛОЖЕНИЕ

**ПРОТОКОЛ № \_\_\_\_\_**  
**исследования на сифилис иммуноферментным**  
**методом**

Дата исследования: \_\_\_\_\_

Исполнитель: \_\_\_\_\_

Тест-система: \_\_\_\_\_

Серия: \_\_\_\_\_ Срок годности: \_\_\_\_\_

**СХЕМА АНАЛИЗА:**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

**РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА:**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
АНТИТЕЛООБРАЗОВАНИЕ ПРИ СИФИЛИТИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ .....	4
СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ СЕРОДИАГНОСТИКИ СИФИЛИСА .....	5
ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ИФА.....	8
ИММУНОФЕРМЕНТНЫЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ СИФИЛИСА.....	14
РЕКОМЕНДУЕМЫЙ АЛГОРИТМ СЕРОЛОГИЧЕСКОГО ОБСЛЕДОВАНИЯ НА СИФИЛИС .....	20
ОСОБЕННОСТИ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ВРОЖДЕННОГО СИФИЛИСА .....	23
СРАВНЕНИЕ ИФА С ДРУГИМИ МЕТОДАМИ СЕРОДИАГНОСТИКИ СИФИЛИСА.....	27
ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ .....	32
ОБОРУДОВАНИЕ, НЕОБХОДИМОЕ ДЛЯ РАБОТЫ С ИММУНОФЕРМЕНТНЫМИ ТЕСТ-СИСТЕМАМИ .....	34
ТРЕБОВАНИЯ И РЕКОМЕНДАЦИИ, СОБЛЮДЕНИЕ КОТОРЫХ ПОВЫШАЕТ ДОСТОВЕРНОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА .....	36
КОНТРОЛЬ РАБОТЫ ОБОРУДОВАНИЯ .....	40
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	43
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	44
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	45



Информационно-методическое пособие

**Ткачёв** Вячеслав Константинович  
**Вяткина** Тамара Геннадьевна

## **ИФА-диагностика сифилиса**

---

Подписано в печать 23.03.11. Бумага офсетная. Формат 60×84/16.  
Усл. печ. л. 3. Уч. изд. л. 3,1. Доп. тираж 1 000 экз.

---

Отдел оперативной печати ЗАО «Вектор-Бест»  
630559, Новосибирская обл., пгт. Кольцово, а/я 125