

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ  
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ  
КАФЕДРА КОЖНЫХ И ВЕНЕРИЧЕСКИХ БОЛЕЗНЕЙ

**В. Г. ПАНКРАТОВ, О. В. ПАНКРАТОВ, И. А. ЕВСЕЕНКО**

# **ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА СИФИЛИСА**

Учебно-методическое пособие



Минск 2007

УДК 616.972-071(075.8)

ББК 55.81 я 73

П 16

Утверждено Научно-методическим советом университета  
в качестве учебно-методического пособия 28.03.2007 г., протокол № 7

Рецензенты: зав. каф. дерматовенерологии Гродненского государственного медицинского университета, канд. мед. наук Д. Ф. Хворик; зав. каф. клинической лабораторной диагностики Белорусской медицинской академии последиplomного образования, канд. мед. наук, доц. Т. М. Дальнова

**Панкратов, В. Г.**

П 16 Лабораторная диагностика сифилиса : учеб.-метод. пособие / В. Г. Панкратов, О. В. Панкратов, И. А. Евсеенко. – Минск : БГМУ, 2007. – 27 с.

ISBN 978-985-462-767-0.

Излагается история вопроса и современные подходы к морфологической и серологической диагностике сифилиса. Подробно изложены основные принципы постановки скрининговых (нетрепонемных) и подтверждающих диагнозов (трепонемных) серологических тестов для диагностики различных клинических форм сифилиса. Особое внимание обращено на оценку результатов лабораторных исследований, их применимость для диагностики ранних и поздних форм сифилиса, врожденного сифилиса.

Предназначается для студентов 3–4-го курсов всех факультетов, клинических ординаторов, врачей-стажеров.

**УДК 616.972-071(075.8)**

**ББК 55.81 я 73**

**ISBN 978-985-462-767-0**

© Оформление. Белорусский государственный  
медицинский университет, 2007

## Мотивационная характеристика темы

Сифилис в настоящее время представляет одну из наиболее актуальных проблем современной дерматовенерологии. Последнее десятилетие XX века характеризовалось чрезвычайно высокой заболеваемостью этой инфекцией в России, СНГ и странах Восточной Европы. В Беларуси беспрецедентный рост заболеваемости сифилисом отмечался в период с 1990 по 1996 годы с максимумом в 1996 году (более 24 000 больных), что превысило предшествующий «спокойный» уровень 1988 года более чем в 150 раз (в 1988 году — 142 больных). В 2006 году в Республике Беларусь было зарегистрировано 2635 новых случаев заражения сифилисом, то есть 27,1 сл./100 000 населения. Несмотря на наметившуюся в последние годы тенденцию к снижению заболеваемости сифилисом, эпидемиологи прогнозируют ее дальнейший рост в 2009–2011 годах. Все это накладывает большую ответственность на клиницистов, лабораторных работников и разработчиков тест-систем для диагностики сифилиса.

**Цель занятия:** помочь студентам овладеть современными знаниями по лабораторной диагностике сифилитической инфекции.

### Задачи занятия:

- усвоить основные морфологические характеристики бледной трепонемы и форм выживания возбудителя (цисты, L-формы);
- овладеть методикой темнопольной микроскопии с целью обнаружения бледной трепонемы в отделяемом сифилидов;
- усвоить принципы молекулярно-биологических методов детекции ДНК бледной трепонемы (полимеразной цепной реакции или ДНК-зондирования);
- изучить основные современные скрининговые тесты, используемые при обследовании больших групп населения на сифилис;
- проанализировать показания к назначению серологического исследования с использованием трепонемных, подтверждающих диагноз тестов, понять принципы работы этих реакций, их диагностические возможности;
- овладеть знаниями по трактовке результатов серологического исследования крови и спинномозговой жидкости при обследовании на сифилис.

**Требования к исходному уровню знаний:** студент должен знать морфологическое строение бледной трепонемы; принципы работы с микроскопом, включая работу с темнопольным конденсором; основные закономерности формирования инфекционного иммунитета; иметь понятие об антигене, антителе, комплементе; знать основные морфологические элементы сыпи при различных клинических формах приобретенного и врожденного сифилиса.

### Учебно-целевые вопросы:

1. Эпидемиологическая ситуация по заболеваемости сифилисом в Республике Беларусь.
2. Современные представления о строении бледной трепонемы.
3. Принципы и методики визуализации возбудителя сифилиса в материале из очагов поражения (прямые тесты).

4. Что включает в себя понятие «серологическая диагностика сифилиса»?
5. Понятие о специфичности и чувствительности серологических тестов.
6. Скрининговые серологические тесты, их оценка, к каким контингентам они применимы.
7. Трепонемные серологические тесты, показания к назначению, трактовка результатов.
8. Ложноположительные и ложноотрицательные серологические реакции, причины, трактовка.

## Морфология и биология возбудителя сифилиса

Возбудитель сифилиса — *бледная трепонема* (БТ) (*Treponema pallidum*) — был открыт в 1905 году F. Schaudin и E. Hoffman. Она относится к порядку Spirochaetales, семейству Spirochaetaceae, роду *Treponema*, виду *Treponema pallidum* и получила свое название из-за слабой способности воспринимать окраску. Это микроорганизм спиралевидной формы, длиной от 6 до 20 мкм и шириной от 0,1 до 0,18 мкм. Завитки спирали расположены на равном расстоянии друг от друга и имеют амплитуду 0,2–0,3 мкм.

Трепонемы отличаются характерными движениями: вращательными вокруг своей продольной оси, поступательными, маятникообразными, волнообразными, контрактильными (сгибанием спирохеты под прямым углом). Движения бледной трепонемы плавные, что является важным дифференциально-диагностическим признаком.

Трепонемы обычно размножаются поперечным делением, время деления составляет 30 ч.

Благодаря созданию электронного микроскопа познания о морфологии бледной трепонемы значительно расширились. У БТ обнаружен чехол, который предохраняет ее от вредных воздействий, антител и антибиотиков. На концах трепонемы имеются головчатые пузырчатые образования — блефаропласты, к которым прикреплены фибриллы, являющиеся органами движения. Различают поверхностные и глубокие фибриллы, отвечающие, по-видимому, за разный характер движений бледной трепонемы. На ультратонких срезах при увеличении в 150 000 раз и более, помимо наружного чехла, видна наружная стенка (имеющая три слоя) и под ней — цитоплазматическая мембрана (тоже состоящая из трех слоев). Глубже расположена цитоплазма, в которую вкраплены мелкие гранулы-рибосомы, иногда видны округлые образования сложной структуры — мезосомы и ядерная вакуоль.

В 1998 году группа исследователей из США расшифровала геном бледной трепонемы. Он представлен кольцевидной хромосомой, состоящей из 1 138 006 пар оснований, содержащих 1041 предсказанную ранее последовательность азотистых оснований, кодирующих белки, — это один из мельчайших геномов. Микроорганизм включает 42 семейства генов, ответственных за основные жизнеобеспечивающие функции: механизмы репликации ДНК, транскрипции, трансляции, энергетический метаболизм, процессы клеточного деления и секреции белков.

*Treponema pallidum* не продуцирует сильнодействующих экзотоксинов, хотя известна ее цитотоксическая активность в отношении нейробластов и других клеток. При геномном анализе БТ обнаружено 5 генов, кодирующих протеины, сходные с бактериальными гемолизинами.

БТ является облигатным паразитом и не культивируется *in vitro*, она не растет на питательных средах. Отдельным исследователям удавалось вырастить БТ таким способом, однако культуральные БТ утрачивали свою вирулентность. Это объясняет наличие небольшого генома с лимитированием процессов биосинтеза и способность выживать исключительно за счет организма хозяина.

Одной из важнейших функций БТ является движение, что обуславливает ее высокую инвазивность и возможность распространяться по жидкостям организма. Доказано, что двигательная активность бледной трепонемы обеспечивается 36 генами, кодирующими белки жгутиковых структур.

Согласно имеющимся литературным данным, существует ряд основных вариантов существования бледной трепонемы, имеющих прямое отношение к особенностям клинического течения сифилиса:

1. Типичная спиралевидная форма, мало устойчивая к действию лекарственных препаратов, и встречающаяся, как правило, на ранних стадиях инфекции.

2. Цисты бледной трепонемы, являющиеся формами устойчивого выживания и размножения, возникающие в неблагоприятных условиях существования (при наличии антител, воздействии антибиотиков) и сопровождающиеся образованием дополнительной системы оболочек.

3. Возможность существования цист покоя объясняет скрытое, длительное, вялое течение, устойчивость к лекарственным препаратам.

4. L-формы бледной трепонемы, образующиеся под влиянием антибиотиков и устойчивые к воздействиям больших доз, обладающие сниженной патогенностью и иной, чем типичные БТ, антигенной структурой. С существованием L-форм связывают скрытое, либо длительное бессимптомное течение инфекции.

Считается возможной реверсия неспиралевидных форм БТ в спиралевидные, что может объяснить появление клинических и серологических рецидивов при плохо вылеченной сифилитической инфекции.

Помимо описанных вариантов *Treponema pallidum* допускается существование фильтрующихся форм.

Разработка технологии производства рекомбинантных антигенов бледной трепонемы на основе применения генно-инженерных методов или синтетических пептидов, получаемых путем биохимического синтеза, существенно расширила знания о возбудителе сифилиса. Благодаря этим разработкам получен ряд высокоиммуногенных антигенов возбудителя сифилиса: 17, 47, 42–44, 38, 15 кД, 4 Д и др., используемых для повышения специфичности и чувствительности методов серологической диагностики сифилиса путем конструкции тест-систем на основе использования комбинаций данных антигенов в составе иммуносорбента (ИФА), на эритроцитах (РПГА) или в виде дискретных линий на нейлоновых стрипах (иммуноблотинг).

## **Методы лабораторной диагностики сифилиса**

Клинический диагноз сифилиса требует обязательного лабораторного подтверждения. Все методы лабораторной диагностики сифилиса можно условно разделить на следующие:

1. Методы непосредственного выявления возбудителя в материале из очагов поражения (прямые тесты):

- темнопольная микроскопия;
- молекулярно-биологические методы детекции ДНК бледной трепонемы (полимеразная цепная реакция или ДНК-зондирование);
- заражение кроликов инфицированным материалом от больных.

2. Методы серологической диагностики сифилиса, базирующиеся на выявлении антител к возбудителю сифилиса в сыворотке крови (или в спинномозговой жидкости).

3. Гистоморфологические методы.

### **Обнаружение бледной трепонемы методом темнопольной микроскопии**

Обнаружение бледной трепонемы в отделяемом сифилидов проводится методом микроскопирования полученных препаратов в темном поле. Исследование базируется на феномене Тиндаля: если в темное помещение пропустить через узкую щель луч солнечного света, то мелкие пылинки, невидимые при обычном освещении, начинают ярко светиться (А. Н. Родионов, Г. А. Дмитриев, Н. В. Фриго). Для выполнения исследования пользуются специальным темнопольным конденсором при объективе X40 и окуляре X10 (X15). С помощью темнопольного микроскопа проводится исследование БТ в живом виде, что позволяет дифференцировать ее от других трепонем по морфологическим признакам и характеру движения. Материалом для бактериологического исследования на бледную трепонему является тканевая жидкость (серум), поскольку БТ располагаются между волокнами соединительной ткани, вокруг лимфатических и кровеносных сосудов, в стенках и просветах лимфатических капилляров.

Исследованию на бледную трепонему подлежат все высыпания, с подозрением на первичные и вторичные сифилиды (эрозивные и язвенные шанкры, мокнущие и эрозивные папулы, широкие кондиломы на коже и слизистых оболочках рта, половых органов и анальной области). При невозможности исследования высыпаний рекомендуется проводить пункцию увеличенного регионарного лимфатического узла.

Сифилиды, подлежащие исследованию на бледную трепонему, очищают марлевым тампоном, смоченным изотоническим раствором хлорида натрия, и подсушивают обработанную поверхность сухим тампоном. Затем осторожно массируют исследуемый элемент сыпи платиновой лопаточной или вольфрамовой петлей до появления тканевой, слегка опалесцирующей жидкости. Тканевую жидкость можно получить и путем сдавливания эрозии или язвы пальцами в резиновой перчатке. Если трепонема не найдена, особенно если больной занимался местным лечением, следует назначить на 1–2 дня влажно-высыхающие повязки с изотоническим раствором хлорида натрия и затем повторить исследование.

дование. Полученный серум исследуют в нативном препарате в темном поле зрения или в виде окрашенных препаратов. Каплю полученного серозного экссудата помещают в центр тонкого обезжиренного предметного стекла и покрывают покровным стеклом, при этом капля не должна выходить за пределы последнего. Между линзой темнопольного микроскопа и покровным стеклом помещают маленькую каплю иммерсионного масла, с которой и контактирует линза микроскопа. Яркого освещения препарата добиваются поворотами зеркала и движениями тубуса микроскопа. В темном поле должны появиться движущиеся светящиеся частицы, эпителиальные клетки, лейкоциты. Бледная трепонема выглядит в виде тонкой спирали или тонкого нежного пунктира с серебристым оттенком. Она совершает плавные движения. *Treponema pallidum* следует отличать от *Tr. refringens*, которая может встречаться на половых органах и в полости рта. Последняя выглядит более толстой, имеет широкие, грубые, неравномерные завитки (5–7), отличается резкими беспорядочными движениями. А. Н. Родионов (1997) обращает внимание на необходимость дифференцировать бледную трепонему с 3 разновидностями зубных трепонем при исследовании материала из полости рта: *Tr. microdentium* (короче и толще бледной трепонемы, сильнее преломляет свет, имеет заостренные завитки, перемещается медленнее без сгибательных движений), *Tr. buccalis* (имеет от 3 до 10 широких неравномерных завитков, сильно преломляет свет, активно двигается), *Tr. vincenti* (тонкая и нежная трепонема с плоскими неравномерными 2–3 завитками, движется активно, хаотично, ярко светится).

Поскольку БТ плохо выявляется анилиновыми красками, то препараты окрашивают или по Романовскому–Гимзе или серебрением бледных трепонем по Морозову.

Г. А. Дмитриев и Н. В. Фриго (2004) отмечают, что при необходимости микроскопия возбудителя в темном поле может быть дополнена прямой реакцией иммунофлюоресценции. При этом на запарафинированные мазки или биопсийный материал накладываются меченные флюоресцирующим красителем противотрепонемные антитела, а образующиеся комплексы антиген–антитело исследуют под люминесцентным микроскопом.

Прямые методы диагностики сифилиса применимы и для подтверждения врожденного сифилиса. Для прямой визуализации бледной трепонемы в темном поле можно исследовать содержимое пузырей при ладонно-подошвенной сифилитической пузырьчатке, серума с раздраженных папул, амниотическую жидкость, выжатый сок плаценты, ткань пуповины, органы плода. (Г. А. Дмитриев, Н. В. Фриго).

### **Метод полимеразной цепной реакции**

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) позволяет выявить единственную молекулу ДНК бледной трепонемы среди сотен тысяч других молекул. Метод ПЦР, предложенный в 1983 году Кэру Mullis, заключается в амплификации (размножении) в пробирке определенных участков ДНК возбудителя в процессе повторяющихся температурных циклов. На каждом этапе вновь синтезированные молекулы копируются ферментом ДНК-полимеразой, благодаря

чему происходит многократное удвоение специфических фрагментов ДНК. Метод включает этапы денатурации ДНК, отжига праймеров и элонгации или синтеза. Под влиянием высокой температуры реакционной смеси (93–95 °С) двухцепочечные молекулы ДНК расплетаются с образованием двух одноцепочечных. Отжиг, или присоединение праймеров, происходит при температуре 60 °С. Праймерами называются специфические искусственно синтезированные нуклеотиды (фрагменты ДНК), играющие ключевую роль в образовании продуктов амплификации. При наличии искомой ДНК-мишени праймеры присоединяются к ней с двух концов в соответствии с правилом комплементарности. Если присоединение (отжиг) произошел, то термостабильный компонент (Тақ-полимераза), работающий при оптимуме температуры 72 °С, начинает достраивание второй цепи ДНК, используя имеющиеся в реакционной смеси нуклеотиды, в результате количество ДНК удваивается. В дальнейшем этапы денатурации, отжига и элонгации многократно повторяются (30 и более раз). На каждом этапе количество синтезированных копий фрагмента ДНК удваивается, то есть происходит амплификация фрагментов ДНК. Детекция этих фрагментов (то есть разделение молекул ДНК по молекулярному весу) проводится методом электрофореза в агаровом геле. ПЦР-тест для выявления ДНК бледной трепонемы был разработан в 1991 году. Метод ПЦР является высоко специфичным, чувствительным и воспроизводимым. При грамотном техническом исполнении и хорошей подготовке образцов он практически не дает ложных результатов и является оправданным для диагностики сифилиса при небольшом количестве трепонем в исследуемом материале, что особенно ценно при диагностике врожденного сифилиса. И хотя у ПЦР пока исследовательский статус, но уже в недалеком будущем эта реакция может стать ведущим лабораторным тестом в диагностике сифилиса.

### **Метод ДНК-зондирования или гибридизации нуклеиновых кислот**

Метод ДНК-зондирования или гибридизации нуклеиновых кислот базируется на использовании, как и в методе ПЦР, искусственно синтезированных нуклеотидов, которые называются не праймерами, а зондами. Вначале из образцов клинического материала выделяют ДНК, потом ее кипятят (денатурируют) и фиксируют на нитроцеллюлозном фильтре. Затем происходит этап гибридизации с ДНК-зондом, способным специфически гибридизироваться с ДНК искомого возбудителя. На концах зонда имеются метки в виде сульфоновых групп или биотина, напротив которых имеются моноклональные антитела. После окончания гибридизации фильтр проявляют иммуноферментным методом путем последовательного добавления конъюгата и субстрата. Окрашивание в соответствующих точках свидетельствует о наличии тестируемой ДНК в исследуемом образце.

### **Заражение сифилисом лабораторных животных**

Заражение сифилисом лабораторных животных как метод прямой детекции бледной трепонемы уже давно не применяется для клинической лабора-



торной диагностики из-за дороговизны, трудоемкости, длительности получения результата, необходимости содержания вивария. Наиболее чувствительным и удобным лабораторным животным для привития сифилиса является кролик. Заражение кроликов производят инокуляцией инфекционного материала в яичко. Чувствительность кроликов к инфекции *Treponema pallidum* достигает 100 %, если во взятом материале для прививки содержится достаточное количество бледных трепонем. В настоящее время данный метод используется только в крупных исследовательских центрах в качестве «золотого стандарта» для оценки чувствительности других тестов.

## Серологические методы диагностики сифилиса

Серологическими методами выявляются антитела к бледной трепонеме. Эти методы подразделяются на нетрепонемные (скрининговые) и трепонемные (диагностические).

История серологической диагностики сифилиса берет свое начало с работы А. Wasserman, А. Neisser, С. Bruck, опубликованной 10 мая 1906 года. В данном издании полагалось, что реакция связывания комплемента могла оказаться полезной для оценки состояния иммунитета у больных сифилисом, так как в качестве антигена исследователи использовали водную вытяжку из печени сифилитического плода, полагая, что там содержится много бледных трепонем. А. Wasserman и соавторы не могли в 1906 году использовать в качестве антигена культуру бледной трепонемы, так как она впервые была получена только в 1909 году. Реакция основана на феномене связывания комплемента (реакция Борде–Жангу). Она фактически выявляет аутоиммунный процесс, определяя антитела классов IgM и IgG (реагины) к липидам макроорганизма (кардиолипину, лецитину, холестерину), высвобождающимся из поврежденных бледной трепонемой клеток и тканей и имеющим перекрест с липидными антигенами БТ. Исторически это был первый нетрепонемный серологический тест на сифилис, известный в литературе как **реакция Вассермана (РВ)**.

### Нетрепонемные (скрининговые) тесты

Нетрепонемные тесты делятся на **реакцию связывания комплемента (РСК)** — реакцию Вассермана с липидными антигенами и **флокуляционные реакции**: реакцию Канна, цитохолевую реакцию Закс–Витебского, микрореакцию преципитации (МРП), VDRL, RPR, USR, TRUST. С помощью этих тестов выявляются IgM и IgG антитела (реагины) к липидам клеточной стенки бледной трепонемы, которые появляются в крови в количестве достаточном для определения примерно через неделю после появления твердого шанкра. Говоря о сроках появления в крови антител к бледной трепонеме, следует помнить, что антитела класса IgM возникают уже через 2 недели после заражения, а антитела класса IgG начинают синтезироваться в организме больного лишь спустя 4 недели после проникновения возбудителя. Серологические тесты на наличие антител (реагинов) к кардиолипину могут выявляться и при других физиологических и патологических состояниях и могут давать ложно положительные ре-

зультаты на заболевание. Поэтому *эти реакции называют нетрепонемными, и они служат в качестве первичных скрининговых тестов на сифилис.*

Скрининговые тесты имеют свои плюсы и минусы. К плюсам нетрепонемных тестов можно отнести их невысокую стоимость, сравнительно короткое время для получения ответа при постановке отдельных тестов, пригодность для проведения скрининга большого количества образцов. Кроме того, ряд современных нетрепонемных тестов выпускаются уже стандартизированными. К минусам большинства нетрепонемных тестов относят их сравнительно низкую чувствительность при первичном (70–90 %) и позднем (30–50 %) сифилисе; наличие феномена прозоны в отдельных случаях: появление ложно отрицательных или слабо положительных результатов при наличии избыточного количества антител в неразведенной исследуемой сыворотке (блокировка реакции антиген–антитело), в то время как при разведении исходной сыворотки получают резко положительные результаты; сложность, громоздкость и длительность постановки РСК. В настоящее время считается, что положительные результаты нетрепонемных тестов не могут считаться достаточными для постановки диагноза сифилитической инфекции без дополнительного подтверждения трепонемными тестами.

Нетрепонемные тесты дают ложноположительные результаты до 2,5 %, чаще у женщин. Основными причинами ложноположительных нетрепонемных тестов являются аутоиммунные заболевания (ревматизм, системная красная волчанка, системная склеродермия, узелковый периартериит, криоглобулиновая пурпура, саркоидоз), онкологические заболевания и болезни крови, некоторые вирусные и бактериальные инфекции, малярия, цирроз печени, наркомания, алкоголизм, беременность, эндокринные заболевания (сахарный диабет, аутоиммунный тиреоидит), старческий возраст и другие.

Наиболее известными нетрепонемными тестами с визуальной расшифровкой результатов исследования являются:

- реакция связывания комплемента с кардиолипидным антигеном (РСКк);
- микрореакция преципитации (МРП) с плазмой или инактивированной сывороткой;
- RPR — тест быстрых плазменных реагинов (Rapid Plasma Reagins);
- TRUST-тест с толудиновым красным и непрогретой сывороткой (Toluidin Red Unheated Serum Test).

Среди нетрепонемных тестов имеются 2 теста с микроскопическим считыванием результатов реакции:

- VDRL — тест по определению антител (Venereal Disease Research Laboratory);
- USR — тест определения активных реагинов плазмы (Unheated Serum Reagins).

В Республике Беларусь к классическим (стандартным) серологическим реакциям относится КСР. Этот комплекс реакций включает в себя реакцию связывания комплемента с кардиолипидным (экстракт из сердца быка, обогащенный лецитином и холестеринном) и трепонемным антигенами (обработанная

ультразвуком взвесь апатогенных культуральных бледных трепонем), а также микрореакцию преципитации с плазмой или инактивированной сывороткой.

### **Реакция связывания комплемента с кардиолипидным антигеном**

Данный нетрепонемный тест основан на реакции связывания компонента Борде–Жангу. У больного сифилисом кардиолипидный антиген соединяется с реактинами сыворотки крови, образуя иммунный комплекс, способный адсорбировать и связывать комплемент, а индикация образования этого комплекса (реактины–антиген–комплемент) проводится с помощью гемолитической системы, которая представляет собой оттитрованную смесь эритроцитов барана и гемолитической сыворотки. У больного сифилисом комплемент связан реактинами и поэтому комплекс «эритроциты барана + гемолитическая сыворотка + комплемент» образоваться не может и эритроциты барана выпадают в осадок (то есть реакция положительная). У здорового человека комплемент не связан в первой фазе реакции, поэтому при добавлении гемолитической системы свободный комплемент соединяется, и происходит гемолиз эритроцитов барана, при этом степень выраженности гемолиза определяется визуально и оценивается крестами:

- 4+ — полное отсутствие гемолиза — реакция резкоположительная;
- 3+ — значительная задержка гемолиза — реакция положительная;
- 2+ — значительный гемолиз — реакция слабоположительная;
- ± — небольшая задержка гемолиза, незначительная мутность содержимого пробирки — реакция сомнительная;
- полный гемолиз — реакция отрицательная.

У больных с резкоположительной реакцией (4+) проводится количественный метод Боаса, основанный на ступенчатом разведении сыворотки (1:10, 1:20, 1:40, 1:80 и т. д.). При этом титр реактинов определяется наибольшим разведением, по которому регистрируется положительный результат. Знание титра антител имеет существенное значение в диагностике клинических форм сифилитической инфекции. Титр реактиновых антител снижается после адекватной терапии, что в определенной мере позволяет судить об эффективности лечения. Модификация реакции Вассермана на холоде оказалась более чувствительной, чем в классической постановке.

Реакция Вассермана с двумя антигенами становится положительной на 5–6-й неделе после заражения у 25–60 % больных, на 7–8-й неделе — у 75–96 %, на 9–19 неделе — у 100 % пациентов. По мере развития сифилитической инфекции титр реактинов нарастает и достигает максимума (1:160–1:640 и выше) у больных вторичным свежим сифилисом, то есть с давностью инфекции 9–12 недель. По мере «старения» инфекции титры антител снижаются, и у больных вторичным рецидивным сифилисом они не превышают 1:80–1:160. При раннем скрытом сифилисе РВ положительная с высокими титрами антител (1:40–1:320 и выше) у 100 % больных, а при позднем скрытом сифилисе титры антител обычно не превышают 1:10–1:20. Положительная РВ имеет место только у 70 % больных третичным сифилисом с титрами антител, не превышающими 1:20–1:80. Поздние формы сифилиса внутренних органов и нервной системы прояв-

ляются положительными результатами РВ только у 50–80 % больных, а титры антител весьма переменны — от низких до высоких.

Основными недостатками реакции Вассермана, кроме сравнительно низкой чувствительности и наличия ложноположительных результатов, являются сложность постановки, необходимость предварительной подготовки исследуемых сывороток (прогревание) и тщательной подготовки исходных реагентов (титрование комплемента и гемолитической сыворотки, отмывка эритроцитов барана, разведение кардиолипинового антигена). Реагенты и саму реакцию сложно стандартизировать, постановка реакции в целом весьма трудоемка. В силу вышесказанного в странах Западной Европы и Америки реакцию Вассермана уже давно заменили другими стандартными нетрепонемными тестами.

### **Микрореакция преципитации с кардиолипиновым антигеном**

Микрореакция преципитации с кардиолипиновым антигеном (МРП) внедрена и применяется во всех серологических лабораториях Беларуси с 1985 года. В настоящее время она используется как отборочный тест, а также входит в состав КСР, причем в количественной постановке применяется при обследовании больных сифилисом в процессе и после окончания лечения. МРП проводится с инактивированной сывороткой крови или с плазмой в день взятия крови из пальца. Реакция ставится в качественном и количественном вариантах. Принцип МРП заключается в том, что при добавлении эмульсии кардиолипинового антигена к плазме или сыворотке крови больного сифилисом образуются хлопья преципитата белого цвета. Результаты реакции оцениваются по количеству выпавшего осадка, величине хлопьев, могут выражаться в плюсах: 4+, 3+, 2+, или быть отрицательной. Специфичность МРП составляет 98 %, а чувствительность при первичном сифилисе равна 81 %, при вторичном — только 91 %, при раннем скрытом — 94 %, то есть меньше, чем при других стандартных нетрепонемных более современных тестах, например, — RPR.

### **Быстрый плазмареагиновый тест**

Быстрый плазмареагиновый тест — RPR-тест — относится к макроскопическим нетрепонемным флокуляционным тестам. J. Portnoy и соавторы предложили данную реакцию в 1957 году для массового быстрого скрининга образцов сыворотки или плазмы в полевых условиях. Тест проводится на пластиковых планшетах с впечатанными кружочками. В 1961 году эти же авторы предложили вариант RPR-теста на специальных картонных карточках с выдавленными круглыми плоскими неглубокими лунками диаметром 18 мм. Капля исследуемого образца (неразведенная плазма или сыворотка крови) смешивается в лунке с каплей стабилизированного стандартного кардиолипинового антигена, в который добавлены частицы мелкодисперсного угля (RPR-антиген). Затем в течение 8 минут планшету вращают на орбитальном ротаторе со скоростью 100 об/мин, в результате достигается стандартизация условий равномерного перемещения нанесенных реагентов. В набор входят положительный и отрицательный контроли. Учет результатов проводится при хорошем освещении, когда еще не высохла поверхность кружка. При образовании комплексов антиген–антитело мелкодисперсные частицы угля попадают в образовавшуюся сеть

и коагулируют. Результаты RPR-теста: «положительный» — при обнаружении средних и больших агрегатов, «слабо положительный» — выявляются редкие небольшие агрегаты, «отрицательный» — ровная серая поверхность без видимых агрегатов. При положительных результатах рекомендуется исследовать RPR-тест в полуколичественной постановке (разведения от 1:2 до 1:1024). Специфичность RPR-теста составляет 98 %, чувствительность при первичном сифилисе — 86 %, при вторичном — 100 %, при скрытом раннем — 98 %, при позднем сифилисе — 73 %. Важным условием является то, что все производимые в мире RPR-наборы являются стандартизированными, что делает их результаты сопоставимыми. Вместе с тем положительные результаты RPR-теста не могут безоговорочно трактоваться как наличие сифилитической инфекции в организме исследуемого пациента без подтверждения трепонемными тестами.

### **TRUST**

TRUST (Toluidin Red Unheated Serum Test) — макрофлокуляционный не-трепонемный тест на карточках, похожий на RPR-тест. Антиген для данного теста готовится с использованием мелкодисперсной суспензии толуидинового красного. Краситель нерастворим в воде, агглютинация его в процессе флокуляции позволяет лучше и легче учитывать результат, чем в RPR-тесте. Реакция ставится с плазмой или непрогретой сывороткой, результат выдается через 8–10 минут. Специфичность теста — 99 %, чувствительность при первичном сифилисе — 85 %, при вторичном — 100 %, при раннем скрытом — 98 %. В России выпускается аналог этого теста под названием «LUES-тест» (НПО «Диагностические системы»).

TRUST-тест и RPR-тест не пригодны для исследования спинномозговой жидкости.

### **VDRL — микрофлокуляционный тест**

VDRL (Venereal Disease Research Laboratory) — микрофлокуляционный тест — ставится с инактивированной сывороткой крови (или спинномозговой жидкостью) на стеклянных пластинках с лунками. Исследуемая сыворотка и антиген смешиваются в лунке механическим вращением. Образующийся комплекс «кардиолипиновый антиген–антитело» выявляется в виде стержневидных структур под микроскопом (одинаковые объектив и окуляр  $\times 10$ ). При качественной постановке VDRL у 1–2 % больных вторичным сифилисом возможен ложноотрицательный результат (феномен прозоны). Количественная модификация постановки реакции VDRL позволяет проводить оценку эффективности лечения (после лечения идет снижение титров антител вплоть до серонегативации). Специфичность VDRL составляет около 98 %. Чувствительность реакции при первичном сифилисе — 78 %, при вторичном — 100 %, при раннем скрытом — 95 %, при позднем сифилисе — 71 %.

### **USR — микрофлокуляционный тест определения активных реагинов плазмы**

USR (Unheated Serum Reagins) — микрофлокуляционный тест определения активных реагинов плазмы. Этот тест отличается от VDRL модификацией

антигена: в него добавлены холинхлорид и ЭДТА. Этот антиген не нуждается в ежедневном приготовлении. USR-тест ставится как с непрогретой сывороткой, так и с плазмой. Считывание результатов проводится под микроскопом. Специфичность теста (по данным S. Larsen) равна 99 %, чувствительность при первичном сифилисе — 80 %, при вторичном — 100 %, при скрытом сифилисе — 95 %.

### **Трепонемные серологические тесты**

Специфические серологические тесты называются трепонемными, потому что они предполагают применение антигенов трепонемного происхождения. К ним относятся:

- реакция связывания комплемента (реакция Вассермана) с трепонемным антигеном (РСКТ);
- реакция иммобилизации бледных трепонем (РИБТ), в зарубежной литературе называемая TPI (Treponema pallidum immobilization test);
- реакция иммунофлюоресценции (РИФ), в зарубежной литературе — FTA (Fluorescent treponemal antibody). Применяется в нескольких модификациях: РИФ-200 (FTA-200), РИФ-абс (FTA-abs; FTA-abs double staining; FTA-abs-IgM; РИФ-абс-IgM; 19S-IgM-FTA-abs), РИФц — реакция иммунофлюоресценции с цельной кровью;
- реакция пассивной гемагглютинации (РПГА), в зарубежной литературе — TRHA (Treponema pallidum haemagglutination assay);
- иммуноферментный анализ (ИФА), за рубежом называемый ELISA — Enzymelinked immunosorbent assay;
- иммуноблотинг, в зарубежной литературе — Western Blot.

#### **Реакция Вассермана с трепонемным антигеном**

В качестве антигена используется ультразвученный трепонемный антиген, полученный из нескольких штаммов культуральной бледной трепонемы. Данная реакция входит в состав комплекса стандартных серологических реакций на сифилис (КСР). Имеются модификации постановки реакции Вассермана в качественном и количественном вариантах, на холоде, со спинномозговой жидкостью. Специфичность реакции равна 98 %, чувствительность — 80 %.

За рубежом реакция Вассермана с трепонемальным антигеном уже давно не применяется в клинической лабораторной практике и не входит в список стандартных тестов, рекомендованных Всемирной организацией здравоохранения. Основными причинами отказа от этой реакции, по мнению зарубежных специалистов, являются невозможность стандартизации реакции, трудоемкость постановки, необходимость подготовки компонентов реакции (антигена, комплемента, гемолитической сыворотки, эритроцитов барана), меньшая чувствительность по сравнению с новыми специфическими тестами.

#### **Реакция иммобилизации бледных трепонем**

Реакция иммобилизации БТ (РИБТ) предложена R. W. Nelson и M. M. Mayer в 1949 г. и была фактически первым специфическим тестом для диагностики

сифилиса. В качестве антигена в тесте используются живые бледные трепонемы штамма Никольса, полученные из 7–10-дневного кроличьего орхита. Реакция выявляет антитела иммобилизины, которые относятся к поздним антитрепонемным антителам. Принцип теста заключается в потере подвижности БТ в присутствии специфических антитрепонемных антител в исследуемой сыворотке и активного комплемента в анаэробных условиях. Реакция ставится с инактивированными прогреванием сыворотками или с образцами сывороток, высушенными на воощаной бумаге (сухие капли). Для оценки результатов реакции рассчитывается процент иммобилизации БТ, то есть соотношение подвижных и неподвижных трепонем в опыте (с активным комплементом) и контроле (с неактивным комплементом) по формуле:

$$\% \text{ иммобилизации} = \frac{M - C}{M} \times 100,$$

где М — количество подвижных трепонем в контроле; С — количество подвижных трепонем в опыте.

Если процент неподвижных трепонем не превышает 20 %, реакция оценивается как отрицательная, при 21–30 % иммобилизации — сомнительная, 31–50 % — слабо положительная, 51–100 % — положительная.

РИБТ мало пригодна для диагностики ранних проявлений сифилиса, так как иммобилизины появляются в крови позже реакинов. В то же время при вторичном, поздних формах сифилиса, нейросифилисе, врожденном сифилисе положительный результат РИБТ регистрируется в 95–100 % случаев. Специфичность РИБТ по данным литературы равна 99 %, чувствительность колеблется от 79 до 94 %.

Недостатки реакции: РИБТ требует работы с живыми патогенными бледными трепонемами, постановка сложна, трудоемка и дорогостояща, требует наличия вивария и высоко квалифицированного персонала. Нет возможности стандартизировать этот серологический метод. Реакция неприменима на фоне проводимой антисифилитической терапии, может давать ложноположительные результаты у больных злокачественными опухолями, диабетом, лепрой, аутоиммунными заболеваниями, пневмонией, тяжелой сердечно-сосудистой патологией. Поэтому в большинстве зарубежных стран уже почти 40 лет РИБТ используется практически не для диагностических целей, а только в научно-исследовательской работе.

### **Реакция иммунофлюоресценции**

Реакция иммунофлюоресценции (РИФ) впервые предложена в 1957 году Деасон и соавторами. В качестве антигена используется взвесь живых патогенных бледных трепонем штамма Никольс из орхита кролика, которая высушивается на предметном стекле и фиксируется ацетоном. Принцип метода: фиксированный на предметном стекле антиген обрабатывается испытуемой сывороткой, после промывания — люминесцентной сывороткой против иммуноглобулинов человека, меченой флюорохромом. При этом образующийся флюоресцирующий комплекс (античеловеческий глобулин + флюоресцеин тиоизоционат) связывается с человеческим глобулином на поверхности бледной трепоне-

мы, обеспечивая свечение БТ под люминесцентным микроскопом. Оценка результатов реакции проводится по степени свечения препарата: 4+, 3+, 2+ и отрицательный (отсутствие свечения или уровень фона — 1+). На практике для серодиагностики сифилиса используется несколько модификаций реакции иммунофлюоресценции:

1. *РИФ-200*. Исследуемая сыворотка разводится в 200 раз для уменьшения количества ложноположительных результатов. Это обеспечивает высокую специфичность реакции, но чувствительность ее несколько падает.

2. *РИФ-ц*. Реакция ставится с использованием цельной спинномозговой жидкости для выявления специфических поражений ЦНС.

3. *РИФ-абс*. Реакция иммунофлюоресценции с абсорбцией. Групповые антитела удаляются из исследуемой сыворотки с помощью разрушенных ультразвуком культуральных трепонем, что существенно повышает специфичность реакции. Поскольку исследуемая сыворотка используется в разведении 1:5, то РИФ-абс отличается высокой чувствительностью, и ее называют «золотым стандартом» серодиагностики сифилиса. РИФ-абс рекомендуется для ранней диагностики, так как реакция становится положительной уже на третьей неделе после заражения, то есть за несколько дней до появления шанкра или одновременно с ним.

4. *РИФ-абс-IgM* предложена для выявления ранних противотрепонемных антител класса IgM. Известно, что крупные молекулы IgM не могут проходить через здоровую плаценту. Следовательно, антитела класса M против БТ могут появиться в организме ребенка вследствие нарушения барьерной функции плаценты или же вырабатываться организмом ребенка, больного сифилисом. Антитела класса IgM появляются в крови зараженного инфекцией уже в первые недели болезни, а антитела класса IgG возникают позже. Раздельное определение антител обоих классов оказывается исключительно полезным при диагностике врожденного сифилиса. Наличие у ребенка на первом месяце жизни антител класса IgM будет указывать на их образование организмом больного сифилисом ребенка, в то время как выявление только антител IgG будет говорить о материнском происхождении последних. Известны 2 модификации этой реакции:

– *FTA-ABS-IgM*, основанная на использовании во второй фазе реакции конъюгата анти-IgM (меченные флюоресцеином антитела к IgM человека) вместо античеловеческого флюоресцирующего глобулина;

– российский вариант *РИФ-абс-IgM*, отличающийся тем, что к исследуемой сыворотке крови добавляется сорбент, удаляющий IgG-антитела, а с оставшимися IgM-антителами ставится РИФ-абс.

Основными показаниями к постановке *РИФ-абс-IgM* являются:

– серодиагностика врожденного сифилиса при отсутствии у ребенка манифестных проявлений врожденного сифилиса на коже и слизистых оболочках;

– дифференциальная диагностика реинфекции и клинико-серологического или серологического рецидива сифилиса, при котором РИФ-абс-IgM будет отрицательной, а РИФ-абс — положительной;



– оценка эффективности терапии раннего приобретенного или врожденного сифилиса: после адекватного лечения РИФ-абс-IgM становится отрицательной в течение ближайших 3–6 месяцев.

Постановка реакции *19S(IgM)-РИФ-абс* предполагает предварительное разделение с помощью гель-фильтрации более крупных молекул 19S IgM от фракции более мелких молекул 7S IgG. Дальнейшее исследование в реакции РИФ-абс сыворотки крови, содержащей только фракцию 19S IgM, устраняет все возможные источники ошибок. Но техника постановки данного теста сложная и трудоемкая, требует специального оборудования и подготовки специалистов. В Республике Беларусь эта реакция не ставится.

Из всех модификаций РИФ в Республике Беларусь используются РИФ-200, РИФ-абс — для исследования сыворотки крови, РИФ-ц — для исследования спинномозговой жидкости; начата работа по внедрению РИФ-абс-IgM на уровне областных и крупных городских диспансеров для диагностики врожденного сифилиса, ранних форм сифилиса и дифференциальной диагностики случаев реинфекции и серорецидива.

Чувствительность РИФ-200 и РИФ-абс оценивается 84–99 %, а специфичность — 97–99 %. В обзоре S. A. Larsen и соавт. (1995) специфичность РИФ-абс оценивается 97 % (94–100), а чувствительность при первичном сифилисе — 88 % (70–100), при вторичном и скрытом — 100 %, при позднем сифилисе — 96 %. Основными показаниями для использования РИФ в клинической практике являются диагностика скрытых и поздних форм сифилиса, выявление ложноположительных результатов КСР и МРП, особенно у беременных и соматических больных при подозрении на сифилис, для установления ретроспективного диагноза заболевания.

Вместе с тем РИФ, как и РИБТ, имеет ряд недостатков: постановка реакции сложная и трудоемкая, дороговизна готовых компонентов, в работе используется живая культура бледных трепонем, стандартизация метода требует наличия хорошо оттитрованных конъюгатов, контролей с разной степенью реактивности, стекол с мазками, содержащими достаточное количество БТ. Производительность работы за люминесцентным микроскопом ограничена из-за утомляемости глаз. Работа с кроликами требует больших затрат на содержание вивария. Бывают ложноположительные результаты РИФ у больных аутоиммунными заболеваниями, трепонематозами, лепрой, циррозом печени. Поэтому в ряде зарубежных стран РИФ-абс используют в основном в качестве референс-метода и для научно-исследовательских целей. РИФ-абс мало информативна при оценке результатов лечения: у 85 % больных, получивших адекватную противосифилитическую терапию, положительные результаты РИФ сохраняются многие годы.

### **Реакция пассивной гемагглютинации**

Реакция пассивной гемагглютинации (РПГА) была разработана Т. Rathlev в 1965–1967 годах. Антигеном в реакции выступают эритроциты барана или птиц, обработанные вначале формалином, затем танином и сенсibilизированные ультразвуковым антигеном бледной трепонемы (штамм Никольс).

Принцип теста состоит в том, что при добавлении исследуемой сыворотки в лунку с антигеном может образовываться комплекс антиген–антитело, связанный с поверхностью носителя, при наличии специфических противотрепонемных антител в сыворотке. Визуально это проявляется склеиванием эритроцитов, то есть гемагглютинацией. В данном случае имеет место непрямая или пассивная гемагглютинация, так как антиген соединяется с носителем (эритроциты барана, например), выполняющим исключительно индикаторную функцию. Агглютинация является результатом «сшивки» поверхностных молекул антигена молекулами иммуноглобулинов (теория решетки). Возможен феномен прозоны, устраняемый разведением сыворотки. Отрицательным контролем служат несенсибилизированные эритроциты (для исключения наличия антиэритроцитарных антител). В каждой серии постановок используют положительный и отрицательный контроли. Апробация метода в клинической практике показала, что он является исключительно простым, дешевым и чувствительным. Из специального оборудования для постановки данной реакции нужен лишь планшет для гемагглютинации. Результат учитывается через 45–60–120 минут визуально. При появлении агглютинации эритроциты располагаются на поверхности лунки в виде «зонтика», а при отрицательном результате — свободно соскальзывают вниз и скапливаются на дне в центре лунки в виде «пуговики».

Оценка результатов РПГА проводится по общепринятой схеме:

- 4+ — положительная реакция, эритроциты в виде «зонтика» равномерно выстилают всю поверхность лунки;
- 3+ — положительная реакция, при этом эритроциты выстилают всю поверхность лунки, но часть их «соскальзывает» к центру;
- 2+ — слабоположительная реакция, эритроциты образуют пленку на небольшом участке;
- 1+ — отрицательная реакция, эритроциты образуют рыхлый осадок на дне лунки;
- минус — отрицательная реакция, все эритроциты лежат на дне лунки в виде «пуговики» или колечка.

Разработаны количественный метод постановки РПГА, микрометод, а также автоматизированная реакция микрогемагглютинации.

Реакция становится положительной уже через 3–4 недели после заражения и сохраняется такой спустя годы после лечения. В зависимости от стадии сифилиса чувствительность РПГА составляет при первичном сифилисе — 76 %, вторичном — 100 %, скрытом раннем — 97 %, позднем сифилисе — 94 %. Специфичность — 99 %. Число ложноположительных и ложноотрицательных результатов меньше, чем при других серологических тестах. Так, ложноположительные результаты регистрировались (в сумме менее 1 %) у наркоманов, у больных инфекционным мононуклеозом, лепрой, при коллагенозах.

Преимуществами РПГА по сравнению с РИБТ и РИФ являются использование промышленных тест-систем, возможность автоматизации реакции, отсутствие необходимости работы с живой бледной трепонемой и потребности в варии. По данным литературы, РПГА стабильно заняла лидирующее место в клинической практике в большинстве стран мира (по соотношению специфич-

ности, чувствительности, простоты постановки, стандартизации реагентов, стоимости одного исследования).

### **Иммуноферментный анализ на антитела против антигенов бледной трепонемы**

Иммуноферментный анализ (ИФА) на антитела против антигенов БТ впервые был предложен в 1975 году J. Veldkamp и A. Visser, но получил известность и широкое распространение после работы С. Е. Farshy, E. F. Hunter, L. O. Hesel, S. A. Larsen (1985) как серологический метод выявления антител класса IgG к антигенам *Treponema pallidum*. В России этот метод был разработан и внедрен В. Н. Бедновой и А. В. Котровским в 1986 году. По механизму реакции, чувствительности и специфичности ИФА близок РИФ. Принцип метода заключается в выявлении сорбированного на твердой фазе (поверхность лунок пластикового планшета) специфического комплекса антиген–антитело антиглобулиновыми антителами, мечеными ферментом (пероксидазой), с помощью цветной реакции с субстратом, учитываемой количественно спектрофотометрически. Антигены, применяемые для сенсibilизации лунок полистиролового планшета, могут быть *лизатными* — полученными в результате разрушения ультразвуком БТ; *пептидными* — полученными в результате химического синтеза фрагментов белков БТ и имеющими антигенную реактивность, аналогичную исходным белкам возбудителя; *рекомбинантными* — полученными с помощью методов генной инженерии, несущими антигенные детерминанты, идентичные БТ. В сифилидологической практике обычно используется непрямой вариант ИФА.

Среди факторов, определяющих качество ИФА-наборов, важнейшими являются качество антигена (насколько полно представлены в нем антигенные детерминанты, на которые организм больного вырабатывает достаточное количество антител на разных стадиях болезни; эти антигены не должны давать перекрестных реакций с групповыми антигенами трепонем), качество конъюгата (препарата антител к отдельным классам иммуноглобулинов человека, меченных ферментом). При использовании моноклональных антител к иммуноглобулинам человека для получения конъюгата существенно снижается уровень неспецифических реакций.

Наряду с классическим непрямым ИФА, известен и метод ловушечного ИФА. Он был предложен в 1989 году O. E. Ijsselmudien и соавторами для выявления антител класса IgM к антигенам *Treponema pallidum*. Метод обладает высокой специфичностью и чувствительностью. На поверхности лунок планшета сорбированы очищенные антитела к иммуноглобулинам человека класса M и после инкубации исследуемой сыворотки все IgM связываются с носителем. Наличие же среди связанных IgM специфических для антигенов *Tr. pallidum* выявляется с помощью антигенов *Tr. pallidum*, конъюгированных с ферментом. Этот метод позволяет выявлять антитела не только IgM, но и IgG, IgA классов. Для этого лунки планшетов сенсibilизируются аффинно очищенными антителами определенного класса против иммуноглобулинов человека. При этом из сыворотки вылавливаются антитела этого класса, а выявление трепонемоспе-

цифических антител осуществляется путем их соединения с конъюгатом (связывание трепонемного антигена с ферментом). Использование ловушечного варианта иммуноферментного анализа снижает риск ложноположительных реакций, опосредованных ревматоидным фактором крови, перекрестными реакциями между IgM и IgG. При обследовании новорожденных в этом случае также исключаются ложноположительные результаты анализа, связанные с выявлением IgM, направленных против материнских антитрепонемных IgG.

Результаты ИФА могут оцениваться визуально по 4-балльной системе или инструментально в виде цифровых показателей оптической плотности, получаемых на специальных ридерах (типа Мультискан) при длине волны 492 нм.

Чувствительность различных вариантов ИФА, по данным Г. А. Дмитриева, достигает 98–100 %, а специфичность — 96–100 %.

ИФА относится к современным, перспективным методам серодиагностики сифилиса ввиду его простоты, воспроизводимости, доступности, возможности использования как в качестве отборочного, так и подтверждающего специфического трепонемного теста. Преимуществами метода ИФА являются высокая степень стандартизации, возможность автоматизации, имеет меньшую трудоемкость по сравнению с другими диагностическими тестами, короткое время постановки реакции, возможность исследования большого количества образцов сывороток. Метод позволяет одновременно определять титр противотрепонемных антител различных классов (IgM, IgG) в одном образце, пригоден для ранней диагностики приобретенного и врожденного сифилиса, для обследования доноров и может помочь в диагностике истинной серорезистентности. После окончания терапии специфические антитела класса IgM, по разным данным, исчезают через 3–9 месяцев при раннем сифилисе и через 12–18 месяцев при позднем. Их сохранение после указанного срока свидетельствует о неэффективном лечении и наличии истинной серорезистентности. Назначение дополнительного курса антибактериальной терапии в этой ситуации вполне обосновано и, как правило, приводит к эрадикации трепонемы из организма и последующей негативации серологических реакций.

Недостатками ИФА являются отсутствие унифицированных тест-систем, дороговизна метода и оснащение лабораторий специальным оборудованием, возможность получения неспецифических результатов при выявлении антитрепонемных антител класса IgM в случае использования обычных, а не ловушечных вариантов ИФА, наличие ложноположительных результатов.

### **Иммуноблотинг или Western Blot**

Линейный иммунологический анализ (иммуноблот) позволяет проводить одновременное определение антител к различным иммунодоминантным компонентам возбудителя. Суть метода в его рекомбинантном варианте заключается в помещении на нейлоновую мембрану с пластиковой основой нескольких дискретных антигенов *Treponema pallidum*, полученных генно-инженерными способами. Антитела к *Treponema pallidum* определяются по связыванию с антигенами TrN<sub>47</sub>, TrN<sub>17</sub>, TrN<sub>15</sub>, TrN<sub>41</sub>, TmpA, нанесенными на тест-полоски из нейлона в виде отдельных антигенных линий. По данным литературы, чувстви-

тельность и специфичность теста очень высоки — 99,6–100 % и 99,3–99,5 %, что позволяет рассматривать его как новый подтверждающий тест на сифилис.

## **Современные возможности серологической диагностики сифилиса**

При наличии клинических признаков первичного сифилиса (единичный или множественные твердые шанкры, одно- или двухсторонний регионарный лимфаденит) диагноз должен подтверждаться лабораторно (темнопольной микроскопией или ПЦР) обнаружением бледной трепонемы в отделяемом твердого шанкра или в пунктате регионарных лимфоузлов. Первичный сифилис характеризуется ранней выработкой специфических IgM-антител, которые обнаруживаются уже к концу 2-й недели после заражения, в то время как IgG-антитела, начинают вырабатываться только через 4 недели после заражения. Трепонемоспецифические IgM-антитела, диапазон чувствительности которых колеблется от 92 до 98 % выявляются уже на 3–4-й неделе после заражения одним из методов IgM-серологии (IgM-РИФ-абс, IgM-ИФА с ловушкой, 19S-IgM-FTA-авс, IgM-Western blot). КСР, включая МРП, может давать положительный результат через 5–6 недель с момента инфицирования (или через 2–3 недели после появления твердого шанкра) у 60–87 % больных. Повторение анализа через 5–7 дней усилит уверенность врача в правильности диагноза при позитивации МРП, КСР и положительном результате ИФА-IgG. На данном сроке РИФ-200, РИФ-абс обычно уже положительные. РИФ, ИФА, РПГА дают положительные результаты на стадии первичного сифилиса у 80–88 %.

На стадии вторичного и раннего скрытого форм сифилиса КСР, МРП, ИФА, РИФ-200, РИФ-абс, РПГА дают положительные результаты с высокими титрами антител. По мере «старения» инфекции (18–24 месяцев после заражения) титры антител по нетрепонемным тестам (РСК<sub>к</sub>, МРП) снижаются вплоть до отрицательных результатов по IgM-тестам (IgM-ИФА, IgM-РИФ-абс). После лечения больных с вторичным и ранним скрытым формами сифилиса трепонемные тесты (РИФ, РИТ, ИФА, РПГА) могут сохраняться положительными годами и десятилетиями. У больных вторичным сифилисом, особенно с мокнущими, эрозированными и гипертрофированными папулами, как правило, получают положительные результаты при исследовании отделяемого этих высыпных элементов методами темнопольной микроскопии и ПЦР. Положительные результаты при использовании этих же методик могут быть получены при исследовании пунктата лимфоузлов и спинномозговой жидкости у больных вторичным сифилисом.

При позднем скрытом, третичном и висцеральном сифилисе, позднем нейросифилисе МРП не показательна, так как может быть отрицательной, слабо положительной или положительной с низкими титрами антител. ИФА-IgG у этих больных — положительный с высокими титрами антител, а ИФА-IgM практически всегда дает отрицательный результат. Нетрепонемные тесты у этих пациентов бывают положительными у 50–70 % больных. РСК с трепонемным антигеном — положительная с низкими титрами антител. РИФ, РИБТ и

РПГА положительные практически у 100 % больных. Длительная позитивность тестов по выявлению IgM-антител скорее всего указывает на сохранность очагов персистирующей инфекции.

Диагностика нейросифилиса сегодня проводится на основании клинических признаков, результатов томографического исследования структур головного и спинного мозга (КТ или ЯМР), результатов морфобиохимических и серологических исследований спинномозговой жидкости, при этом наиболее чувствительными серологическими тестами выступают РИФ-ц, КСР, ИФА-IgG + IgM, ИФА-IgG. Б. Л. Шмидт (2003) считает, что измерение индекса РПГА, отражающего местную продукцию антител в спинномозговой жидкости, может иметь диагностическую ценность при поздних скрытых и маломанифестных формах нейросифилиса.

При раннем врожденном сифилисе (ВС) КСР, МРП, РИФ, РИБТ, РПГА и ИФА дают положительный результат. В научной литературе имеются указания на возможность детекции антител класса IgM для диагностики ВС. В Великобритании подобное исследование, например, является обязательным, причем должно проводиться при подозрении на ВС трижды (в 4, 8 и 12 недель), так как IgM-реакция может быть отсрочена или подавлена.

В Республике Беларусь при подозрении на ВС ориентироваться только на выявление у детей IgM-антител недостаточно. Возможно, с дальнейшим развитием данного направления исследований, появлением новых качественных методик и тест-систем ситуация изменится. В качестве подтверждающих реакций лучше использовать РСКт, РИФ-200, РИФ-абс, РПГА или РИБТ в сочетании с ИФА в повторных постановках у матери и ребенка. О наличии врожденного сифилиса у ребенка будут говорить положительные результаты МРП, РВ, РИФ, РПГА или РИБТ и ИФА с титрами антител на уровне материнских или выше. Помочь в диагностике раннего врожденного сифилиса могут результаты темнопольной микроскопии и ПЦР-диагностики следующих материалов: отделяемого слизистой оболочки носа ребенка при наличии сифилитического насморка, отделяемого папул и содержимого везикул (сифилитическая пузырчатка), сока плаценты, ткани пуповины и амниотической жидкости.

Лабораторное подтверждение позднего скрытого сифилиса обеспечивается, прежде всего, результатами трепонемных тестов (РИФ-200, РИФ-абс, РИБТ, ИФА-IgG и ИФА-суммарные антитела, РПГА), которые положительные и резко положительные у 100 % больных. Нетрепонемные тесты приводят к разным результатам: от положительных и слабо положительных до отрицательных.

## **Исследование спинномозговой жидкости при сифилисе**

Данные исследования СМЖ (ликвора) используются в следующих случаях:

- для определения поражения сифилисом нервной системы;
- как критерий качества лечения у лиц с патологическими изменениями в ликворе до лечения;
- как один из критериев излечения больного.

В клинической лаборатории исследуют цитоз, содержание белка, глобулиновые реакции Панди и Ноне–Апельта. В серологической лаборатории проводят реакцию Вассермана с разведениями ликвора, реакцию Ланге с коллоидным золотом, РИТ, РИФц (реакцию иммунофлюоресценции с цельным ликвором).

Количество клеток от 0 до  $5 \times 10^6$  клеток/л считается нормальным, физиологическим. Наличие от 5 до  $10 \times 10^6$  клеток/л указывает на функциональные сдвиги в реактивных элементах нервной системы, но не обязательно связанных с патологическими изменениями в ней. Наличие свыше  $10 \times 10^6$  клеток/л всегда свидетельствует о патологическом состоянии нервной системы.

В детском возрасте цитоз в норме несколько выше:

- у детей в возрасте от 7 дней до 3 месяцев колеблется в пределах  $20\text{--}25 \times 10^6$  клеток/л;
- от 3 месяцев до 1 года —  $14\text{--}15 \times 10^6$  клеток/л;
- от 1 до 5 лет —  $10\text{--}15 \times 10^6$  клеток/л;
- от 5 до 7 лет —  $8\text{--}10 \times 10^6$  клеток/л;
- от 7 до 10 лет —  $6\text{--}7 \times 10^6$  клеток/л.

У детей в возрасте свыше 10 лет, как и у взрослого человека, содержится  $4\text{--}6 \times 10^6$  клеток/л.

В нормальной спинномозговой жидкости обнаруживаются преимущественно лимфоциты. Патологические изменения цитоза характеризуются повышенным количеством клеток в ликворе — плеоцитоз и появлением других клеточных форм, помимо лимфоцитов.

Минимальные патологические изменения в СМЖ следующие: содержание белка, начиная с 0,4 ‰, цитоз —  $> 6 \times 10^6$  клеток/л, глобулиновые реакции (реакция Ноне–Апельта — ++, реакция Панди — +++), реакция Ланге — более двух двоек в цифровом значении; реакция Вассермана положительная. Показатели выше указанных, даже будучи изолированными, свидетельствуют о выраженных патологических изменениях в СМЖ. Патологической считается также СМЖ, в которой несколько показателей изменены соответственно данным минимального отклонения от нормы, а реакция Вассермана — положительная.

Для обозначения позитивности глобулиновых реакций и РВ применяется четырехкрестовая система.

Использование РИФ также целесообразно при ликвородиагностике сифилиса. Особенно высокочувствителен и специфичен тест с цельным ликвором (РИФц). РИТ СМЖ по постановке, регистрации и оценке результатов аналогична таковой при исследовании сыворотки крови. Применение РИФ и РИТ расширяет возможности определения сифилитического поражения нервной системы.

## Литература

### *Основная*

1. *Кожные и венерические болезни* : учеб. / под ред. проф. О. Л. Иванова. М. : Шико. С. 325–351.
2. *Дерматовенерология* : учеб. / под ред. Е. В. Соколовского. М. : Академия, 2005. С. 411–415, 466–471.
3. *Кожные и венерические болезни* : учеб. пособ. для студ. мед. вузов / под ред. Е. В. Соколовского. СПб. : Издательство Фолиант, 2006. С. 349–353, 427–431.
4. *Панкратов, О. В.* Современные возможности лабораторной диагностики сифилиса и трактовка результатов исследования / О. В. Панкратов, В. Г. Панкратов // *Медицинские новости*, 2006. № 12. С. 35–39.

### *Дополнительная*

1. *Сифилис* : илл. рук-во / под ред. проф. В. И. Прохоренкова. М. : Мед. книга, 2002. С. 5–10, 190–201.
2. *Дмитриев, Г. А.* Сифилис. Дифференциальный клинико-лабораторный диагноз / Г. А. Дмитриев, Н. В. Фриго. М. : Мед. книга, 2004. С. 8–45.
3. *Возможности и перспективы серологической диагностики сифилиса в Республике Беларусь* / В. Г. Панкратов [и др.] // *Здравоохранение*, 2006. № 6. С. 35–39.
4. *Достижения и перспективы изучения T. Pallidum* / А. А. Кубанова [и др.] // *Вестник дерматологии и венерологии*. 2006. № 5. С. 34–37.



## Оглавление

Мотивационная характеристика темы (В. Г. Панкратов) .....	3
Морфология и биология возбудителя сифилиса (В. Г. Панкратов).....	4
Методы лабораторной диагностики сифилиса (В. Г. Панкратов, И. А. Евсеенко) .....	6
Обнаружение бледной трепонемы методом темнопольной микроскопии (И. А. Евсеенко) .....	6
Метод полимеразной цепной реакции (И. А. Евсеенко) .....	7
Метод ДНК-зондирования или гибридизации нуклеиновых кислот (В. Г. Панкратов) .....	8
Заражение сифилисом лабораторных животных (В. Г. Панкратов) .....	8
Серологические методы диагностики сифилиса (В. Г. Панкратов, О. В. Панкратов) .....	9
Нетрепонемные (скрининговые) тесты (В. Г. Панкратов) .....	9
Реакция связывания комплемента с кардиолипидным антигеном .....	11
Микрореакция преципитации с кардиолипидным антигеном .....	12
Быстрый плазмареагиновый тест .....	12
TRUST .....	13
VDRL — микрофлокуляционный тест .....	13
USR — микрофлокуляционный тест определения активных реагинов плазмы .....	13
Трепонемные серологические тесты (О. В. Панкратов) .....	14
Реакция Вассермана с трепонемным антигеном .....	14
Реакция иммобилизации бледных трепонем .....	14
Реакция иммунофлюоресценции .....	15
Реакция пассивной гемагглютинации .....	17
Иммуноферментный анализ на антитела против антигенов бледной трепонемы .....	19
Иммуноблоттинг или Western Blot.....	20
Современные возможности серологической диагностики сифилиса (В. Г. Панкратов) .....	21
Исследование спинномозговой жидкости при сифилисе (В. Г. Панкратов) .....	22
Литература .....	24

Учебное издание

**Панкратов Валентин Гавриилович**  
**Панкратов Олег Валентинович**  
**Евсеенко Ирина Анатольевна**

# **ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА СИФИЛИСА**

Учебно-методическое пособие

Ответственный за выпуск В. Г. Панкратов  
Редактор Н. В. Тишевич  
Компьютерная верстка О. Н. Быховцевой

Подписано в печать 29.03.07. Формат 60×84/16. Бумага писчая «Снегурочка».  
Печать офсетная. Гарнитура «Times».  
Усл. печ. л. 1,63. Уч.-изд. л. 1,57. Тираж 200. Заказ 666.  
Издатель и полиграфическое исполнение –  
Белорусский государственный медицинский университет  
ЛИ № 02330/0133420 от 14.10.2004; ЛП № 02330/0131503 от 27.08.2004.  
220030, г. Минск, ул. Ленинградская, 6.