



Сивец И.С.¹✉, Кудина В.А.², Томчук Н.Н.²

¹ Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий, Минск, Беларусь

² Минский городской клинический центр дерматовенерологии, Минск, Беларусь

Создание внутренней контрольной панели сывороток для ее использования в ходе производства RPR-тест-системы для диагностики сифилиса на базе унитарного предприятия «Хозрасчетное опытное производство Института биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси» (УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси»)

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: сбор биологического материала, проведение исследований, учет и анализ результатов – Сивец И.С., Кудина В.А.; оформление результатов – Томчук Н.Н.; редактирование, подготовка текста и иллюстраций – Сивец И.С., Кудина В.А., Томчук Н.Н.

Подана: 03.04.2023

Принята: 13.11.2023

Контакты: siwets.irina@yandex.ru

Резюме

Введение. Сифилис – инфекционное заболевание, этиологическим агентом которого является *Treponema pallidum*, характеризуется разнообразными клиническими проявлениями с периодичностью течения. Для диагностики сифилиса используются 2 категории серологических тестов: трепонемные и нетрепонемные. Трепонемные тесты выявляют антитела к специфическим антигенам *Treponema pallidum*. Нетрепонемные тесты основаны на обнаружении антител к кардиолипину. Они быстры, доступны и необходимы для оценки эффективности лечения или подтверждения реинфекции. Тест быстрых плазменных реагинов (Rapid plasma regain, RPR-тест) относится к группе нетрепонемных тестов, широко используется в медицинских учреждениях для диагностики сифилиса при профилактических обследованиях населения, диагностике его клинических форм и клинико-серологическом наблюдении после лечения, информативен при обследовании пациентов с вторичным и ранним скрытым сифилисом. Исследование осуществляется как в качественном, так и в полуколичественном вариантах. Так как отечественные технологии производства RPR-теста отсутствуют, при разработке наборов реагентов необходимо создание контрольной панели сывороток для оценки качества RPR-теста при его производстве.

Цель. Создание контрольных панелей сывороток для оценки эффективности тест-систем и проведения медико-лабораторных испытаний экспериментальных партий новых наборов реагентов.

Материалы и методы. При создании панели использовались образцы сыворотки крови пациентов с различными формами сифилиса (основная группа), а также



пробы пациентов, которые были включены в контрольную группу исследования. Тестирование проб проводилось методом RPR с использованием разработанного УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси» набора реагентов, предназначенного для качественного и полуколичественного определения неспецифических реактивных антител при выявлении бактериальной инфекции *Treponema pallidum*. Использовались подтверждающие наборы других производителей.

Результаты. На основе образцов сывороток с патологическим и нормальным содержанием быстрых плазменных реагенов создана контрольная панель сывороток, которая будет использоваться для контроля качества разработанного набора RPR-теста при его серийном производстве.

Заключение. Созданы внутренние контрольные панели сывороток, содержащие реактивные антитела в широком диапазоне концентраций.

Ключевые слова: сифилис, RPR-тест, нетрепонемный тест, производство, контрольная панель сывороток, тест быстрых плазменных реагенов

Sivets I.¹✉, Kudzina V.², Tamchuk N.²

¹ Republican Scientific and Practical Center for Transfusiology and Medical Biotechnology, Minsk, Belarus

² Minsk City Clinical Center of Dermatovenerology, Minsk, Belarus

Creation of an Internal Control Serum Panel for its Use in the Production of the RPR-Test-System for Diagnostics Based on the Domestic Manufacturer Unitary Enterprise "Pilot Production of the Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus"

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: collection of biological material, research, accounting and analysis of results – Sivets I., Kudzina V.; registration of results – Tamchuk N.; text and illustrations – Sivets I., Kudzina V., Tamchuk N.

Submitted: 03.04.2023

Accepted: 13.11.2023

Contacts: siwets.irina@yandex.ru

Abstract

Introduction. Syphilis is an infectious disease caused by *Treponema pallidum*, which is characterized by diverse clinical manifestations and periodicity of progression. Two categories of serological tests are used to diagnose syphilis: treponemal and non-treponemal. Treponemal tests detect antibodies to specific antigens of *Treponema pallidum*. Non-treponemal tests are based on the detection of antibodies to cardiolipin. They are fast, accessible and necessary for evaluating treatment efficacy or confirming reinfection. The RPR test belongs to the group of non-treponemal tests and is widely used in medical institutions for diagnosing syphilis during population screening, diagnosing

its clinical forms, clinical and serological observation after treatment. It is informative for examining patients with secondary and early latent syphilis. The test can be conducted both qualitatively and semi-quantitatively. As there are no domestic production technologies for the RPR test, it is necessary to create a control serum panel for assessing the quality of the RPR test during its production when developing reagent kits.

Purpose. Create of serum control panels to evaluate the test-systems effectiveness and conduct medical laboratory tests of experimental batches of new reagent sets.

Materials and methods. Samples of blood serum from patients with various forms of syphilis were used in the creation of the panel (the main group), as well as samples from patients included in the study's control group. Testing of the samples was performed using the RPR method with a set of reagents developed by Unitary Enterprise "Pilot Production of the Institute of Bioorganic Chemistry National Academy of Sciences of Belarus" for the qualitative and semi-quantitative determination of non-specific reagin antibodies in the detection of bacterial infection with *Treponema pallidum*. Confirmatory sets from other manufacturers were also used.

Results. A control serum panel has been created based on samples of serum with pathological and normal levels of rapid plasma reagins. This panel will be used for quality control of the developed RPR test kit during its mass production.

Conclusion. Internal control serum panels containing reagin antibodies over a wide range of concentrations have been created.

Keywords: syphilis, RPR-test, non-treponemal test, production, control serum panel, rapid plasma reagin test

■ ВВЕДЕНИЕ

У пациентов с первичной формой сифилиса в сыворотке (плазме) крови и, при некоторых формах заболевания, в ликворе появляются реакиновые антитела, которые взаимодействуют с липоидными антигенами клеточной мембраны возбудителя заболевания *T. pallidum*. К регламентированным методам исследования, применяемым для диагностики сифилитической инфекции, относятся нетрепонемные тесты, предназначенные для определения реакиновых антител с использованием кардиолипинового антигена: тест быстрого определения реакинов плазмы (RPR) [1, 2].

После успешно проведенного лечения с применением антибактериальных средств у пациентов с сифилитической инфекцией отмечается снижение содержания реакиновых антител к *T. pallidum* и обычно через некоторое время результаты нетрепонемных тестов становятся отрицательными. Результаты полуколичественного определения реакиновых антител (титра антител) могут быть использованы в качестве критериев оценки эффективности антибиотикотерапии пациентов, страдающих сифилисом, излеченности и возможности снятия с клинико-диагностического наблюдения [2, 3].

RPR-тест основан на реакции флоккуляции (образовании агрегатов). При взаимодействии реакиновых антител (антифосфолипидные антитела классов IgM и IgG), присутствующих в сыворотке или плазме, с кардиолипиновым антигеном образуются комплексы антиген-антитело (преципитат). Наличие таких антител служит



основанием для постановки предварительного диагноза сифилиса. В случае положительного образца присутствующие в нем реактивные антитела образуют видимые агрегаты с антиген-угольными частицами. В случае отрицательного образца суспензия остается гомогенной. Результат оценивается визуально. Величина частиц преципитата может быть выражена в условных единицах от 2+ до 4+:

резко положительный результат (4+) – крупные частицы преципитата черного цвета распределяются равномерно по всей лунке либо имеют тенденцию к расположению по периферической части, при этом реакционная среда практически полностью прозрачна – это свидетельствует о высоком содержании антител к кардиолипину, лецитину и холестерину в биологическом материале;

положительный результат (3+) – агрегаты угольных частиц средней величины распределены по всей лунке, реакционная среда имеет просветление общего фона реакционной среды – указывает также на наличие большого количества антител-преципитатов;

слабоположительный результат (2+) – мелкие частицы преципитата распределены по периферии лунки, реакционная среда имеет гомогенную структуру – свидетельство присутствия антител в биологическом материале;

отрицательный результат – преципитата нет, видимые агрегаты угольных частиц в пробе отсутствуют, реакционная среда гомогенной структуры либо частицы угля собираются в центральной части лунки, формируя пятно черного цвета, – антитела в сыворотке не выявлены.

При результате 4+ дальнейшую оценку напряженности гуморального иммунного ответа (полуколичественную оценку содержания антител) проводят путем титрования последовательных разведений исследуемого образца патологического материала (титрование). Титром антител считается наибольшее разведение исследуемого образца, при котором наблюдается положительный результат. У некоторых пациентов с очень высоким содержанием антител в биологическом материале возможно проявление эффекта прозоны. Причина этого явления заключается в том, что переизбыток антител не позволяет образоваться преципитации комплексов антиген-антитело [4].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Создание контрольных панелей сывороток для оценки эффективности тест-систем и проведения медико-лабораторных испытаний экспериментальных партий новых наборов реагентов.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Отбор образцов для проведения исследований является важной операцией, направленной на обеспечение достоверности и обоснованности результатов. Забор биологического материала осуществлялся в соответствии с требованиями, устанавливающими методы отбора, в количестве, необходимом для проведения исследований и измерений [4]. Выборка пациентов происходила в 2 этапа. На 1-м этапе было протестировано 69 проб пациентов (пробы сывороток 45 пациентов с различными формами сифилиса и пробы сывороток 24 клинически здоровых мужчин и женщин).

В работе использовались референс-наборы реагентов, предназначенные для качественного и полуколичественного определения неспецифических реактивных

антител при выявлении бактериальной инфекции *Treponema pallidum*, связанной с сифилисом, производства ЗАО «ЭКОлаб», Российская Федерация, и Dialab, Австрия (табл. 1):

- пробы 24 пациентов имели отрицательный результат (–);
- пробы 8 пациентов имели слабоположительный результат (2+);
- пробы 13 пациентов имели положительный результат (3+);
- пробы 24 пациентов имели резко положительный результат с количественной раститровкой (4+).

Таблица 1
Выборка сывороток пациентов с разной степенью позитивности. 1-й этап
Table 1
Serum samples were collected from patients with varying degrees of positivity. Stage 1

№ п/п	№ контрольной пробы	Результаты	
		Референс-набор производства ЗАО «ЭКОлаб», Российская Федерация	Референс-набор производства Dialab, Австрия
1	18	Отр.	
2	29	3+	
3	30	4+ титр 1/4	
4	35	2+	
5	37	Отр.	
6	40	3+	
7	43	2+	
8	45	3+	
9	47	4+ титр 1/16	
10	53	Отр.	
11	54	4+ титр 1/2	
12	55	3+	
13	63	4+ титр 1/8	
14	64	Отр.	
15	65	4+ титр 1/32	
16	71	4+ титр 1/64	
17	73	Отр.	
18	79	3+	
19	85	4+ титр 1/2	
20	87	4+ титр 1/2	
21	90	Отр.	
22	91	2+	
23	92	4+ титр 1/64	
24	93	3+	
25	94	Отр.	
26	95	4+ титр 1/32	
27	98	2+	
28	100	4+ титр 1/2	
29	101	Отр.	



Окончание таблицы 1

№ п/п	№ контрольной пробы	Результаты	
		Референс-набор производства ЗАО «ЭКОлаб», Российская Федерация	Референс-набор производства Dialab, Австрия
30	103	Отр.	
31	105	4+ титр 1/8	
32	107	3+	
33	108	4+ титр 1/2	
34	109	Отр.	
35	110	Отр.	
36	111	Отр.	
37	115	3+	
38	118	4+ титр 1/128	
39	121	Отр.	
40	125	4+ титр 1/16	
41	129	2+	
42	130	4+ титр 1/8	
43	150	4+ титр 1/4	
44	151	Отр.	
45	152		Отр.
46	153		3+
47	154		Отр.
48	155		2+
49	160		Отр.
50	161		3+
51	163		Отр.
52	164		4+ титр 1/8
53	165		Отр.
54	177		2+
55	178		Отр.
56	179		4+ титр 1/4
57	180		4+ титр 1/2
58	181		4+ титр 1/64
59	182		Отр.
60	183		4+ титр 1/8
61	187		3+
62	188		Отр.
63	189		4+ титр 1/16
64	190		Отр.
65	195		3+
66	197		3+
67	198		2+
68	199		4+ титр 1/8
69	200		Отр.

К тому же было выбрано и протестировано 50 проб пациентов (пробы сывороток 42 пациентов с различными формами сифилиса и пробы сывороток 8 клинически здоровых мужчин и женщин). В работе использовался разработанный набор реагентов, предназначенный для качественного и полуколичественного определения неспецифичных реагиновых антител при выявлении бактериальной инфекции *Treponema pallidum*, связанной с сифилисом, производства УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси», Республика Беларусь. Результаты тестирования сывороток крови пациентов с использованием референс-наборов, а также экспериментальных образцов разработанных наборов были сопоставимы (табл. 2).

Таблица 2
Тестирование сывороток крови пациентов с использованием тест-систем разных производителей
Table 2
Testing of blood serum from patients using test systems from different manufacturers

№ п/п	№ контрольной пробы	Результаты		
		Референс-набор производства ЗАО «ЭКОлаб», Российская Федерация	Референс-набор производства Dialab, Австрия	Разработанный УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси», Республика Беларусь
1	201	4+ титр 1/2		4+ титр 1/2
2	202	3+		3+
3	203	4+ титр 1/2		4+ титр 1/2
4	204	2+		2+
5	206	3+		2+
6	210	4+ титр 1/16		4+ титр 1/8
7	257	4+ титр 1/16		4+ титр 1/8
8	259	3+		3+
9	260	2+		2+
10	261	4+ титр 1/2		3+
11	262	2+		2+
12	263	Отр.		Отр.
13	264	2+		2+
14	265		2+	2+
15	267		2+	2+
16	268		4+ титр 1/64	4+ титр 1/32
17	269		4+ титр 1/16	4+ титр 1/8
18	270		4+ титр 1/8	4+ титр 1/4
19	271		4+ титр 1/8	4+ титр 1/4
20	272		4+ титр 1/64	4+ титр 1/32
21	274		4+ титр 1/64	4+ титр 1/32
22	276		2+	2+
23	277		4+ титр 1/64	4+ титр 1/16
24	278		4+ титр 1/4	4+ титр 1/2
25	279		4+ титр 1/2	3+
26	280		4+ титр 1/4	4+ титр 1/4
27	281		4+ титр 1/2	4+ титр 1/2



Окончание таблицы 2

№ п/п	№ контрольной пробы	Результаты		
		Референс-набор производства ЗАО «ЭКОлаб», Российская Федерация	Референс-набор производства Dialab, Австрия	Разработанный УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси», Республика Беларусь
28	282		4+ титр 1/4	4+ титр 1/4
29	283		2+	2+
30	284		4+ титр 1/16	4+ титр 1/8
31	285		4+ титр 1/32	4+ титр 1/16
32	288		4+ титр 1/64	4+ титр 1/32
33	289		4+ титр 1/2	4+ титр 1/2
34	290		2+	2+
35	291		4+ титр 1/32	4+ титр 1/16
36	293		4+ титр 1/8	4+ титр 1/8
37	296		Отр.	Отр.
38	299		4+ титр 1/32	4+ титр 1/16
39	300		Отр.	Отр.
40	301		4+ титр 1/32	4+ титр 1/16
41	302		4+ титр 1/8	4+ титр 1/8
42	303		Отр.	Отр.
43	305		Отр.	Отр.
44	307		2+	2+
45	308		Отр.	Отр.
46	309		Отр.	Отр.
47	310		4+ титр 1/4	4+ титр 1/4
48	312		4+ титр 1/32	4+ титр 1/16
49	314		3+	3+
50	318		Отр.	Отр.

На 2-м этапе исследования было протестировано 83 пробы пациентов (пробы сывороток 67 пациентов с различными формами сифилиса и пробы сывороток 16 клинически здоровых мужчин и женщин). В работе использовались референс-наборы реагентов, предназначенные для качественного и полуколичественного определения неспецифических реактивных антител при выявлении бактериальной инфекции *Treponema pallidum*, связанной с сифилисом, производства АО «Вектор-Бест», Российская Федерация, и Dialab, Австрия (табл. 3). Были отобраны следующие:

- пробы 16 пациентов имели отрицательный результат (-);
- пробы 19 пациентов имели слабоположительный результат (2+);
- пробы 4 пациентов имели положительный результат (3+);
- пробы 44 пациентов имели резко положительный результат с количественной раститровкой (4+).

В амбулаторно-дерматовенерологическом отделении № 4 имеется полная информация об обследуемых пациентах. Биологический материал направлялся в Республиканскую референс-лабораторию по диагностике сифилиса, где регистрировался и фиксировался в базе данных. Республиканская референс-лаборатория

Таблица 3
Выборка сывороток пациентов с разной степенью позитивности. 2-й этап
Table 3
Serum samples were collected from patients with varying degrees of positivity. Stage 2

№ п/п	№ контрольной пробы	Результаты	
		Референс-набор производства АО «Вектор-Бест», Российская Федерация	Референс-набор производства Dialab, Астрия
1	591	Отр.	
2	592	4+ титр 1/128	
3	593	2+	
4	595	4+ титр 1/8	
5	596	Отр.	
6	597	4+ титр 1/4	
7	598	2+	
8	599	2+	
9	600	4+ титр 1/16	
10	601	4+ титр 1/32	
11	602	2+	
12	603	3+	
13	605	Отр.	
14	606	4+ титр 1/16	
15	607	Отр.	
16	608	4+ титр 1/4	
17	609	4+ титр 1/4	
18	610	4+ титр 1/16	
19	611	4+ титр 1/16	
20	612	4+ титр 1/8	
21	613	4+ титр 1/4	
22	614	2+	
23	615	4+ титр 1/8	
24	616	Отр.	
25	618	2+	
26	619	2+	
27	621	4+ титр 1/4	
28	622	4+ титр 1/2	
29	623	4+ титр 1/2	
30	624	Отр.	
31	625	Отр.	
32	626	4+ титр 1/4	
33	627	4+ титр 1/32	
34	628	Отр.	
35	630	4+ титр 1/4	
36	632	4+ титр 1/16	
37	633	4+ титр 1/16	
38	634	Отр.	
39	635	4+ титр 1/16	
40	637	3+	



Окончание таблицы 3

№ п/п	№ контрольной пробы	Результаты	
		Референс-набор производства АО «Вектор-Бест», Российская Федерация	Референс-набор производства Dialab, Австрия
41	638	4+ титр 1/128	
42	640	Отр.	
43	641	2+	
44	643	4+ титр 1/32	
45	644	2+	
46	645	4+ титр 1/8	
47	648	4+ титр 1/32	
48	649	2+	
49	650	Отр.	
50	652	2+	
51	653	4+ титр 1/2	
52	654	4+ титр 1/16	
53	656	4+ титр 1/8	
54	657	4+ титр 1/64	
55	658	4+ титр 1/16	
56	659	Отр.	
57	660	3+	
58	661	Отр.	
59	662	4+ титр 1/2	
60	663	3+	
61	665	2+	
62	666	4+ титр 1/4	
63	667	4+ титр 1/16	
64	668	4+ титр 1/4	
65	669	2+	
66	670	2+	
67	671	4+ титр 1/8	
68	672	4+ титр 1/8	
69	673	4+ титр 1/32	
70	674		2+
71	675		2+
72	676		4+ титр 1/32
73	677		Отр.
74	678		2+
75	679		2+
76	680		4+ титр 1/16
77	681		4+ титр 1/4
78	682		4+ титр 1/2
79	683		2+
80	684		4+ титр 1/4
81	685		Отр.
82	686		4+ титр 1/8
83	687		Отр.

по диагностике сифилиса создана на базе и является структурным подразделением учреждения здравоохранения «Минский городской клинический центр дерматовенерологии» в соответствии с приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 28.08.2018 № 851.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ

Определены критерии и сформирована база данных контрольной группы пациентов, больных сифилисом различной формы заболевания, и здоровых лиц, включаемых в исследование. Осуществлен забор биологического материала для проведения тестирования.

Проведено тестирование выбранных проб сыворотки крови пациентов с использованием референс-наборов RPR-теста.

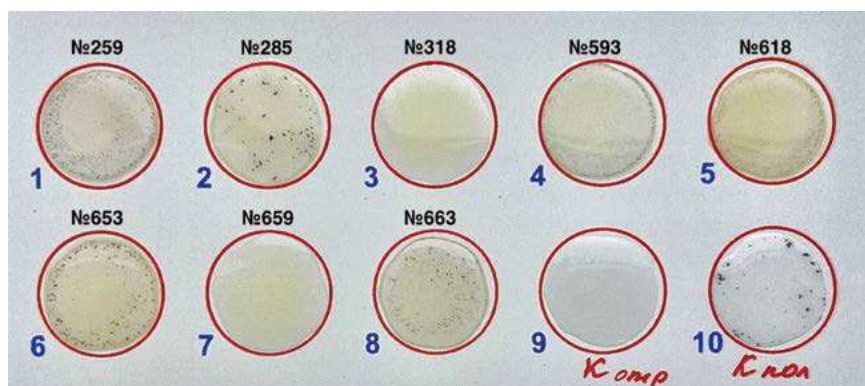


Рис. 1. Реакция быстрых плазменных реагинов (RPR-тест). Качественная постановка
Fig. 1. Rapid plasma reagin (RPR-test). Qualitative testing

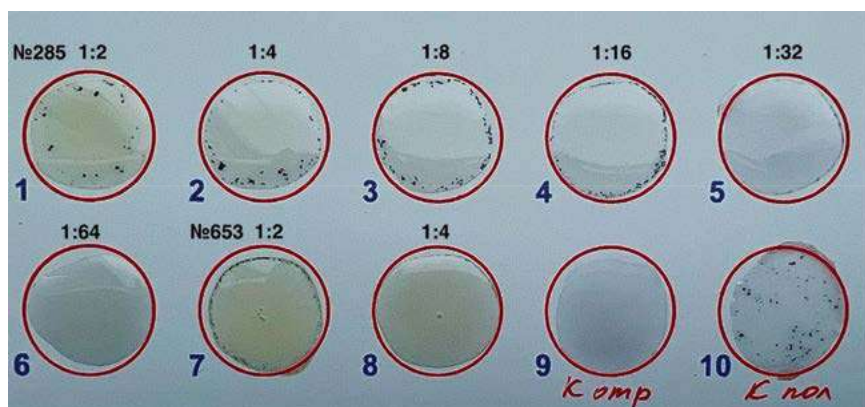


Рис. 2. Реакция быстрых плазменных реагинов (RPR-тест). Полуколичественное определение реагиновых антител (титр антител)
Fig. 2. Rapid plasma reagin (RPR) test. Semi-quantitative determination of reagin antibodies (antibody titer)



На рис. 1 приведен пример определения качественной реакции быстрых плазменных реагинов при использовании сывороток из контрольной панели.

На рис. 2 представлены результаты полуколичественного определения реагиновых антител (титра антител).

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В сформированную контрольную панель вошли пробы сыворотки клинически здоровых людей (отрицательный результат) и сыворотки пациентов с сифилитической инфекцией (положительный результат). Панель сывороток была протестирована на референс-наборах различных производителей, результаты были сопоставимы. Сформированная база сывороток используется при контроле производства тест-системы отечественного производителя УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси».

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Manual for laboratory diagnosis of syphilis of 20.10.2020 № 1105. (in Russian)
2. *Diagnosis and treatment of patient with syphilitic infection*. The guidelines on diagnosis and management of syphilis of 19.09.2019 № 96. (in Russian)
3. *Sexually Transmitted Infections Treatment Guidelines*. 2021. Available at: <https://www.cdc.gov/std/treatment-guidelines/syphilis.htm>.
4. *Standard Operational Procedure for Syphilis*: SOP № SYPH003/01; SOP № SYPH004/01; SOP № SYPH005/01; SOP № SYPH006/01. Moscow; 2006. (in Russian)