

С.Г. Марданлы, Г.А. Дмитриев

Лабораторная диагностика сифилиса

Информационно-методическое
пособие

г. Электрогорск
2011 г.

ББК 57.335.14
М25

Авторы:

С.Г. Марданлы — президент ЗАО «ЭКОлаб», академик РАМНТ, кандидат медицинских наук;

Г.А. Дмитриев — академик РАЕН, профессор ММА им. И.М. Сеченова, главный специалист ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского (Роспотребнадзор).

Марданлы С.Г., Дмитриев Г.А.

М25 Лабораторная диагностика сифилиса / С.Г. Марданлы, Г.А. Дмитриев. — Электроргорск: ЗАО «ЭКОлаб», 2011. — 24 с.

Информационно-методическое пособие предназначено для сотрудников серологических лабораторий кожно-венерологических диспансеров, акушерско-гинекологических, урологических, лечебно-профилактических учреждений, а также врачей, проводящих обследование и лечение больных сифилисом и другими ИППП.

Пособие посвящено различным аспектам лабораторной диагностики сифилиса — принципам проведения исследований клинического материала, особенностям биологии возбудителя, течения заболевания, алгоритму обследования больных, контролю качества, учету результатов диагностики.

ISBN 978-5-8311-0441-7

ББК 57.335.14

ISBN 978-5-8311-0441-7

© Марданлы С.Г., Дмитриев Г.А., 2009

ВВЕДЕНИЕ

Сифилис — хроническое инфекционное заболевание, вызываемое *Treponema pallidum* (бледная трепонема), характеризуется полиорганным поражением и стадийным прогрессивным течением.

Возбудитель сифилиса — бледная трепонема, слабо воспринимающая импрегнаторы (красители), что определило ее название, был открыт Ф. Шаундиным и Э. Гофманом в 1905 году.

Treponema pallidum, подвид *Pallidum*, относится к порядку Spirochaetales, семейству Spirochaetaceae, роду *Treponema*. Имеет спиралевидную форму с завитками (8–12), грамотрицательный анаэроб или микроаэрофил, каталазо-, уреазо-, оксидазо-отрицательный. Длина микроорганизма — 6–12 мкм, ширина — 0,1–2,0 мкм.

Бледной трепонеме свойственны четыре характерных движения: вращательное вокруг продольной оси, поступательное, сгибательно-разгибательное (маятникообразное) и контракильное (волнообразное, сократительное), что наряду с числом и формой завитков является ее дифференциальным (от других трепонем) признаком.

Бледная трепонема размножается преимущественно путем поперечного деления в течение 30–33 часов; может распространяться гематогенным и нейрогенным путем, однако наиболее интенсивное деление микроорганизма отмечено в лимфатической системе, где содержание кислорода не превышает 0,1%, тогда как в венозной и артериальной крови оно значительно выше (от 8–12% до 20%).

При неблагоприятных условиях бледные трепонемы могут существовать в виде цист, L-форм, а также найденных относительно недавно «полимебранных фагосомах».

Возможность существования зернистых и фильтрующихся форм *T.pallidum* является предметом дискуссий.

Для сифилиса характерен так называемый незавершенный фагоцитоз: благодаря особенностям структурно-функциональной организации патогенные бактерии, проникая в различные клетки-эукариоты (лимфоциты, фибробласты, мякотные периферические нервные волокна и другие), формируют иммунопротективные ниши и соответственно, не подвергаются действию Т-эффикторов, фагоцитирующих клеток, антител, антибиотиков.

Размножение и прикрепление трепонем к клеткам хозяина являются решающими факторами развития инфекции и местной воспалительной реакции; затем трепонемы мигрируют и распространяются по всему организму, определяя так называемый инкубационный период

(около 3–4 недель), при котором клинические проявления отсутствуют, а серологические реакции (выработка антител) дают, как правило, отрицательный результат. После этого в первичных локализациях возбудителя возникают очаги некротического воспаления — твердый шанкр. При неполноценной терапии или ее отсутствии начинается 2 (вторичная) стадия заболевания, а затем периоды поздних форм сифилиса.

Сифилис, как известно, передается половым путем, а важнейшим фактором проникновения бледных трепонем в организм и его инфицирования является нарушение целостности кожных и слизистых покровов и большое количество вирулентных возбудителей (массивность заражения).

Существуют также бытовое, профессиональное заражение и передача инфекционного агента при прямом переливании крови, однако эти пути не являются эпидемиологически значимыми.

Трансплацентарное заражение или инфицирование новорожденных через родовые пути больных сифилисом матерей, а также при кормлении грудью представляет серьезную опасность и диктует необходимость тщательного клинико-лабораторного исследования.

Эпидемиологическая ситуация в России в 1993–1997 гг., характеризовавшаяся резким ростом заболеваемости сифилиса (более 270 на 100 тыс. населения), вскрыла существенные недостатки клинико-лабораторного обследования и ведения пациентов. Наряду со значительным снижением в последние годы уровня заболеваемости, довольно часто диагностируют поздние формы заболевания, в том числе нейро- и висцеральный сифилис, врожденную инфекцию.

В последние годы изменилось клиническое течение сифилиса и его патоморфоз; преобладают скрытые, латентные формы заболевания. По данным специалистов, более чем в половине случаев сифилис сочетается с другими инфекциями, такими как гонорея, трихомониаз, хламидиоз. Особое внимание следует уделить вирусным инфекциям частично или преимущественно передаваемым половым путем (ИППП): герпесу, папилломавирусной инфекции, гепатитам В и С, ВИЧ-инфекции, а также туберкулезу, зачастую также протекающими одновременно с сифилисом, осложняя диагностику и лечение последнего.

Комплексная и полноценная диагностика, являющаяся неотъемлемой и наиболее объективной составляющей частью обследования и ведения больных, несомненно, будет способствовать постановке достоверного диагноза и назначению адекватной и эффективной терапии.

СЕРОДИАГНОСТИКА СИФИЛИСА

После проникновения инфекционного агента (*T.pallidum*) в организме больного начинают вырабатываться различные антитела: реагены (преципитины), агглютинины, антитела классов М и G (IgM и IgG). IgM выявляются, как считается, первыми (на 2 неделе); затем (через 6–9 недель) их концентрация снижается вследствие замены на IgG, вплоть до исчезновения. Рецидив заболевания или повторное заражение ведет к нарастанию концентрации IgM.

Иммуноглобулины G (IgG) в детектируемых количествах появляются в крови через 3–4 недели от момента заражения; концентрация их нарастает и постепенно преобладает над иммуноглобулинами М (IgM), и достигнув максимума сохраняется длительное время (годы и десятилетия) даже после проведенной терапии.

У новорожденных динамика антителообразования при сифилисе аналогична взрослым — первые антитела (IgM) плода синтезируются после 3-го месяца беременности, а инфицирование может произойти на любой стадии. Пассивно перенесенные через плаценту материнские IgG у здорового (неинфицированного) ребенка катаболизируются и исчезают через 12–18 месяцев.

Следует, однако, учитывать, что иммунная система человека весьма лабильна, подвержена всевозможным внутренним и внешним влияниям и, соответственно, сроки формирования антительного ответа при сифилисе (и других инфекциях) могут варьировать от нескольких дней до недель.

Все методы диагностики сифилиса могут быть подразделены на:

- прямые и непрямые (косвенные);
- трепонемные (специфические) и нетрепонемные (неспецифические);
- отборочные (скрининговые) и подтверждающие (диагностические);
- приборные и бесприборные.

К прямым трепонемным методам определения бледной трепонемы относят: микроскопию в темном поле зрения («темнопольную»), заражение сифилисом кроликов (rabbit infectivity-RIT), культуральную диагностику, а также методы амплификации нуклеиновых кислот — полимеразную цепную реакцию (ПЦР-анализ) и другие.

Поскольку *T.pallidum* — облигатный паразит, она чрезвычайно критична к условиям культивирования и практически не растет на искусственных питательных средах, выделение изолята (штамма) бледной трепонемы непосредственно от больного не представляется возможным.

Однако существует коллекция культуральных штаммов Рейтера, (Казань, Ставрополь и др.), используемых для изготовления антигена и научных целей.

Старейший метод прямой детекции *T.pallidum* — RIT в силу экономических, организационных трудностей, длительности в практике не используется.

Безусловным доказательством трепонемной природы заболевания является прямая визуализация бледной трепонемы с помощью «темнопольной» микроскопии. Метод применим лишь при свежих (манифестные проявления) формах сифилиса, а отсутствие количественного учета результата делает его неприменимым при ведении больных (динамика заболевания, эффективность терапии).

ПЦР-анализ, широко применяющийся при различных ИППП и других заболеваниях, не регламентирован при диагностике сифилиса. Он весьма эффективен, преимущественно при первичном и вторичном сифилисе; исследования ценности этого метода и его модификаций при других формах заболевания продолжаются.

Таким образом, основополагающей методологией диагностики сифилиса в настоящее время является серология — не прямые и прямые (трепонемные), отборочные (скрининговые), подтверждающие, специфические и неспецифические методы определения антительного ответа на внедрение возбудителя заболевания.

В соответствии с действующим Приказом МЗ РФ № 87 от 26.03.2001 «О совершенствовании серологической диагностики сифилиса») серо- и ликвородиагностика сифилиса предусматривает применение следующих реакций:

- микрореакции преципитации (МРП или МР), а также VDRL, RPR, TRUST и других модификаций на основе кардиолипинового антигена — нетрепонемные, отборочные тесты;
- реакции пассивной (непрямой) агглютинации (РПГА-TRHA, TRPA);
- реакции иммунофлуоресценции (РИФ) и ее модификаций: РИФ-абс, РИФ-200, РИФ-ц и др;
- иммуноферментного анализа (ИФА) и его модификаций; иммуноблоттинг фактически являющийся линейным ИФА не требует отдельной регламентации (в Приказе №87 не указан);
- реакции иммобилизации бледных трепонем (РИБТ или РИТ) не имеют, в силу известных обстоятельств, широкого применения (используются по определенным показаниям).

Нетрепонемные флокуляционные тесты на основе кардиолипинового антигена (сердечная мышца быка): РМП, VDRL, TRUST, USR, RPR широко используются в практике. В основе этих тестов лежит выявление антител к *T.pallidum* в реакции с антигеном, сходным по составу с антигеном клеточной стенки возбудителя (фосфолипид, лецитин,

холестерин), антитела к которому, представляющие липопротеидные образования-реагины (преципитины), формируются на ранних стадиях инфекционного процесса и достаточно быстро исчезают, особенно после окончания полноценной терапии (эффективность терапии и положительная динамика).

Эти тесты просты в исполнении, высоко эффективны, удобны в работе, особенно RPR и TRUST, обладают высокой пропускной способностью. Возможен, что важно, количественный учет результатов. Широко применяются в мире для отборочной диагностики сифилиса. Можно использовать прогретую и непрогретую сыворотку (USR) а также плазму крови (RPR и TRUST).

Реакция пассивной гемагглютинации (РПГА или TRHA, TRPA — T.pallidum particle agglutination assay) заключается в агглютинации эритроцитов, сенсibilизированных трепонемным антигеном, в присутствии специфических противотрепонемных антител в исследуемых сыворотках.

Реакции, основанные на феномене гемагглютинации просты и удобны, в постановке не требуют специального оборудования, результаты легко читаемы; тест может быть автоматизирован.

Тест применяют в качественном и количественном вариантах, а также в виде микромодификаций (МН- agglutination TP); используют таннизированные формализованные эритроциты барана или птиц (предпочтительнее), покрытые антигенами, а также синтетические частицы (TRPA), что повышает эффективность метода.

РПГА позволяет не только выявить наличие антител к T.pallidum, но и определить титр IgG-антител. Аналитическая чувствительность метода — 0,05 МЕ/мл. Все компоненты контролируются с использованием внутренней контрольной панели, подтитрованной под международный стандарт.

При исследовании сывороток и спинномозговой жидкости для предварительного разведения используется буферный раствор, содержащий экстракт из культуры штамма Рейтера для абсорбции антител к непатогенным трепонемам. Наряду с бесприборным учетом результата (визуально), тест может быть автоматизирован, что отвечает требованиям автоматизированного учета и документирования результатов. Для этого могут быть использованы отечественные системы «Эксперт-лаб» и «Критерий-2», а также зарубежные приборы (Anthos LP 400, MRX, MR 7000, Dynatech MRXII); с этой целью может быть использован и автоматический анализатор РПГА фирмы Olimpus (Япония) PK 3000.

РПГА, благодаря своей высокой эффективности, нашла широкое применение в диагностике сифилиса.

Иммуноферментный анализ (ИФА-ELISA)

В основе ИФА лежит принцип, позволяющий выявлять специфический комплекс «антиген-антитело» с помощью антител к иммуноглобулинам человека (антиIgG и анти IgM), меченых ферментом, по цветной реакции с субстратом этого фермента.

Антиген иммуносорбента (антиген, иммобилизованный на поверхности твердого носителя — лунок полистиролового планшета) в ходе инкубации с испытуемой сывороткой при наличии в ней специфических антител образует комплекс «антиген-антитело». После удаления иммуноглобулинов, несвязавшихся с антигеном иммуносорбента, следует инкубация с мечеными ферментом антителами к иммуноглобулинам человека (конъюгатом), в ходе которой конъюгат связывается с комплексом «антиген-антитело», фиксированным на иммуносорбенте. После удаления несвязавшегося конъюгата и внесения субстрата развивается ферментативная цветная реакция, интенсивность которой зависит от количества связанных сывороточных антител.

Результаты реакции регистрируют, как правило, спектрофотометрически, что исключает субъективизм при оценке анализа, хотя возможна также визуальная оценка результатов.

В зависимости от того, какие антитела использованы, тест-система выявляет в исследуемом образце или любые специфические антитела независимо от их класса, или антитела лишь определенного класса (только IgG или только IgM).

Существуют и другие схемы конструирования тест-систем для ИФА — «ловушка для антител», тест-система для выявления антирепонежных IgM, а также для выявления суммарных специфических антител, независимо от их класса.

В настоящее время используются, главным образом, рекомбинантные и пептидные ИФА-диагностикумы, позволяющие с высокой эффективностью диагностировать сифилис и огромное количество инфекций различной этиологии.

К достоинствам ИФА, кроме высокой чувствительности и специфичности, следует отнести высокую пропускную способность и возможность одновременной детекции нескольких возбудителей.

Одним из высокоэффективных методов диагностики сифилиса является иммуноблоттинг (western blot), который иногда называют линейным ИФА; он позволяет определить наличие IgG или IgM к отдельным антигенам возбудителя.

В качестве иммуносорбента в этой методике применяются рекомбинантные аналоги антигенов бледной трепонемы, содержащих иммуно-

доминантные участки белков (41кДа, 47кДа, 15кДа, 17кДа). Используя наборы для иммуноблоттинга можно осуществлять подтверждение диагноза, контроль других тест-систем, а также дифференциальную оценку антителообразования к нескольким антигенным детерминантам *T. pallidum*, что важно для диагностики различных форм, в том числе врожденного сифилиса.

В России в настоящее время используют, главным образом, зарубежные тест-системы для диагностики сифилиса с помощью иммуноблоттинга (INNOLIA Бельгия и др.), а отечественная разработка «Лайн-Блот-Сифилис» ЗАО «ЭКОлаб» находится в стадии регистрации.

Реакция иммунофлуоресценции (РИФ), считавшаяся до недавнего времени «золотым стандартом», остается довольно востребованной при диагностике сифилиса благодаря своей высокой чувствительности (серореакция визуализируется люминесцентной микроскопией). Постановка реакции, как правило, осуществляется в комплексе: РИФ-абс, РИФ-200, а также применяется РИФ-ц с капиллярной кровью из пальца, а РИФ с цельной спинномозговой жидкостью применяется, как и ИФА, для диагностики нейросифилиса.

Вместе с тем, РИФ весьма сложна при постановке — необходимо выделение культуры возбудителя (штамм Nichols) от зараженного кролика, обработка ее, приготовление контроля, оценка свечения и др.; постановка реакции и оценка результатов должна проводиться весьма квалифицированным специалистом, а, кроме того, невозможна автоматизация процесса.

В России начаты разработки по стандартизации наборов для РИФ. В частности, варианта РИФ с предварительной абсорбцией групповых трепонемных антител (РИФ-абс), и использования меченых антител к человеческим иммуноглобулинам класса М.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ СИФИЛИСА

Наряду с доступностью, простотой выполнения, высокой пропускной способностью (коротким сроком получения результата), решающим критерием при выборе метода лабораторной диагностики является его эффективность — чувствительность, специфичность, воспроизводимость.

Чувствительность метода определяется процентом положительных результатов исследования проб, заведомо содержащих специфические маркеры возбудителя (нпр., антигены возбудителя или антитела к ним).

Специфичность метода определяется процентом отрицательных результатов исследования проб, заведомо не содержащих специфические маркеры возбудителя.

Таким образом, чем выше чувствительность и специфичность, тем надежнее и достовернее метод исследования.

К важным диагностическим критериям также относится воспроизводимость результатов при повторных исследованиях одних и тех же проб.

Следует отметить, что, несмотря на значительные достижения в области высоких технологий, не существует методов, обеспечивающих 100% (абсолютную) чувствительность и специфичность во всех исследуемых биопробах.

В настоящее время в России официально регистрируются тест-системы, наборы, ингредиенты, обладающие при постановке реакции менее 95% чувствительностью и специфичностью.

Таким образом, всегда существует возможность получения неадекватного результата.

К наиболее эффективным методам следует отнести прямые методы детекции возбудителя — установление наличия в исследуемых биопробах возбудителя (ей) или его (их) компонентов (ДНК, РНК).

При диагностике сифилиса этому критерию отвечают лишь метод темнопольной микроскопии и ПЦР-анализ, применяемые при свежих формах сифилиса с определенными ограничениями.

Поскольку основными, регламентированными методами диагностики сифилиса являются серологические, вероятность ошибочного диагноза, особенно в случаях латентного, скрытого, сочетанного течения заболевания, возрастает.

Кроме того, различные методы диагностики демонстрируют различную чувствительность и специфичность в зависимости от формы и стадии сифилиса. Это в определенной мере касается и контроля за эффективностью терапии — специфические диагностические реакции длительное время остаются положительными даже после полноценной терапии.

Традиционно при диагностике сифилиса применяется комплекс методов. Неспецифические — на основе кардиолипинового антигена (РМП, RPR и другие) и специфические — на основе трепонемного антигена (РИФ, ИФА, РПГА и другие); последние, обладая наибольшей эффективностью, являются решающими при постановке лабораторного диагноза «сифилис».

Чувствительность РМП составляет 81% при первичном сифилисе, 91% — при вторичном, 94% — при скрытом сифилисе; специфичность реакции — 98%.

RPR, быстрый плазмореагиновый тест, также широко применяемый в России, обладает при 90–99% специфичности чувствительностью при первичном сифилисе около 86%, вторичном – 100%, скрытом – 98%. Так же характеризуется и аналогичный тест – TRUST (Toluidin red unheated serum test).

ИФА обладает, по мнению большинства специалистов, 98–100% чувствительностью и 96–100% специфичностью практически при любых формах сифилиса.

Чувствительность РИФ составляет более 99%, при абсолютной специфичности, то есть характеристики этих двух реакций практически совпадают.

РПГА и ее модификации демонстрируют высокую чувствительность и специфичность (99%) при поздних формах сифилиса и несколько более низкую при свежих формах заболевания, что объясняется, как и при РИТ, более поздним формированием агглютининов и иммобилизинов, соответственно.

Вместе с тем, данные о чувствительности и специфичности реакций довольно условны и связаны с квалификацией и опытом исследователя, особенно в реакциях с «ручным» исполнением.

Использование комплекса нетрепонемных и трепонемных тестов, наряду с повышением надежности диагностики, позволяет также оценивать эффективность терапии, поскольку результаты первых отражают элиминацию возбудителя в процессе терапии (негативация реакции).

Многочисленные исследования показали, что более высокотехнологичные, приборные, стандартные методы обладают более высокой диагностической эффективностью, а результаты диагностики в меньшей степени зависят от квалификации и опыта врачей лаборантов и обслуживающего персонала. Как правило, РПГА, ИФА и их модификации обладают практически абсолютной воспроизводимостью (100%).

Таким образом, регламентируемый комплекс серологических исследований – РМП (RPR и др.), ИФА и /или РПГА, при необходимости, иммуноблоттинг или РИФ, является высокоэффективной методологией, позволяющей достоверно диагностировать сифилитическую инфекцию в практическом здравоохранении, а также проводить адекватную оценку эффективности терапии.

Вектор научно-прикладных исследований должен быть направлен на оптимизацию этих методологий за счет унификации конструирования тест-систем, наборов, приборного учета результатов исследования, а также продолжения разработок прямых методов детекции бледной трепонемы в биопробах больных.

УСЛОВИЯ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для получения результатов исследования клинического материала при обследовании пациентов (больных) с подозрением на сифилис необходимо выполнение комплекса требований, предписываемых приказами, распоряжениями, методическими рекомендациями и инструкциями по применению тест-систем, ингредиентов.

В общем виде, они могут быть представлены следующим образом:

- требования к получению, транспортировке и хранению образцов биоматериала;
- требования к помещению, где проводятся исследования (анализы);
- требования к лабораторному оборудованию и инструментарию, а также реактивам;
- использование высокоэффективных методов;
- требования к штатному персоналу и квалификации сотрудников.

Все процедуры, предусматривающие получение результатов исследования биоматериала и их оценку (лабораторный диагноз), условно подразделяются на: преданалитические, аналитические (собственно лабораторные) и постаналитические.

Целью преданалитического этапа (получение биопроб от больного, транспортировка их в лабораторию и, при необходимости, хранение клинического материала) является обеспечение сохранности биопроб, т.е. исключение или минимизация действия внелабораторных факторов, препятствующих получению адекватных и достоверных результатов обследования.

Проведение этого этапа должно быть направлено на доставку биоматериала в кратчайшие сроки, а при невозможности таковой — замораживание пробы с учетом особенностей клинического материала (соскобы, цельная кровь, сыворотка, СМЖ и др.).

На этом и последующих этапах следует обращать особое внимание на биобезопасность как самих проб, так и персонала, проводящего обследование, и окружающей среды, для чего необходимо использовать современные шприцы, контейнеры, соответствующую упаковку, температурный режим и др.

Помещения лаборатории, где проводятся диагностические исследования микроорганизмов III — IV групп патогенности, к которым относится возбудитель сифилиса и возбудители ассоциированных с ним заболеваний, должны соответствовать требованиям санитарных правил

(размеры помещений, обеспечение вентиляцией, отоплением, водопроводом, канализацией, освещением, бактерицидными лампами и пр.).

Помещения микробиологических лабораторий, входящих в состав клинико-диагностических лабораторий (КЛД) должны быть изолированы от остальных помещений, а они сами разделены на «инфекционную» и «чистую» зону (раздевалка, кабинет заведующего, комната отдыха, помещение для документации и др.). Необходимо также исключить пересечение проб, использованного материала, перемещения пациентов, т.е. соблюдение «поточности» (отдельные входы и выходы). Особые требования предъявляются к помещениям, где выполняется ПЦР-анализ. Необходимо не менее трех отдельных помещений: зона обработки проб, зона приготовления реакционных смесей и амплификации, где предусмотрена защита от внутрилабораторной контаминации — «чистая» зона, зона для анализа продуктов ПЦР-анализа, электрофореза или гибридизации в планшете (при флуориметрической детекции продуктов ПЦР в этой зоне нет необходимости), а также помещение для обработки результатов, оборудованное оргтехникой и компьютером.

ИФА, РПГА весьма целесообразно выполнять в ламинарных боксах II класса биобезопасности, что одновременно позволит сэкономить площадь помещений лабораторий.

Оборудование и инструментарий, используемый для лабораторных исследований должен регулярно проверяться, в том числе метрологически, контролироваться инженерными службами, а их работа строго документироваться.

Автоматическая пипетка считается пригодной к использованию, если все измерения укладываются в допустимый интервал $\pm 5\%$, в противном случае она требует настройки.

Колебания температуры в термостате не должны превышать $\pm 1^\circ\text{C}$.

Автоматические промыватели планшетов (вошеры) должны равномерно заполнять и опорожнять все лунки планшета, соответствовать указанным в инструкции по применению тест-системы количеству промывок и времени между заполнением лунок и их опорожнением.

Необходима регулярная дезинфекция прибора (1 раз в неделю) 70% этиловым спиртом или другим, рекомендованным инструкцией раствором.

Спектрофотометры планшетные (ридеры, иммуноферментные анализаторы), используемые для получения количественной оценки результатов анализа, подлежат периодической (не реже 1 раза в год) метрологической проверке.

При постановке реакции на сифилис, наряду с регулярным контролем оборудования, следует строго соблюдать инструкции по применению тест-систем, наборов, ингредиентов, сроков и условий хранения, качественной подготовки лабораторной посуды и тестируемых образцов.

При невозможности тестирования свежеприготовленных образцов сывороток (плазмы и др.) допускается хранение биопроб не более 7 суток в холодильнике при 4 °С или замораживание их (при этом не допускается повторное замораживание и оттаивание образцов).

На получение достоверного результата ИФА определенное значение оказывает смешивание специфических компонентов из наборов разных серий, что недопустимо. Важным моментом проведения реакции является тщательная правильная отмывка планшет на каждой стадии постановки ИФА, а также соблюдение температурного режима инкубации хромогена. Продолжительность инкубации рассчитана на температуру 18–25 °С, поэтому, если температура в помещении ниже 18 °С, инкубацию следует проводить в термостате, иначе возможно искажение результатов анализа за счет снижения его чувствительности.

После окончания исследования наступает постаналитический этап, характеризующийся представлением результатов анализа, которые выдаются на соответствующих бланках, разработанных с учетом нормативных документов. Копии бланков или файлы с результатами анализов должны храниться в лаборатории, сроки выполнения должны соответствовать медицинским потребностям.

Важнейшим фактором обеспечения высокого качества проводимых лабораторных исследований является наличие опытных, квалифицированных сотрудников.

Соответствующими Приказами утверждены штат и должности медицинского персонала клинических диагностических лабораторий, проводящих исследования инфекций передаваемых половым путем (ИППП) (Приказ МЗ РФ №160 от 24.04.03), а также требования к должностным лицам (Приказы МЗ РФ №8 от 19.01.95 и №380 от 25.12.97).

Требования к персоналу включают прохождение специалистами курсов повышения квалификации не реже 1 раза в 5 лет, что необходимо для получения сертификата, обеспечивающего возможность занимать соответствующую должность в лаборатории. Сравнительно недавно такие сертификаты стали получать и лаборанты.

Периодическое повышение квалификации имеет огромное значение по причине появления все более современных высокотехнологичных методов обследования больных, появления принципиально новых

методик, оборудования, а также углубления и расширения знаний о соответствующих возбудителях.

Таким образом, строгое выполнение условий проведения анализа, знание современных методик, высокая квалификация исследователя являются определенной гарантией получения достоверных результатов при постановке диагноза «сифилис».

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Высокая ответственность при вынесении диагноза «сифилис» диктует необходимость постоянного надзора за проведением лабораторных исследований, который заключается во внутрилабораторном контроле и внешней оценке качества лабораторных исследований. Его целью является обеспечение качества (управление качеством) аналитических процедур.

Внутрилабораторный контроль качества лабораторных исследований направлен на обеспечение точности и полноты выполняемого анализа, а также на исключение или минимизацию возможных ошибок, и получения неопределенных результатов.

Такой контроль представляет собой систему обязательных мероприятий, методически адекватных профессиональным требованиям к исполнителям аналитических процедур в лабораториях медицинских учреждений.

В основу системы внутрилабораторного контроля положены мероприятия, предусмотренные государственными (национальными) стандартами РФ, отраслевыми стандартами, методическими указаниями и рекомендациями, а также стандартами данного медицинского учреждения, составленными в соответствии со Статьями 12 и 17 Федерального закона «О техническом регулировании», а также создаваемыми в последние годы СОПы (стандартные операционные процедуры).

Внутрилабораторный контроль качества лабораторных исследований клинического материала проводится с помощью контрольных материалов, в случае сифилиса — с помощью охарактеризованных сывороток крови, по результатам исследования которых устанавливают погрешность проводимого аналитического измерения.

При внутрилабораторном контроле используют материалы промышленного изготовления, в установленном порядке допущенные к применению на территории России. Такими являются, в частности, контроль-

ные лиофильно высушенные сыворотки крови (слабоположительные, отрицательные и положительные) на сифилис (ЗАО «Вектор-Бест», Россия) и аналогичные жидкие контрольные сыворотки человека или кролика (ЗАО «ЭКОлаб», Россия). В ряде лабораторий применяются в качестве контрольных материалов неиспользованные в процессе исследования образцы пациентов, давшие достоверные результаты.

Внешний контроль качества лабораторных исследований включает участие лабораторий в Федеральной системе внешней оценки контроля качества выполнения клинических анализов (ФСВОК), которая, в свою очередь, функционирует во исполнение ряда Приказов МЗ России.

Целью ФСВОК является оказание практической помощи клиничко-диагностическим лабораториям в обеспечении качества выполняемых исследований путем предоставления информации о получаемых результатах, выполненных с помощью контрольных материалов, и рекомендаций по устранению возможных источников ошибок и совершенствованию используемых методик.

Участие в ФСВОК определяется директивными документами МЗ РФ как один из обязательных компонентов деятельности КДЛ, а свидетельство об участии в ФСВОК является одним из документов, необходимых при лицензировании и аккредитации лаборатории.

Одним из основных направлений оценки качества работы лаборатории является сравнение стандартных, охарактеризованных экспертами биоматериалов (сыворотка крови и др.), направляемых в КДЛ, проводящих анализы клинического материала от пациентов, с результатами таких исследований.

ФСВОК осуществляет «обратную» связь с сотнями лабораторий, повышая уровень проводимых исследований, способствуя оптимизации лабораторной диагностики. Анализируя результаты лабораторных исследований, предоставляя информацию о современных тест-системах, ингредиентах, используемых при постановке диагноза (кодификатор реагентов), постоянно поддерживая связь с врачами-лаборантами, ФСВОК способствует снижению количества диагностических ошибок и повышает уверенность практикующих специалистов в результатах проводимых исследований.

Таким образом, мероприятия, связанные с внутри- и внешне-лабораторным контролем качества, несомненно, оптимизируют и стандартизируют лабораторные процедуры, что в конечном результате позволяет достоверно диагностировать наличие (отсутствие) сифилиса и других инфекций, передаваемых половым путем.

КОДИФИКАТОР РЕАГЕНТОВ

ИФА

Название тест-системы	Кат. №	Производитель
ИФА-антипаллидум-скрин	03.15	ЗАО «ЭКОлаб», Электрогорск
ИФА-антипаллидум-одностадийный	03.15.2	ЗАО «ЭКОлаб», Электрогорск
ИФА-антипаллидум-IgM	03.21	ЗАО «ЭКОлаб», Электрогорск
ИФА-антипаллидум-IgG	03.20	ЗАО «ЭКОлаб», Электрогорск

РИФ

Название тест-системы	Кат. №	Производитель
Сифилис-IgG-РИФ		ЗАО «ЭКОлаб», Электрогорск
Сифилис-IgM-РИФ		ЗАО «ЭКОлаб», Электрогорск

РПГА

Название тест-системы	Кат. №	Производитель
Сифилис-РПГА-тест (комплект №1)	03.06	ЗАО «ЭКОлаб», Электрогорск
Сифилис-РПГА-тест (комплект №2)	03.09	ЗАО «ЭКОлаб», Электрогорск

БЛОТ

Название тест-системы	Кат. №	Производитель
Лайн-Блот Сифилис (комплект №1)	03.22	ЗАО «ЭКОлаб», Электрогорск
Лайн-Блот Сифилис (комплект №2)	03.22.2	ЗАО «ЭКОлаб», Электрогорск

РМП

Название тест-системы	Кат. №	Производитель
Антиген кардиолипиновый для РМП	03.07	ЗАО «ЭКОлаб», Электрогорск

РСК

Название тест-системы	Кат. №	Производитель
Антиген кардиолипиновый для РСК	03.08	ЗАО «ЭКОлаб», Электрогорск

РПР

Название тест-системы	Кат. №	Производитель
Сифилис-RPR-тест-100	03.13	ЗАО «ЭКОлаб», Электрогорск
Сифилис-RPR-тест-500	03.14	ЗАО «ЭКОлаб», Электрогорск

ОШИБКИ ДИАГНОСТИКИ

Несмотря на многочисленные достоинства коммерческих диагностикумов для РПГА, ИФА и РИФ и их модификаций для диагностики сифилиса, в отдельных случаях отмечаются недостоверные результаты анализов, которые могут быть связаны как с недостаточным уровнем квалификации и профессиональной ответственности персонала (так называемые небиологические или технические ошибки), так и с особенностями тестируемых образцов (биологические ошибки).

Строго говоря, ошибки небиологического характера могут возникать на любом этапе проведения исследований: преаналитическом, аналитическом, и постаналитическом (т.е. при заборе, транспортировке, хранении биоматериала, использовании хилезной, проросшей сыворотки, при неоднократном замораживании и оттаивании тестируемых образцов, а также при использовании диагностикумов с истекшим сроком годности и т.д. (см. раздел «Условия, необходимые для проведения исследований»).

В частности, несоблюдение условий и сроков хранения диагностических наборов является причиной снижения чувствительности реакции и получения ложноотрицательных результатов. Применение плазмы крови, содержащей антикоагулянты, способные вызывать неспецифическую агглютинацию эритроцитов (РПГА), может привести к получению результатов, не подлежащих трактовке.

Ложноположительные результаты может вызвать контаминация сывороток пациентов, серонегативных в отношении бледной трепонемы, следами сывороток серопозитивных лиц, что может иметь место при приготовлении сывороток.

Непредсказуемые результаты могут быть получены при использовании уже применяемых ранее наконечников и планшетов, а также при несоблюдении объемных соотношений исследуемых сывороток и реагентов, что не позволяет достичь конечных разведений, рекомендованных Инструкциями по применению набора.

Существует множество других технических ошибок, приводящих к получению недостоверных (ложноотрицательных и ложноположительных), сомнительных результатов исследования.

В некоторых лабораториях не осуществляется внутри- и внешнелабораторный контроль качества исследований на сифилис, что ведет к получению диагностических ошибок и неуверенности врачей-лаборантов в результатах анализа.

Таким образом, одним из важнейших факторов обеспечения высокого качества проводимых исследований и минимизации ошибок

диагностики, несомненно, является наличие квалифицированных кадров — персонала лаборатории.

В определенной степени к диагностическим ошибкам следует отнести неправильную трактовку результатов исследования, что, в свою очередь, зависит, кроме вышеперечисленных, от других факторов, в частности от особенностей течения сифилиса, локализации *T.pallidum*, несовершенства тест-системы и отсутствия методов прямой детекции возбудителя сифилиса при всех формах инфекции, что является источником ошибок при постановке диагноза заболевания.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Так называемые биологические ошибки, как правило, обусловленные особенностями тестируемых образцов (сыворотка, плазма, СМЖ и др.), при сифилисе встречаются относительно редко и проявляются в получении ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

Ложноположительные результаты серологических исследований на сифилис вероятны при исследовании сывороток крови больных невенерическими трепонематозами (фрамбезия, пинта, беджель), возбудители которых (непатогенные трепонемы) обладают родоспецифическими антигенами, сходными с антигенами *T.pallidum*, в связи с чем антитела, образующиеся к ним, способны вступать в перекрестные взаимодействия с антигеном возбудителя сифилиса.

Однако Россия не является территорией, эндемичной по данной группе заболеваний, которые встречаются главным образом, в странах Африки, Латинской Америки и Южной Азии, и такие ситуации редки в практике наших лечебных учреждений.

При использовании нетрепонемных тестов (МР и ее модификаций) ложноположительные результаты могут быть обусловлены наличием в крови антител к ревматоидному фактору, перекрестно реагирующих антител при аутоиммунной патологии («кресс-реактеры»), антифосфолипидном синдроме, пожилом возрасте, беременности, обширной соматической патологии, нарушениях обмена липидов, иммунодефицитных состояниях различной этиологии, системными хроническими заболеваниями сердца, легких, а также онкологией.

Другими факторами возникновения ложноположительных результатов считаются некоторые хронические бактериальные инфекции (лепра и др.), заболевания вирусной этиологии (инфекционный мононуклеоз), системные болезни соединительной ткани и наркомания.

При этих состояниях отмечается развитие иммунологических нарушений, приводящих к аномальной продукции антител, способных перекрестно реагировать с трепонемными антигенами.

Ложноотрицательные результаты серологических специфических реакций (РПГА), вызванные биологическими факторами, могут быть обусловлены конкуренцией между специфическими IgM и IgG за связывание с антигеном на поверхности эритроцитов, а также феноменом прозоны. В последнем случае агглютинация не происходит из-за гиперпродукции антител к бледной трепонеме, поскольку каждый антиген-рецептор на эритроцитах из-за избытка антител связан с одной молекулой агглютинина, что препятствует образованию «решетки». Замена РПГА на ТРРА, т.е. эритроцитов на синтетические частицы, видимо, исключит или минимизирует получение ложноотрицательных результатов.

В ИФА такие реакции можно объяснить наличием серонегативной фазы при первичном сифилисе, а при вторичном — иммунной недостаточностью, наличием ВИЧ-инфекции. При получении отрицательного результата серологических исследований на сифилис следует учитывать свойство бледных трепонем проникать и размножаться в различных органах и тканях — поиск возбудителя в лимфе (лимфатических узлах) в ряде случаев приводит к достоверному результату. Целесообразно повторить также анализ образцов, давших положительный результат. Повторное, через 5–7 и более дней, исследование сывороток, как правило, позволяет получить достоверные результаты.

Следует отметить, что сифилис, в силу особенностей течения (хронического, скрытого, латентной инфекции) часто сочетается с другими ИППП, а также с соматическими заболеваниями. Это в свою очередь представляет определенные трудности при дифференциальной диагностике и ведении больных. Поэтому лишь квалифицированное выполнение клинико-лабораторных сопоставительных исследований позволит оптимизировать постановку диагноза и соответственно, назначить адекватную терапию и проконтролировать ее эффективность.

АЛГОРИТМ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Основой лабораторной диагностики сифилиса является положительный (отрицательный) результат исследования крови (сыворотка, плазма, цельная кровь), СМЖ в серологических реакциях, трепонемных и нетрепонемных, которые должны применяться в комплексе (Приказ МЗ РФ №87 от 26.03.01).

Нетрепонемные тесты являются отборочными и по их результатам выставлять диагноз сифилиса нельзя, он должен быть подтвержден специфическими трепонемными тестами.

Наиболее распространенными серологическими комплексами являются РПГА (ТРНА и ТРРА) с РМП или RPR и ИФА с РМП или RPR; за рубежом также широко используются VDRL и TRUST.

РПГА, ИФА, РИФ в модификациях, а также РИТ (по особым показаниям) отнесены к верифицирующим реакциям, назначением которых является диагностика всех форм сифилиса, а также распознавание ложноположительных результатов, полученных в РМП и ее модификациях.

С помощью ИФА и РПГА определяется наличие IgG, IgM, а также суммарных (М и G) антител к *T.pallidum*. Новорожденных с подозрением на ранний врожденный сифилис необходимо обследовать на наличие специфических IgM к *T.pallidum*. Положительный результат этого теста свидетельствует о присутствии в организме ребенка активного возбудителя. Максимальная концентрация IgM в крови наблюдается примерно через 2 мес после заражения, а затем в течение 6–12 мес после инфицирования начинает снижаться, вплоть до необнаруживаемых значений. IgG начинают циркулировать в крови в определяемых концентрациях через 4 недели после заражения, а затем их синтез прогрессирует и достигает максимума к 6–8 мес инфекции. Концентрация этого класса антител постепенно уменьшаясь, остается достаточной для определения с помощью ИФА или РПГА, сохраняясь в течение длительного времени, иногда и пожизненно.

Алгоритм серологических исследований на сифилис предусматривает на первоначальном этапе обследование пациента с помощью количественно выполняемых трепонемных и нетрепонемных тестов. При получении неадекватных результатов необходимо повторить исследования с помощью других методов: заменить ИФА на РПГА или наоборот, а также применить РИФ или иммуноблоттинг.

Следует использовать регламентированные методы диагностики и строго соблюдать правила выполнения исследований, инструкции к наборам при постановке реакции и учете результатов.

Исследования должны быть комплексными, а при постановке диагноза и назначении терапии следует учитывать наличие (титр) антигенового ответа на *T.pallidum*, других возбудителей ИППП, а также заболеваний органов и тканей организма больного.

На всех этапах инфекционного процесса целесообразно применять одни и те же методы диагностики и тест-системы для их выполнения, а исследования проводить в одной и той же лаборатории.

Трепонемные тесты длительное время могут оставаться положительными (крайнее замедление или отсутствие негативации серореакций) и, следовательно, особенно в первые годы, не предназначены для оценки эффективности терапии и положительной динамики инфекционного процесса.

Терапевтическую эффективность целесообразно оценивать с помощью нетрепонемных тестов, хорошо коррелирующих с элиминацией возбудителя, и при снижении титра в 4 раза (2-кратное разведение) в первые 3–4 месяцев после терапии и в 8 раз (4-кратное разведение) через 6–8 месяцев делается заключение об эффективности лечения.

Таким образом, выполнение алгоритма обследования, применение эффективной методологии и современных наборов, правильная интерпретация результатов позволяют в подавляющем большинстве случаев диагностировать сифилис, оценить эффективность терапии и прогнозировать исход инфекции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Создание современных высокотехнологичных методов лабораторного анализа оптимизировало серологическую диагностику сифилиса и других ИППП.

В настоящее время в России сформировалась отечественная база производства диагностических тест-систем, наборов, ингредиентов, оборудования, позволяющая в определенной степени не зависеть от зарубежных производителей.

Лидеры российских производителей диагностикумов — «ЭКОлаб» (Московская область), «Вектор-Бест» (Новосибирская область), «Диагностические системы» (Н.Новгород) и другие не только выпускают в промышленных объемах тест-системы и ингредиенты, не уступающие по качеству зарубежным аналогам, но и участвуют в разработке контрольных панелей сывороток, приборов, позволяющих упростить и уточнить оценку результата исследований. Таким образом, постепенно создаются научно-производственные центры, активно участвующие в разработке новых подходов к детекции возбудителей инфекций и применяющие на практике мировые достижения.

Вектор научно-прикладных исследований и разработок несомненно будет направлен на использование в медицинской практике высококачественных тест-систем для выявления антитрепонемных антител, что во многом определит уровень лабораторной диагностики сифилиса и других ИППП и повысит результативность комплексных мероприятий,

направленных на снижение заболеваемости весьма распространенных, социально значимых инфекций.

Одновременно, следует продолжить поиск эффективных, прямых методов детекции *T.pallidum* в клинических биоматериалах, базирующихся на ПЦР-анализе, его вариантах, а также био- или иммуночипах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Приказ МЗ СССР № 333 от 09.03.1987 г. «О внедрении тест-системы иммуноферментной для серодиагностики Сифилиса (ИФА).
2. Приказ МЗ РФ № 64 от 21.02.2000 г. «Об утверждении номенклатуры клинических лабораторных исследований».
3. Приказ МЗ РФ № 87 от 26.03.2001 г. «О совершенствовании серологической диагностики Сифилиса».
4. Дмитриев Г.А., Брагина Е.Е. «Вести дерматологии и венерологии» — 1996 г. № 2, Часть первая, С. 29–33; № 3, Часть вторая, С. 33–38.
5. Дмитриев Г.А. и соавторы. Иммуноферментный анализ для серодиагностики сифилиса. Пособие для врачей-серологов. — Москва, 1977 г. — С. 16.
6. Дмитриев Г.А. и соавторы. Реакция пассивной гемагглютинации для серодиагностики сифилиса. Пособие для врачей. — Москва, 1999 г. — С. 11.
7. Дмитриев Г.А., Фриго Н.В. Сифилис. Дифференциальный клинико-лабораторный диагноз. — Нижний-Новгород: Медкнига, 2004 г. — С. 364.
8. Куляш Г.Ю. Клиническая дерматология и венерология. — 2005 г. — С. 39–42.
9. Европейские стандарты диагностики и лечения заболеваний, передаваемых половым путём. — М.: Медицинская литература, 2003 г. — С. 272.
10. «Клинические рекомендации». Дерматовенерология. — М.: «Дэкс-Пресс», 2007 г. — С. 298.
11. Дмитриев Г.А., Глазко И.И. Диагностика инфекций, передаваемых половым путём. — М.: «Бином», 2007 г. — С. 319.
12. Марданлы С.Г. Лабораторная диагностика сифилиса и современные возможности инструментального учёта различных методов исследований. Доклад. — 2008 г.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3
Серодиагностика сифилиса.....	5
Эффективность современных методов диагностики сифилиса	9
Условия, необходимые для проведения исследований.....	12
Контроль качества лабораторных исследований	15
Кодификатор реагентов	17
Ошибки диагностики.....	18
Интерпретация результатов	19
Алгоритм лабораторных исследований.....	20
Заключение.....	22
Список литературы	23