

Zastosowanie testu Syphilis Total Ab na aparacie Evolis (firmy BIO-RAD) do prowadzenia badań przeglądowych w krwiodawstwie

Evaluation of Syphilis Total Ab on the Evolis analyzer (BIO-RAD) for blood donation screening

Ewa Sulkowska¹, Aneta Kopacz¹, Dorota Kubicka-Russel¹, Grzegorz Liszewski¹, Małgorzata Szabelewska², Agnieszka Karcz², Magdalena Łętowska¹, Piotr Grabarczyk¹

¹Instytut Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie

²Wojskowe Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Warszawie

Streszczenie

Wstęp: Test Syphilis Total Ab firmy BIO-RAD (Francja) jest przeznaczony do wykrywania przeciwciał skierowanych do antygenów *Treponema pallidum* w ludzkiej surowicy lub osoczu. Oznaczenia są prowadzone w automatycznych analizatorach Evolis firmy BIO-RAD.

Celem badań była ocena przydatności testu Syphilis Total Ab BIO-RAD do prowadzenia badań przeglądowych krwiodawców w Polsce. Analizowano swoistość, czułość testu oraz powtarzalność i odtwarzalność wartości S/Co. Przeanalizowano także wyniki badań z 18 miesięcy po wdrożeniu testu w Wojskowym Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa (WCKiK), a następnie porównano z wynikami badania innym testem EIA uzyskanymi w okresie 36 miesięcy poprzedzających zmianę testu.

Materiał i metody: Swoistość testu oszacowano w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii (IHIT) na podstawie badania 2058 próbek pochodzących z bieżących badań krwiodawców. Czułość kliniczną oceniono na podstawie wyników badania: 1) paneli próbek serodatnicznych (potwierdzonych) nierozcieńczonych i przygotowanych przez rozcieńczenie dodatkowo surowicy archiwalnej, 2) panelu serokonwersyjnego (SeraCare), 3) próbek reaktywnych w badaniu prospektywnym wykonanym w celu oceny specyficzności testu. Dodatkowo przeanalizowano wyniki badania 48 940 donacji za pomocą testu Syphilis Total Ab firmy BIO-RAD po wprowadzeniu do rutynowych badań przeglądowych (od stycznia 2015 r. do czerwca 2016 r.) i porównano z wynikami badań przeglądowych w okresie wcześniejszym (89 672 donacji w latach 2012–2014 badano testem *TrepanostikaTP* rec. firmy bioMerieux, Francja).

Wyniki: W badaniu ewaluacyjnym swoistość testu Syphilis Total Ab BIO-RAD wynosiła 99,9% (uznając RR z nieokreślonym wynikiem testu potwierdzenia za wynik fałszywie reaktywny). W badaniach paneli własnych wszystkie próbki były zgodnie reaktywne w teście ocenianym i w teście odniesienia (zgodność 100%). W badaniach panelu serokonwersyjnego w obu testach uzyskano taką samą liczbę wyników reaktywnych.

Częstość potwierdzonych wyników powtarzalnie reaktywnych uzyskanych w okresie 2012–2016 wynosiła 0,0079% (11/138 612 donacji), przy czym swoistość testu Syphilis Ab BIO-RAD wy-

nosila 99,98% w porównaniu z 99,79% w okresie poprzedzającym zmianę testu, a pozytywna wartość predykcyjna testu ocenianego była istotnie statystycznie wyższa (40% vs. 2,65%, $p < 0,05$).

Wnioski: Test Syphilis Total Ab firmy BIO-RAD wykonywany na analizatorze Evolis charakteryzuje się dobrą swoistością, czułością oraz odtwarzalnością i powtarzalnością wartości S/Co. Uzyskane wyniki pokazują, że poprawa swoistości (pozytywnej wartości predykcyjnej) badania przeglądowego przez dobór testu pod kątem tego parametru przynosi wymierne ograniczenie kosztów (m.in. przez zmniejszenie liczby badań powtarzanych i weryfikacyjnych, kontrolnych oraz zniszczeń składników krwi) oraz prowadzi do ograniczenia liczby dyskwalifikowanych czasowo dawców.

Słowa kluczowe: kiła, *treponema pallidum*, badania przeglądowe dawców

J. Transf. Med. 2017; 10: 1–11

Summary

Background: Syphilis Total Ab BIO-RAD (France) is designed for detection of antibodies to *Treponema pallidum* antigens in human serum and plasma. Tests are performed in automatic analyzers Evolis (BIORAD).

The aim was to evaluate the advantages of the Syphilis Total Ab BIO-RAD test for blood donor screening in Poland. Specificity, sensitivity, repeatability and reproducibility of S/Co values were evaluated. After 18 months of using the test at the Military Blood Center (WCKiK), the results were analyzed and compared to those obtained with other EIA tests which had been in use for 36 months before the implementation of Syphilis Total Ab BIO-RAD.

Material and methods: Specificity evaluation was performed at the Institute Hematology and Transfusion Medicine (IHiT) on samples collected from 2058 currently screened donors. Assessment of clinical sensitivity was based on study outcome of: 1) seropositive sample panels (confirmed), raw and prepared by dilution of positive archive serum, 2) seroconversion panel (SeraCare), 3) samples reactive in a prospective study performed for assessment of test specificity. Additionally, we analyzed results for 48 940 donations tested with Syphilis Total Ab BIO-RAD between January 2015 and June 2016 and the results were compared with results for 89.672 donations tested in the period 2012–2014 with *Trepanostika TP rec. bioMerieux* (France).

Results: Specificity of Syphilis Total Ab BIO-RAD test is equal to 99.9%; repeat reactive (RR) samples with indeterminate confirmation results were considered false reactive. In our own panel studies all samples were found reactive both in the evaluated assay and in reference test (100% compliance). The same number of reactive results was reported for both tests in seroconversion panel studies.

Frequency of confirmed RR results in the period 2012–2016 at WCKiK was calculated at 0.0079% (11/138,612 donations). Specificity of Syphilis Ab BIO-RAD was equal to 99.98% as compared to 99.79% reported for the period before test implementation and the positive predictive value of the evaluated test was significantly higher (40% vs. 2.65%, $p < 0.05$).

Conclusions: The S/Co values for specificity, sensitivity, reproducibility and repeatability of Syphilis Total Ab Test BIO-RAD performed on the analyzer Evolis were found satisfactory.

The study outcome demonstrates that the choice of a higher-specificity test (positive predictive values) brings about measurable cost-cutting (smaller number of repeat, verification and control tests performed as well as reduced blood component wastage) and reduction in number of temporarily disqualified donors.

Key words: syphilis, *treponema pallidum*, blood donation screening

J. Transf. Med. 2017; 10: 1–11

Wstęp

Kiła (łac. *syphilis*) to choroba zakaźna, przenoszona najczęściej podczas kontaktów seksualnych, wywołwana przez bakterię *Treponema pallidum* należącą do rodziny *Spirochaetaceae*. Jedynym żywicielem tej bakterii jest człowiek. Okres wylegania choroby wynosi 9–90 dni. Kiłę cechuje wieloletni przebieg z następującymi po sobie okresami objawowymi i bezobjawowymi. Może ona przebiegać w sposób utajony, ulegać samowyleczeniu lub wywoływać poważne zmiany narządowe. Zakaźność kiły jest ściśle związana z okresem choroby, największa jest w 2 pierwszych latach zakażenia. Wyróżnia się kiłę nabytą i wrodzoną [1]. Krwiodawca znajdujący się w każdym ze stadiów choroby może przenieść zakażenie na biorcę. Według danych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, *World Health Organization*) każdego roku na świecie wykrywa się około 11 mln nowych przypadków kiły [2]. W 2014 roku w Europie zgłoszono 24 541 przypadków kiły, w porównaniu z 2010 rokiem odnotowano wzrost zachorowań o 30%. Obecnie główną grupę zakażonych stanowią homoseksualni mężczyźni (ok. 63%) [3].

Potwierdzenie choroby jest oparte na obrazie klinicznym, wywiadzie epidemiologicznym oraz wynikach badań laboratoryjnych [4, 5]. Rekomendacje dla krwiodawstwa zwracają szczególną uwagę na stosowanie testów o jak największej czułości i charakteryzujących się optymalną swoistością, tak by ich stosowanie nie powodowało (czasowej) utraty dawców z wynikami nieswoistymi i w konsekwencji nieuzasadnionego ograniczenia dostępu do składników krwi.

Na podstawie oceny czułości i swoistości testów serologicznych wykrywających przeciwciała przeciwko *Treponema pallidum* Międzynarodowa Organizacja ds. Chorób Przenoszonych Drogą Płciową (IUSTI, *International Union Against Sexually Transmitted Infections*) zaleciła stosowanie w badaniach przeglądowych testów swoistych — krętkowych, na przykład testów immunoenzymatycznych (EIA) [6]. Ponadto zarekomendowała potwierdzanie zakażenia *Treponema pallidum* testem opartym na innej metodyce niż badanie przeglądowe. Przykładowo, jeśli powtarzalnie reaktywny wynik testu przeglądowego uzyskano w teście EIA, badania weryfikacyjne powinny być wykonane za pomocą następujących testów: testu hemaglutynacji (TPHA, *Treponema Pallidum Haemagglutination Assay*), testu immunofluorescencyjnego krętków (FTA, *Fluorescent Treponemal Antibody*), testu immunofluorescencyjnego

krętków w modyfikacji absorpcyjnej (FTA-ABS, *Fluorescent Treponemal Antibody Absorption Test*) lub WB (*Western Blot*). Zaleca się potwierdzanie wyników powtarzalnie reaktywnych na podstawie dwóch rodzajów testów [7].

Biorąc pod uwagę powyższe zalecenia, w Polsce od 2012 roku do badań przeglądowych w kierunku *T. pallidum* wśród krwiodawców są wykorzystywane wyłącznie testy swoiste [6], które opierają się na teście immunochemicznym z użyciem mikrocząstek i znacznika chemiluminescencyjnego (CMIA, *Chemiluminescent Microparticle Immunoassay*), teście immunoenzymatycznym (EIA, *enzyme immunoassay*) i TPHA. Natomiast badania weryfikacyjne są wykonywane przynajmniej dwoma odpowiednimi testami swoistymi innymi niż testy przeglądowe, na przykład testami typu WB i TPHA.

Stała dyskwalifikacja krwiodawców następuje po uzyskaniu wyników dodatnich w przynajmniej 2 testach potwierdzenia. W przypadku innych wyników nakłada się dyskwalifikację czasową. Dawca do oddawania krwi może być przywrócony, gdy wyniki testu przeglądowego oraz testów potwierdzenia są ujemne. W przypadku potwierdzenia zakażenia w kierunku *Treponema pallidum* dawca jest na stałe wykreślany z rejestru dawców krwi i kierowany do poradni wenerologicznej. Wszystkie tego typu przypadki są zgłaszane do państwowego powiatowego inspektora sanitarnego właściwego dla siedziby laboratorium (PPIS) [8].

W 2013 roku w Polsce potwierdzono 1343 przypadki kiły [9], z czego w pionie krwiodawstwa potwierdzono swoiste przeciwciała anty-*Treponema pallidum* u 179 dawców [Instytut Hematologii i Transfuzjologii (IHiT) na podstawie danych z Centrów Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa (CKiK)]. Testy przeznaczone do diagnostyki *Treponema pallidum* nie zostały wpisane ani do wykazu A, ani B Dyrektywy 98/79/WE Parlamentu Europejskiego oraz Rady Unii Europejskiej (UE) [10], w związku z czym szczególnie istotne jest dokonywanie ewaluacji tego typu testów przed wprowadzeniem do rutynowego badania dawców krwi.

Cel badań

Celem badań była ocena przydatności testu Syphilis Total Ab firmy BIO-RAD do prowadzenia badań przeglądowych u krwiodawców w Polsce. Aby sprawdzić przydatność nowego testu, należy oznaczyć czułość, swoistość, powtarzalność i od-twarzalność wartości S/Co. Dodatkowo przeanalizowano wyniki otrzymane w okresie pierwszych 18 miesięcy od wprowadzenia testu do badań

przeładowych i porównano z wynikami poprzedzającymi zmianę. Zwrócono w szczególności uwagę na czułość i swoistość uzyskiwaną w obu analizowanych okresach.

Materiał i metody

Testy stosowane w badaniach

Charakterystyka ocenianego testu

Test Syphilis Total Ab firmy BIO-RAD jest przeznaczony do wykrywania przeciwciał skierowanych do antygenów *Treponema pallidum* w ludzkiej surowicy lub osoczu. Oznaczenia są wykonywane w analizatorach Evolis firmy BIO-RAD.

Antygeny, którymi są opłaszczane dołki mikropłytek, wiążą specyficzne przeciwciała klasy IgG, IgM i IgA *Treponema pallidum*, co umożliwia wykrywanie przeciwciał podczas wszystkich etapów zakażenia. Dołki mikropłytki są opłaszczane mieszaniną antygenów rekombinowanych 15Kd, 17Kd i 47Kd *Treponema pallidum*. Po dodaniu koniugatu do dołka, w którym inkubowano próbkę, specyficzne przeciwciała znajdujące się w badanej surowicy lub osoczu łączą się z antygenami w dołku mikropłytki i z antygenami związanymi z peroksydazą chrzanową znajdującymi się w koniugacie. Po usunięciu niezwiązanego materiału w procesie płukania i po dodaniu substratu, zmiana zabarwienia mieszaniny substrat/chromogen wskazuje na obecność związanego enzymu, co z kolei świadczy o obecności w próbce specyficznych przeciwciał. W celu określenia obecności lub nieobecności swoistego przeciwciała w próbce, aparat porównuje intensywność zabarwienia z zabarwieniem w dołkach mikropłytki, w których były badane surowice kontrolne, i generuje wynik odpowiednio — reaktywny lub niereaktywny.

Wszystkie odczynniki, z wyjątkiem roztworu do płukania oraz substratu, który musi być przygotowany na świeżo przed badaniem, są dostarczane w postaci gotowej do użytku. Badanie jest wykonywane na podzielnej płytce zawierającej 12 pasków po 8 studzienek.

Testy odniesienia i testy stosowane w badaniach weryfikacyjnych

Badania przeglądowe wykonywano na podstawie testów posiadających pozytywną opinię IHiT oraz znak CE IVD: EIA (I test odniesienia) oraz CMIA (II test) odniesienia. Do badań weryfikacyjnych wykorzystywano testy wykrywające przeciwciała anty-*Treponema pallidum*. Były to testy swoiste, na przykład TPHA, FTA, FTA-ABS.

Badania wykonywane w IHiT potwierdzano na podstawie testów typu WB oraz TPHA. Wyniki badań próbek zarówno ocenianym testem, jak i testami odniesienia wyrażono jako wartość S/Co; S/Co \geq 1 jest interpretowany jako wynik reaktywny; gdy $<$ 1 jako wynik ujemny.

Swoistość testu

W ramach analizy swoistości oznaczono ocenianym testem 2058 próbek pochodzących z bieżących badań krwiodawców, prowadzonych dwoma testami odniesienia wcześniej dopuszczonymi do prowadzenia badań przeglądowych. Badania wykonywano w tych samych próbkach krwi dawców w IHiT oraz centrach krwiodawstwa. W trakcie oceny każdego dnia po zakończeniu badań w Wojskowym Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa (WCKiK) oraz Regionalnym Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa (RCKiK) w Warszawie próbki transportowano do IHiT. Materiał przed wykonaniem badań był odwirowywany i następnie badany zgodnie z procedurą wykonania oznaczenia. Po zakończeniu badań w IHiT próbki przechowywano w temperaturze lodówki (2–8°C), do momentu otrzymania wyników. Oznaczenia I testem odniesienia (test immunoenzymatyczny) wykonano w WCKiK w Warszawie na 775 próbkach. Drugim testem odniesienia był test chemiluminescencji — przy jego użyciu w RCKiK w Warszawie przebadano kolejne 1283 próbki.

Do wyliczenia swoistości stosowano wzór [11]: liczba próbek prawdziwie ujemnych/ogólna liczba badanych próbek (tj. łączna liczba próbek prawdziwie ujemnych oraz fałszywie reaktywnych) \times 100%. Pozytywną i negatywną wartość predykcijną liczono w sposób następujący: pozytywna wartość predykcyjna to liczba wyników prawdziwie dodatnich/liczba wyników prawdziwie dodatnich + liczba wyników fałszywie ujemnych; negatywna wartość predykcyjna to liczba wyników prawdziwie ujemnych/liczba wyników prawdziwie ujemnych + liczba wyników fałszywie ujemnych. Oba parametry, przedziały ufności oraz istotność statystyczną liczono za pomocą arkusza kalkulacyjnego w programie Excell (Microsoft, USA) [12].

Czułość testu

Czułość testu określono przez analizę wyników badania:

— trzech paneli własnych przygotowanych przez rozcieńczenie dodatniej surowicy archiwalnej (zakażenie potwierdzone zgodnie z procedurą weryfikacyjną obowiązującą w polskim krwiodawstwie [13];

- panelu Syphilis Seroconversion Panel PSS901 (SeraCare);
- próbek reaktywnych w badaniu prospektywnym wykonanym w celu oceny specyficzności testu.

Próbki powtarzalnie reaktywne w badaniu testem Syphilis Total Ab (BIO-RAD) prowadzonym równolegle do badań przeglądowych oraz reaktywne w oznaczeniach testami odniesienia poddano procedurze weryfikacji zgodnie z algorytmem dopuszczalnym w Polsce w przypadku dawców krwi [13], tj. wykonano oznaczenia testami TPHA i WB.

Powtarzalność i odtwarzalność

Powtarzalność i odtwarzalność oceniono na podstawie wartości odchylenia standardowego (SD) i współczynnika zmienności (CV) (%) dla wartości oznaczeń sygnału S/Co trzech próbek (zdecydowanie dodatniej, słabo dodatniej oraz ujemnej), które badano 3 razy w ciągu jednego dnia (powtarzalność) i jednorazowo przez 3 kolejne dni (odtwarzalność).

Rutynowe badanie markerów zakażenia TP

W celu dalszej oceny czułości i swoistości testów przeznaczonych do wykrywania *Treponema pallidum* przeanalizowano wyniki badań przeglądowych prowadzone w WCKiK w Warszawie w okresie od 1 stycznia 2012 roku do końca czerwca 2016 roku. W tym czasie łącznie przebadano 138 612 donacji, przy czym do końca 2014 roku badania prowadzono testem Trepanostika TP rec. firmy bioMerieux (Francja) na aparacie DSX™ obejmującym zautomatyzowany system ELISA (Dynex Technologies, USA), a od początku 2015 roku testem Syphilis Total Ab, stosując aparat Evolis (BIO-RAD) (odpowiednio 89.672 i 48.940 donacji).

Badania przeglądowe w kierunku kiły oraz weryfikacja wyników powtarzalnie reaktywnych przeprowadzano zgodnie z zaleceniami IHiT [13]. Każdy wynik wstępnie reaktywny był poddawany ponownemu badaniu w dwóch powtórzeniach. Po uzyskaniu testem przeglądowym wyniku powtarzalnie reaktywnego, surowica/osocze przekazywano na badania weryfikacyjne, a pojemniki z krwią i jej składnikami niszczone.

Badania weryfikacyjne wykonano w Poradni Dermatologicznej Kliniki Dermatologii, Szpitala Klinicznego Dzieciątka Jezus w Warszawie i obejmowały testy: TPHA (do 2014 r. Celognost-Syphilis H, Siemens, w 2015 r. TPHA, Giese Diagnostics, W. Brytania, a w roku 2016 r. NADAL-TPHA, Niemcy) i test FTA ABS (Ośrodek Diagnostyczno-

-Badawczy Chorób Przenoszonych Drogą Płciową w Białymstoku). W trakcie ewaluacji systemu badania wykonywano w IHiT. Powtarzalnie reaktywne wyniki badań potwierdzano dwoma testami swoistymi: TPHA (TPHA Lateks Test, NADAL, Niemcy) oraz testem WB (*recomLine* Treponema IgG firmy MIKROGEN DIAGNOSTIK, Niemcy).

Wyniki

Swoistość

Swoistość testu Syphilis Total Ab BIO-RAD w trakcie ewaluacji w IHiT wyniosła 99,90% (2037/2039 x 100%) i była zbliżona do wartości deklarowanej przez producenta — 99,95%. Dla porównania swoistość I i II przeglądowego testu odniesienia wynosiła odpowiednio 99,84% i 99,74%.

Szczegółowe wyniki badania 2058 próbek ocenianym testem Syphilis Total Ab oraz rutynowego badania przeglądowego, oddzielnie dla testu odniesienia I i II, przedstawiono w części A i B (tab. 1). Łącznie w badaniach ocenianym testem uzyskano 2040 wyników ważnych. Dla 2037 (99,85%) próbek uzyskano wyniki niereaktywne, dla 3 (0,15%) próbek wyniki wstępnie reaktywne. Po 2-krotnym powtórzeniu badań trzech próbek wyniki powtarzalnie reaktywne uzyskano dla dwóch z nich (0,098%), dla trzeciej wyniki były niereaktywne. Dla obu próbek powtarzalnie reaktywnych otrzymano dodatnie wyniki w teście potwierdzenia TPHA (TPHA Latex Test, NADAL, Niemcy). Wynik badania w teście WB (*recomLine* Treponema IgG firmy MIKROGEN DIAGNOSTIK, Niemcy) dla jednej z tych próbek był dodatni, dla drugiej nieokreślony. Obie próbki potwierdzone w badaniach weryfikacyjnych były także powtarzalnie reaktywne w testach odniesienia (odpowiednio I i II).

Czułość testu

- W panelu własnym (tab. 2) wszystkie próbki były zgodnie reaktywne w teście ocenianym oraz w teście odniesienia (zgodność 100%), zatem nie stwierdzono różnic w czułości między testem Syphilis Total Ab a testami obecnie stosowanymi do prowadzenia badań przeglądowych u polskich dawców krwi.
- W panelu rozcieńczeń (ryc. 1) w teście Syphilis Total Ab dla wszystkich próbek otrzymano wyniki reaktywne (10/10), podczas gdy w badaniu testem odniesienia wyniki 4 próbek były ujemne, co może wskazywać na większą czułość testu ocenianego.
- Na rycinie 2 można zauważyć, że wyniki oznaczeń próbek nr 1–6, obejmujących rozcieńcze-

Tabela 1. Wyniki równoległych badań próbek krwiodawców testem Syphilis Total Ab oraz testami odniesienia I i II

Table 1. Results of parallel testing of donor samples with Syphilis Total Ab and I and II reference tests

A.

Liczba próbek	Test oceniany Syphilis Total Ab	I Test odniesienia
Niereaktywnych	1.263 (99,84%)	1.280 (99,77%)
IR	2	3
NRR	1	0
RR	1(0,079%)	3
W tym RR: potwierdzonych TPHA i WB	1 ^ (0,079%)	1 ^

^ próbka reaktywna w teście ocenianym i I teście odniesienia

B.

Liczba próbek	Test oceniany Syphilis Total Ab	II test odniesienia
Niereaktywnych	774 (99,87%)	773 (99,74%)
IR	1	2
NRR	0	0
RR	1 (0,129%)	2
W tym:		
RR niepotwierdzonych testem TPHA i/lub WB	0	1
RR potwierdzonych testem TPHA i/lub WB	1* ^ (0,129%)	1 ^

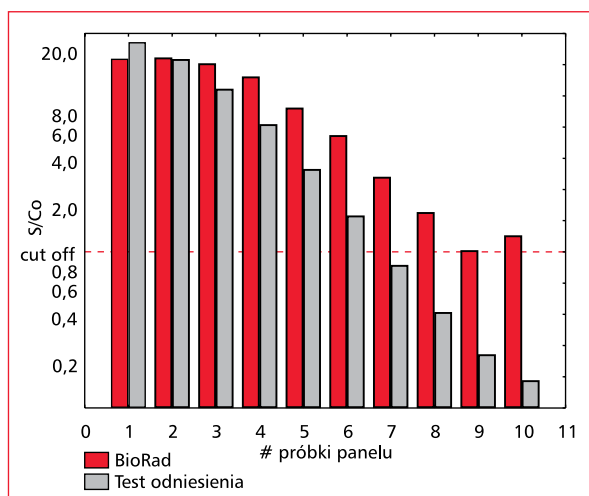
*Wynik TPHA dodatni, WB nieokreślony; ^ próbka reaktywna w teście ocenianym i II teście odniesienia
 IR — wynik wstępnie reaktywny; RR — wynik powtarzalnie reaktywny; NRR — niepowtarzalnie reaktywny

Tabela 2. Porównanie wyników badania próbek panelu własnego (próbki archiwalne od dawców z potwierdzonym zakażeniem krętkiem bladym) testem Syphilis Total Ab oraz I testem odniesienia

Table 2. Comparison of own panel testing (archive samples from donors with confirmed infection) with Syphilis Total Ab and reference test I

Numer próbki	Wyniki w teście			
	Ocenianym Syphilis Total Ab		Odniesienia (I)	
	S/CO	Wynik	S/CO	Wynik
1	18,07	Reaktywny	14,53	Reaktywny
2	19,14	Reaktywny	10,44	Reaktywny
3	19,13	Reaktywny	8,45	Reaktywny
4	17,72	Reaktywny	5,94	Reaktywny
5	14,51	Reaktywny	4,78	Reaktywny
6	5,85	Reaktywny	9,61	Reaktywny

nia od 1:2 do 1:64, były reaktywne zarówno w ocenianym teście, jak i w teście, z którym go porównywano, natomiast trzy kolejne próbki obejmujące rozcieńczenia od 1:128



Rycina 1. Porównanie wyników równoległego badania komercyjnego panelu rozcieńczeń (PSS901 SeraCare) anti — *Treponema pallidum* testem Syphilis Total Ab oraz testem odniesienia I

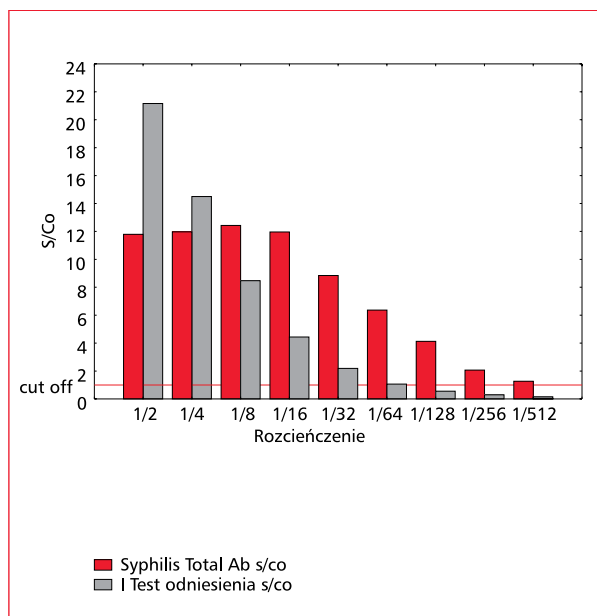
Figure 1. Comparison of the results of a parallel study of commercial panel dilution (PSS901 SeraCare) anti — *Treponema pallidum* Syphilis Total Ab and reference test I

do 1:512 były reaktywne wyłącznie w teście ocenianym.

- Na rycinie 3 przedstawiono wyniki badania próbek panelu serokonwersji (PSS901 SeraCare), na których nie obserwuje się różnic między testem badanym a testem odniesienia. Wyniki oznaczeń próbek nr 1–5 były niereaktywne w obu testach. Próbki nr 6–9 były natomiast reaktywne w ocenianym teście oraz w teście odniesienia.

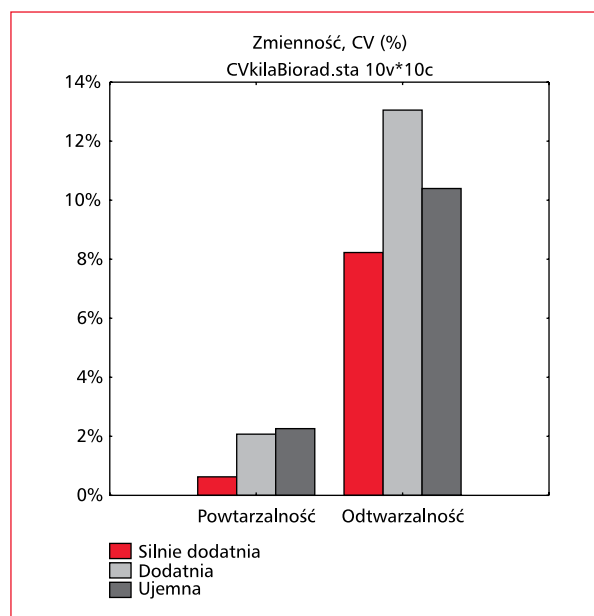
Powtarzalność i odtwarzalność

Na rycinie 4 przedstawiono wyniki oznaczeń powtarzalności i odtwarzalności sygnału S/CO dla testu Syphilis Total Ab (BIO-RAD). Współczynnik zmienności CV dla powtarzalności nie przekraczał 10%, natomiast dla odtwarzalności wynosił 8,23–13,05%, co wskazuje na mniejszą stabilność S/CO w próbkach słabo reaktywnych i ujemnych.



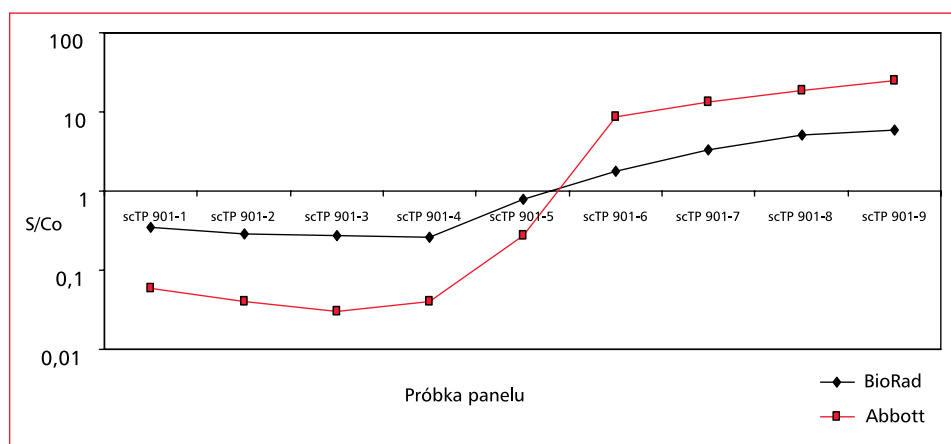
Rycina 2. Porównanie wyników oznaczeń testem ocenianym Syphilis Total Ab i I testem odniesienia próbek panelu rozcieńczeniowego

Figure 2. Comparison of results for Syphilis Total Ab and reference test I for samples of dilution panel



Rycina 4. Powtarzalność i odtwarzalność wartości sygnału S/Co dla ocenianego testu Syphilis Total Ab

Figure 4. Repeatability and reproducibility of the S/Co signal for the evaluated Syphilis Total Ab test



Rycina 3. Ocena czułości testu Syphilis Total Ab na podstawie badania panelu PSS901 SeraCare i porównania z I testem odniesienia

Figure 3. Evaluation of Syphilis Total Ab sensitivity based on the study of PSS901Sera Care panel and comparison with reference test I

Tabela 3. Wyniki badania dawców krwi po wdrożeniu testu Syphilis Total Ab do rutynowych badań przeglądowych w WCKiK**Table 3.** Results of donor screening following implementation of Syphilis Total Ab for routine use in Warsaw Military Blood Transfusion Center (WCKiK)

Rok (test)	2012 r. (test A)	2013 r. (test A)	2014 r. (test A)	2015 r. (test B)	01–06.2016 r. (test B)
Liczba przebadanych donacji	28 200	30 554	30 918	31 946	16 994
RR	53	73	63	9	6
Liczba (%) potwierdzonych donacji	6* (0,02%)	8* (0,03%)	8* (0,03%)	7* (0,02%)	6* (0,04%)
	0** (0%)	2** (0,0065%)	3** (0,0097%)	2** (0,0063%)	4** (0,023%)

*Uwzględniono donacje powtarzalnie reaktywne potwierdzone przynajmniej w jednym teście weryfikacyjnym

**Uwzględniono donacje powtarzalnie reaktywne potwierdzone wyłącznie w dwóch testach weryfikacyjnych
Test A — Trepanostika TP rec. firmy bioMerieux; Test B — Syphilis Total Ab firma BIO-RAD

Rutynowe badania przeglądowe w kierunku anty-*Treponema pallidum* w WCKiK

W tabeli 3 przedstawiono wyniki rutynowych badań w kierunku kiły wykonane w okresie od 1 stycznia 2012 roku do końca czerwca 2016 roku w WCKiK w Warszawie. W analizowanym okresie po przebadaniu łącznie 138 612 donacji zidentyfikowano 11 osób, u których potwierdzono swoistość pierwotnego powtarzalnie reaktywnego wyniku badania przeglądowego (0,0079%) (tab. 3). Szczegółowe wyniki dotyczące donacji powtarzalnie reaktywnych, dla których przynajmniej jeden test weryfikacyjny dawał wynik dodatni, przedstawiono w tabeli 4.

W przypadku testu A 11–13% spośród próbek powtarzalnie reaktywnych potwierdzano w trakcie badania weryfikacyjnego, natomiast w przypadku testu B odsetek ten był wyższy i wynosił 81–100%.

Na podstawie danych z tabeli 3 wyliczono swoistość oraz wartość predykcyjną pozytywną w poszczególnych latach. Wyniki przedstawiono na rycinie 5.

Po przebadaniu blisko 90 tysięcy donacji swoistość testu bioMerieux Trepanostika TP rec. wynosiła 99,79%, przedział ufności 95% (CI 95%): 99,76–99,82% (lub 99,81%), jeśli uznać, że wynik został potwierdzony, gdy tylko jeden z dwóch testów weryfikacyjnych był dodatni, a testu ocenianego po zbadaniu niespełna 49 tysięcy donacji — 99,98%, CI 95%: 99,97–99,99% (99,99%). Różnice w częstości wyników swoistych nie były istotne statystycznie ($\chi^2 = 78,50$, $p < 0,05$). Wartość predykcyjna pozytywna testu Syphilis wynosiła 40%, CI 95%: 16,34–67,71% i była istotnie statystycznie wyższa ($\chi^2 = 31,59$, $p < 0,05$) w porównaniu z testem Trepanostika TP rec., dla

którego parametr ten miał wartość 2,65%, CI 95%: 0,86–6,07%.

W tabeli 4 przedstawiono dane dotyczące wyłącznie próbek dodatnich przynajmniej w jednym teście potwierdzenia.

Wyniki

Charakterystyka systemu Evolis

W systemie Evolis automatycznie są wykonywane następujące czynności:

- przygotowywanie listy próbek do badań na podstawie skanowania kodów kreskowych umieszczonych na próbkach;
- pipetowanie materiału;
- dodawanie odczynników w kolejnych etapach badania;
- płukanie płytki oraz bezpośredni odczyt absorbancji.

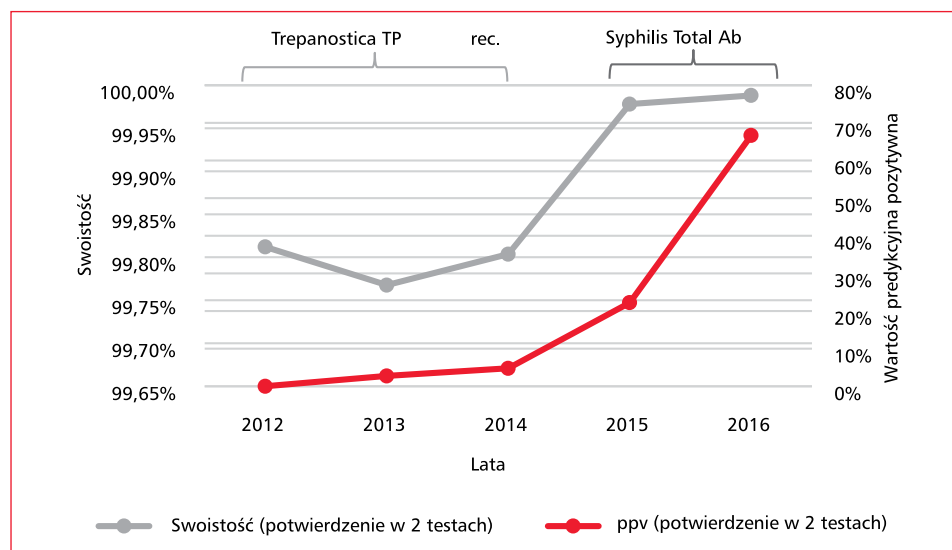
Codzienna praca wymaga wykonania niewielu czynności przygotowawczych, takich jak przygotowanie wybranych odczynników, zaprogramowanie badania, umieszczenie w aparacie próbek, materiałów zużywalnych oraz odczynników. Wykonanie badania pełnej płytki (91 oznaczeń, nie licząc próbek kontrolnych) zajmuje około 2,5 godziny od rozpoczęcia badania do uzyskania wyników. Aparat pozwala dokładnie ocenić czas zakończenia badania.

Wyniki oznaczeń przeprowadzonych na płytce są dostępne po zakończeniu ostatniego z zaprogramowanych badań. Elementy składowe płytki są materiałami jednorazowymi, zużyte paski z płytki nie mogą być wykorzystane ponownie, na przykład do nastawienia badań powtórnych/dodatkových w niewykorzystanych dołkach reakcyjnych. W przypadku uzyskania wyniku reaktywnego badania powtórne/dodatkové muszą być wykonane w dołkach nie-

Tabela 4. Wyniki badań weryfikacyjnych wykonanych u dawców, u których otrzymano wyniki powtarzalnie reaktywne w badaniu przeglądowym w kierunku *Treponema pallidum***Table 4.** Results of verification tests for donors found repeat reactive in *Treponema pallidum* screening

2012 r. (potwierdzonych 0)				
Dawca	Test przeglądowy		Testy potwierdzenia	
	S/Co	TPHA	FTA ABS	FTA
1	7,75	3+	+/-	-
2	7,50	+	+/-	-
3	3,76	+	+/-	-
4	6,97	3+	+/-	-
5	1,23	+	-	-
6	5,55	+	+/-	-
2013 r. (potwierdzonych 2)				
Dawca	S/Co	TPHA	FTA ABS	FTA
1	3,68	2+	+/-	-
2	34,69*	3+	+	+ (1/450)
3	6,54	3+	-	-
4	5,33	3+	-	-
5	6,71	3+	-	-
6	4,78	3+	+/-	-
7	4,68	3+	+	+ (1/1300)
8	2,99	3+	+/-	-
2014 r. (potwierdzonych 3)				
Dawca	S/Co	TPHA	FTA ABS	FTA
1	1,99	+	+	+ (1/1300)
2	6,82	+	-	-
3	7,56	3+	+	+ (1/150)
4	7,04	3+	+/-	-
5	3,01	3+	+	+ (1/1300)
6	6,10	3+	-	-
7	6,24	3+	+/-	-
8	4,00	+	-	-
2015 r. (potwierdzonych 2)				
Dawca	S/Co	TPHA	FTA ABS	FTA
1	8,96	3+	-	-
2	8,56	3+	-	-
3	8,87	+	-	-
4	10,59	+	-	-
5	5,14	+	+/-	-
6	4,01	+	+	+ (1/4000)
7	6,43	+	+	+ (1/150)
2016 r. (potwierdzonych 4)				
Dawca	S/Co	TPHA	FTA ABS	FTA
1	6,85	2+	+/-	-
2	3,87	3+	+	+ (1/450)
3	6,96	+	-	-
4	2,60	3+	+	+ (1/4000)
5	11,51	3+	+	+ (1/150)
6	10,69	3+	+	+ (1/150)

*Architect, ABBOTT, RCKiK Warszawa, po wezwaniu badanie wykonane w WCKiK: S/Co — 5,47



Rycina 5. Swoistość oraz wartość predykcyjna pozytywna badania przeglądowego *Treponema pallidum* w WCKiK w latach 2012–2016 (do końca 2014 r. badania prowadzono testem Trepanostika TP rec. firmy bioMerieux, a od 2015 r. testem Syphilis Total Ab firmy BIO-RAD)

Figure 5. Specificity and positive predictive value of *Treponema pallidum* screening in WCKiK in 2012–2016. Until the end of 2014 screening was performed with Trepanostika TP rec. bioMerieux; since 2015 with Syphilis Total Ab BIO-RAD)

używanych wcześniej pasków, umieszczonych w ramce płytki.

Test Syphilis Total Ab BIO-RAD, oceniany w badaniach równoległych, w porównaniu z testami odniesienia obecnie stosowanymi do badań przeglądowych u polskich dawców krwi, wykazywał:

- porównywalną (do I testu odniesienia) czułość w badaniach próbek panelu serokonwersji oraz w badaniach przeglądowych (test odniesienia I i II);
- wyższą czułość w 2 z 3 paneli rozcieńczeń, w porównaniu z testem wykorzystującym chemiluminescencję (I test odniesienia);
- wysoką swoistość (99,95%), mieszczącą się w zakresie deklarowanym przez producenta testu (99,4–100%);
- zgodność wyników badania próbek dodatnich z wynikami testów przeglądowych obecnie stosowanymi w polskim krwiodawstwie opartymi na metodzie chemiluminescencji oraz EIA;
- odpowiednią powtarzalność i odtwarzalność sygnału S/Co dla próbek dodatnich.

Poczynione obserwacje pozwalają wyciągnąć wniosek, że oceniany test Syphilis Total Ab może być używany do badań przeglądowych u dawców krwi w Polsce, w kierunku zakażenia krętkiem bladym, a aparat typu Evolis nadaje się do automatycznego wykonywania badań przeglądowych.

Zgodnie z zaleceniami międzynarodowymi oraz krajowymi [7, 13] test może być także wykorzystywany jako test potwierdzenia, w sytuacji gdy badanie przeglądowe wykonywane jest testem opartym na innej metodzie, na przykład TPHA.

Analiza wyników rutynowych badań przeglądowych w WCKiK i porównanie ich z okresem poprzedzającym wdrożenie nowego testu wskazuje na duże znaczenie doboru testu przeglądowego nie tylko pod kątem czułości testu, ale także jego swoistości. W trakcie ewaluacji testu firmy BIO-RAD wykazano, że jego czułość jest nie mniejsza od testów dotychczas stosowanych w polskim krwiodawstwie. Podsumowanie pierwszych 18 miesięcy prowadzenia rutynowych badań testem Syphilis Total Ab firmy BIO-RAD wykazało, że charakteryzuje się on wysoką swoistością, co przekłada się na istotnie wyższą pozytywną wartość predykcyjną niż w teście poprzednio używanym. Poprawa tego parametru przyniosła przynajmniej dwie wymierne korzyści. Po pierwsze, pozwoliła na istotne zmniejszenie liczby dawców dyskwalifikowanych czasowo ze względu na nieswoiste wyniki reaktywne uzyskane w trakcie badania przeglądowego. Biorąc pod uwagę analizowane okresy, tego typu sytuacji było średnio mniej o około 50/12 miesięcy. Po drugie, dzięki zwiększeniu swoistości niszczone mniejszą liczbę pojemników ze składnikami krwi

oraz ponoszono niższe koszty badań weryfikacyjnych i kontrolnych. Uzyskanie mniejszej liczby wyników fałszywie reaktywnych ogranicza również koszty związane z kwalifikacją dawcy, zbędnymi badaniami laboratoryjnymi (badania biochemiczne, serologiczne, biologii molekularnej). Jednocześnie zwiększa się ilość krwi i jej składników, które mogą być przeznaczone do użytku klinicznego.

Nie bez znaczenia jest fakt zmniejszenia liczby dawców wzywanych do Centrum Krwiodawstwa w celu pobrania próbki kontrolnej oraz wizyty/konsultacji w gabinecie lekarskim i wypełnieniu ankiety epidemiologicznej, które mają na celu znalezienie źródła zakażenia choroby przenoszonej drogą płciową. Takie sytuacje są przyczyną istotnego niepokoju dawcy.

Należy również pamiętać, że nałożenie dyskwalifikacji czasowej może prowadzić do trwałej utraty dawców spowodowanej zniechęceniem, związanym z badaniami weryfikacyjnymi.

Podsumowując, przeprowadzone badania i analizy wykazały, że test Syphilis Total Ab BIO-RAD może być używany do badań przeglądowych u dawców krwi w Polsce w kierunku zakażenia krętkiem bladym, a aparat typu Evolis nadaje się do automatycznego wykonywania badań przeglądowych.

Podczas doboru testu przeglądowego istotne są nie tylko czułość kliniczna i analityczna, ale także swoistość. Optymalny dobór ostatniego parametru może się przyczynić do istotnego zmniejszenia zniszczeń donacji z powodu wyników reaktywnych badań przeglądowych oraz znaczących oszczędności ekonomicznych.

Podziękowanie

Badania ewaluacyjne zostały sfinansowane przez Bio-Rad Polska Sp. z o.o.

Piśmiennictwo

1. Jakubowicz O. Kiła — realne zagrożenie — cz. I. *Nowiny Lekarskie* 2009, 78, 5–6: 335–338.
2. World Health Organization. Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections — 2008. Geneva: World Health Organization; 2012, <http://www.who.int/reproductivehealth/publications/rtis/stisestimates/en/index.html>.
3. <http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/syphilis/pages/annual-epidemiological-report.aspx> 2015
4. Jakubowicz O. Kiła — realne zagrożenie — cz. II. *Nowiny Lekarskie* 2010, 79; 4: 334–336.
5. Pawińska A., *Diagnostyka kily* 16, 224–230. Czynniki zakaźne istotne w transfuzjologii pod red. Brojer E., Grabarczyk P. Warszawa 2015.
6. Loeffelholz MJ, Binnicker MJ. It is time to use treponema-specific antibody screening tests for diagnosis of syphilis. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(1): 2–6, doi: [10.1128/JCM.06347-11](https://doi.org/10.1128/JCM.06347-11), indexed in Pubmed: [22090405](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22090405/).
7. Janier M, Hegyi V, Dupin N, et al. 2014 European guideline on the management of syphilis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2014; 28(12): 1581–1593, doi: [10.1111/jdv.12734](https://doi.org/10.1111/jdv.12734), indexed in Pubmed: [25348878](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25348878/).
8. Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 25 marca 2014 r. w sprawie biologicznych czynników chorobotwórczych podlegających zgłoszeniu, wzorów formularzy zgłoszeń dodatnich wyników badań w kierunku biologicznych czynników chorobotwórczych oraz okoliczności dokonywania zgłoszeń (Dz. U. poz. 459).
9. *Rocznik Statystyczny Rzeczypospolitej Polskiej* 2014; 10, 388
10. Dyrektywa 98/79/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 27 października 1998r. w sprawie wyrobów medycznych używanych do diagnozy in vitro.
11. Grabarczyk P, van Drimmelen H, Kopacz A, et al. Head-to-head comparison of two transcription-mediated amplification assay versions for detection of hepatitis B virus, hepatitis C virus, and human immunodeficiency virus Type 1 in blood donors. *Transfusion.* 2013; 53(10 Pt 2): 2512–2524, doi: [10.1111/trf.12190](https://doi.org/10.1111/trf.12190), indexed in Pubmed: [23590145](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23590145/).
12. Lalkhen A. G., McCluskey A. Clinical tests: sensitivity and specificity; <http://ceaccp.oxfordjournals.org>
13. *Medyczne zasady pobierania krwi, oddzielania jej składników i wydawania, obowiązujące w jednostkach organizacyjnych publicznej służby krwi*, pod redakcją M.Łętowskiej, wydanie III, Warszawa 2014.