

**Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы  
«Московский научно-практический Центр дерматовенерологии и косметологии  
Департамента здравоохранения города Москвы»**

**Федеральное государственное бюджетное учреждение дополнительного профессионального  
образования «Центральная государственная медицинская академия  
Управления делами Президента Российской Федерации»**

**Государственное образовательное учреждение высшего образования Московской области  
«Государственный гуманитарно-технический университет»**

**Н.Н. Потекаев, С.В. Ротанов, Н.В. Фриго,  
Г.А. Дмитриев, О.В. Доля, Н.В. Китаева,  
Л.С. Круглова, С.Г. Марданлы**

# **ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ СИФИЛИСА**

**Пособие для врачей**

**МОСКВА**

**2020**

УДК 578.827.1: 616-022.7/.9

ББК 5.53/57.55.8.55

Л 12

**Рецензент:**

**Ройтман А.П.** – профессор кафедры клинической лабораторной диагностики ГБОУ ДПО Российская академия последиplomного непрерывного образования, доктор медицинских наук, профессор.

**Потекаев Н.Н., Ротанов С.В., Фриго Н.В., Дмитриев Г.А., Доля О.В., Китаева Н.В., Круглова Л.С., Марданлы С.Г.**

**Л 12** Лабораторные методы диагностики сифилиса: пособие для врачей. – М.: Московский научно-практический Центр дерматовенерологии и косметологии, Центральная государственная медицинская академия Управления делами Президента Российской Федерации, Государственный гуманитарно-технический университет, 2020. – 88 с.  
ISBN 978-5-87471-361-4

Настоящее пособие содержит современные сведения об эпидемиологии сифилиса в городе Москве в период 2003–2018 годов в сопоставлении с данными по России в целом, клинических формах и методах лабораторных исследований, применяемых при скрининге и диагностике клинических форм сифилиса. Описаны технологии прямой детекции бледных трепонем и методы выявления антител, ассоциированных с сифилитической инфекцией, с обсуждением особенностей их использования, показаний к назначению и правилах предоставления адекватного биологического материала от обследуемых лиц.

Пособие предназначено для использования врачами-дерматовенерологами, акушерами-гинекологами, терапевтами, неврологами, инфекционистами, эпидемиологами, врачами клинической лабораторной диагностики и другими специалистами, оказывающими как первичную медико-санитарную, так и специализированную помощь населению, а также для студентов медицинских вузов, клинических ординаторов и аспирантов.

УДК 578.827.1: 616-022.7/.9

ББК 5.53/57.55.8.55

*Утверждено и рекомендовано к печати Ученым советом ГБУЗ «Московский научно-практический Центр дерматовенерологии и косметологии Департамента здравоохранения города Москвы» (протокол № 5 от 19 ноября 2019 г.)*

*Утверждено и рекомендовано к печати Редакционно-издательским советом Государственного гуманитарно-технического университета (протокол № 1 от 20 марта 2020 г.)*

© ГБУЗ «Московский научно-практический центр дерматовенерологии и косметологии ДЗМ», ЦГМА УДП РФ, ГОУ ВО МО ГГТУ, 2020

© Потекаев Н.Н., Ротанов С.В., Фриго Н.В., Дмитриев Г.А., Доля О.В., Китаева Н.В., Круглова Л.С., Марданлы С.Г., 2020

ISBN 978-5-87471-361-4

## ОГЛАВЛЕНИЕ

	<b>Введение</b>	4
<b>Глава 1.</b>	<b>Сифилис — бактериальная инфекция человека</b>	6
<b>1.1.</b>	Эпидемиология	6
<b>1.2.</b>	Этиология и патогенез сифилиса	9
<b>1.3.</b>	Клинические формы сифилиса	13
<b>1.4.</b>	Клиническая классификация сифилиса	17
<b>Глава 2.</b>	<b>Лабораторные методы диагностики сифилиса</b>	21
<b>2.1.</b>	Прямые методы детекции возбудителя сифилиса	21
<b>2.2.</b>	Иммунохимические (серологические) методы для диагностики сифилиса	31
<b>2.2.1.</b>	Трепонемоспецифические тесты (ТТ)	34
<b>2.2.2.</b>	Определение антител к кардиолипину. Нетрепонемные тесты (НТТ)	58
<b>2.2.3.</b>	Современный алгоритм обследования населения при скрининге и диагностике сифилиса	67
<b>2.3.</b>	Исследование цереброспинальной жидкости для диагностики нейросифилиса	71
<b>Глава 3.</b>	<b>Тесты для самоконтроля по теме</b>	76
<b>3.1.</b>	Тестовые задания для самоконтроля	76
<b>3.2.</b>	Эталоны ответов к тестовым заданиям	81
	Указатель использованных сокращений	82
	Список рекомендуемой литературы	83

## ВВЕДЕНИЕ

Среди социально значимых заболеваний, передаваемых преимущественно половым путем, одну из важнейших позиций в течение длительного времени занимает сифилис. Это обусловлено особенностями клинического течения патологического процесса при сифилисе с постепенным вовлечением и поражением практически систем органов макроорганизма, тяжестью развивающихся при этом воспалительных изменений в тканях, сопровождающихся нарушением функции отдельных органов, развитием тяжелых осложнений и опасностью летального исхода.

Возможность вертикальной передачи инфекции от больной беременной женщины к ее плоду позволила ряду исследователей включить сифилис в группу TORCH-инфекций, особенно опасных для здоровья и жизни эмбрионов первых месяцев развития, приводящих к частой внутриутробной гибели плодов и новорожденных или развитию у них пороков развития различных органов.

Сифилис относят к инфекциям, на распространение которых среди населения определяющее влияние оказывают: преимущественно половой путь передачи патогена и формирование особых «ядерных» групп, обеспечивающих сохранение инфекции в популяции (работники коммерческого секса, лица, употребляющие наркотики, мужчины, предпочитающие секс с мужчинами и другие), но также и социальные условия жизни: материальное и социальное обеспечение населения, доступность медицинской помощи, возникновение военных конфликтов, сопровождающихся неустойчивостью жизни и выраженной миграцией населения.

В связи с тем, что клинические проявления сифилиса в дебюте заболевания не сопровождаются болевым синдромом, больные нередко своевременно не обращаются за медицинской помощью, занимаются симптоматическим самолечением, что приводит к переходу заболевания в скрытую форму без клинических проявлений.

Важную роль в контроле над распространением сифилиса занимает скрининг и диагностика, осуществляемые лабораторными методами, что особенно важно при выявлении малосимптомных и скрытых форм заболевания. Лабораторное обследование обеспечивает раннее установление этиологического диагноза, а также способствует предупреждению развития поздних форм инфекции и появлению врожденного сифилиса. К настоящему времени зарубежными и отечественными исследователями предложены разнообразные медицинские лабораторные технологии, направленные на наиболее раннее выявление и диагностику сифилиса.

При всех инфекционных заболеваниях клиническая этиологическая диагностика является комплексной: она включает как прямое выявление самого возбудителя или его уникального генетического материала, так и оценку гуморального иммунитета с выявлением специфических антител к наиболее выраженным и характерным антигенам патогена. Разнообразие лабораторных методов обследования на сифилис обусловлено не только ограничениями прямого выявления бледной трепонемы, но и стадийностью течения сифилитической инфекции, меняющимся количеством циркулирующих в макроорганизме возбудителей, их доступностью для обнаружения иммунокомпетентными клетками хозяина и связанными с этими колебаниями выраженности гуморального иммунного ответа, оцениваемого в иммунохимических (серологических) исследованиях.

Несмотря на популярность применения серологического обследования на сифилис в структуре общественного здравоохранения, назначение тех или иных методов лабораторного исследования является не всегда обоснованным. Нередко скрининг или диагностическое обследование проводится без учета специфики разных лабораторных тестов (нетрепонемные – трепонемные), их клинической и аналитической чувствительности на разных стадиях и формах развития сифилиса. Зачастую не применяется комплексная диагностика с выбором комбинации прямых и непрямых методов исследования.

Для проведения более эффективного лабораторного обследования на сифилис и получения корректных результатов важно следовать Стандартам оказания медицинской помощи, разработанным и обновляемым с учетом новых научных достижений и имеющегося мирового опыта сообществами наиболее опытных отечественных исследователей и представителей медицинских организаций практического здравоохранения, и утверждаемым соответствующими органами общественного здравоохранения.

# Глава 1. СИФИЛИС — БАКТЕРИАЛЬНАЯ ИНФЕКЦИЯ ЧЕЛОВЕКА

Сифилис является хроническим системным инфекционным заболеванием, вызываемым бледной трепонемой (*Treponema pallidum, subspecies pallidum*), передается преимущественно половым путем, характеризуется волнообразным прогрессирующим течением с чередованием манифестных и скрытых периодов, разнообразными клиническими проявлениями и полиорганными поражениями.

## 1.1 ЭПИДЕМИОЛОГИЯ

Развитие эпидемического процесса при инфекционных заболеваниях обусловлено непрерывным взаимодействием трех основных составляющих: источника возбудителя инфекции, пути или механизма передачи возбудителя инфекции и населения, восприимчивого к данной инфекции. Изменение любого звена эпидемического процесса приводит к нарушению стабильности.

Сифилис относится к группе антропонозных заболеваний; исходным источником инфекции всегда является больной человек с активной формой заболевания. Наибольшую опасность в эпидемиологическом плане представляют больные ранним сифилисом, так как в жидком отделяемом клинических проявлений больного на коже и слизистых оболочках содержится большое количество возбудителей инфекции. При поздних же формах сифилиса клинические проявления на коже характеризуются появлением гиперреактивных инфильтративно-воспалительных элементов (гуммы и узелки), при которых возбудитель заболевания в ткани элементов присутствует в малых количествах. В связи с этим роль больных поздними формами сифилиса в распространении инфекции незначительна.

Важную роль в распространении сифилиса в популяции играют так называемые «уязвимые социальные группы населения» («группы повышенного риска», «ядерные группы»), являющиеся своеобразными резервуарами для развития эпидемии. При оценке риска заболеваемости сифилисом выделяют следующие «ядерные» группы:

- работники коммерческого секса и их клиенты;
- мужчины, предпочитающие секс с мужчинами;
- лица, имеющие большое число половых партнеров и практикующие половые контакты без использования барьерных средств контрацепции;
- потребители наркотиков;

- группы населения с повышенной мобильностью (водители грузовиков, совершающие дальние рейсы, моряки, рабочие-мигранты);
- беженцы внутри страны или из других государств, перемещенные лица, лица без определенного места жительства, беспризорные дети и подростки;
- служащие военных и полицейских формирований;
- туристы, особенно совершающие поездки для приобретения новых сексуальных контактов.

Основной путь передачи инфекционного агента при сифилисе — половой. Считается, что трепонема не может проникнуть через неповрежденную кожу или слизистые, и большинство случаев инфицирования развивается при наличии видимых или микроскопических повреждений. Необходимо иметь в виду возможность инфицирования при переливаниях крови и трансплантациях органов и тканей от больных доноров, а также искусственный путь при несоблюдении правил обработки медицинских инструментов, игл для татуажа, случайных ранениях медицинского персонала с попаданием в рану биологического материала от больного, содержащего возбудителя заболевания. Актуален и вертикальный путь трансплацентарного инфицирования плода от больной сифилисом матери.

При рассмотрении третьего звена эпидемического процесса необходимо отметить, что до настоящего времени не установлено прямых свидетельств изменения чувствительности человека к возбудителю сифилиса и не определено изменений в основных биологических свойствах патогенной бледной трепонемы.

Достижения медицины в области изучения возбудителей бактериальных и вирусных инфекций, активная реализация разных программ по профилактике и оказанию лечебной помощи населению различных регионов мира, отсутствие крупных военных конфликтов и стабилизация общественной жизни в большинстве стран Западной и Центральной Европы привели к тому, что заболеваемость сифилисом в 50–60-е годы XX века снижалась и в 80-х годах составляла 0,6–5,6 случаев на 100 тыс. населения.

Однако к 90-м годам XX века во многих странах Европы и Америки наблюдалось значительное увеличение регистрации случаев сифилиса среди населения, что было охарактеризовано как «эпидемия сифилиса».

В Российской Федерации этот период совпал с распадом Советского Союза, преобразованиями в экономической и политической сферах, со-

провождавшимися значительным снижением материальных условий жизни и обнищанием населения, преобразованиями в оказании медицинской помощи, поэтому интенсивные показатели эпидемии сифилиса в России были наиболее выраженными. Пик заболеваемости был отмечен в 1997 году (277,3 случая на 100 000 населения). По мере улучшения условий жизни населения и реализации мероприятий Федеральных Целевых Программ, начиная с 1998 года, в России заболеваемость сифилисом постепенно понижается на 15–20% в год (рис. 1); и в 2018 году интенсивный эпидемический показатель составил 16,7 случаев на 100 000 населения.

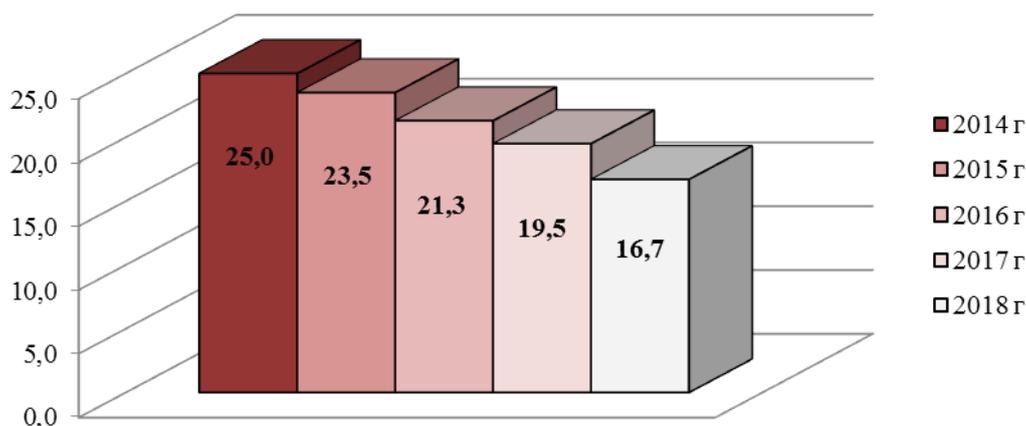


Рис. 1. Динамика заболеваемости сифилисом в Российской Федерации, 2014–2018 годы (число случаев на 100 000 населения)

В городе Москве, являющемся самым крупным мегаполисом России с интенсивными миграционными процессами, наиболее ярко отражаются все современные эпидемиологические тенденции распространения сифилиса.

На протяжении 2003–2014 годов в городе Москве наблюдалось снижение заболеваемости сифилисом (с 82,4 случаев на 100 000 населения в 2003 году до 16,7 — в 2014; снижение на 79,7%), при этом уровень заболеваемости сифилисом в городе Москве на протяжении всех лет наблюдения был значительно ниже, чем по России в целом. Вместе с тем с 2015 года по городу Москве стал регистрироваться новый подъем заболеваемости сифилисом, в 2016 году он составил 32,3 случая на 100 000 населения (рис. 2).

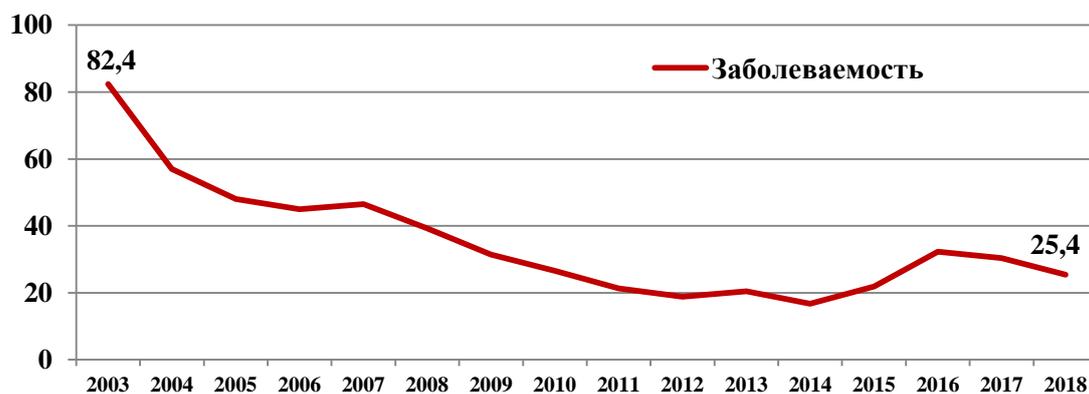


Рис. 2. Динамика заболеваемости сифилисом населения г. Москвы; 2003–2018 годы (число случаев на 100 000 населения)

Эпидемиологический анализ структуры заболеваемости сифилисом установил, что наблюдаемое повышение показателей заболеваемости сифилисом в городе Москве в 2015–2018 годах обусловлено ростом числа случаев выявления скрытых и поздних форм, что, возможно, было обусловлено несвоевременным выявлением больных сифилисом, некачественной диагностикой, неадекватной терапией, а также самолечением пациентов в связи со свободным доступом антибиотиков в аптечной сети.

Существенный вклад в регистрируемый рост заболеваемости сифилисом в городе Москве вносят мигранты (преимущественно из Средней Азии), направляющиеся в центральные районы России в поисках работы и проходящие в установленном порядке необходимое медицинской обследование при оформлении разрешения на работу и получении вида на жительство.

## 1.2 ЭТИОЛОГИЯ И ПАТОГЕНЕЗ СИФИЛИСА

Возбудителя сифилиса относят к порядку *Spirochaetales*, семейству *Spirochaetaeaceae*, роду *Treponema*, виду *Treponema pallidum* и подвиду *pallidum* (синоним: *Spirochaeta pallidum*). Свое название патоген получил за извитую спиралевидную форму и слабое окрашивание микробиологическими красителями.

Бледная трепонема является бактерией спиралевидной формы (от 4 до 14 мкм в длину и 0,2–0,25 мкм в поперечнике), имеет 8–12 равномерных закругленных завитков, с одинаковым расстоянием между ними, высота завитков по направлению к концам немного уменьшается.

В темном поле зрения микроскопа возбудитель сифилиса выглядит как блестящий серебристый спиралевидный микроорганизм с характерными видами плавных движений: ротаторным (вращается вокруг про-

дольной оси), поступательным (продвижение вперед и назад), сократительным (прохождение волн вдоль всего тела бактерии) и сгибательным (под острым углом в любой части тела, с образованием римской цифры «V»), некоторые исследователи отмечают особое маятникообразное раскачивание корпусом бактерии в случае её прикрепления к крупному клеточному субстрату или нити фибрина.

Ультраструктура трепонем была изучена с использованием электронной микроскопии. Центральной структурой клетки *T. pallidum* является спирально извитой протоплазматический осевой цилиндр, внутри него имеются все необходимые клеточные органеллы. Вдоль осевого цилиндра тянутся белковые нити — тонофибриллы, благодаря их сокращениям бактерия способна к активным движениям. Клеточная стенка бактерии имеет малое разнообразие антигенных маркеров, кроме этого она покрыта массивным мукополисахаридным чехлом, что позволяет трепонеме уклоняться от распознавания её чужеродных антигенов макрофагами организма хозяина.

*T. pallidum* хорошо приспособлена к условиям паразитического существования в макроорганизме; является микроаэрофилом, энергетические потребности удовлетворяет за счет расщепления сахаров, потребляемых из внешней среды, не имеет ферментов для расщепления липидов.

Бледные трепонемы легко погибают под воздействием неблагоприятных внешних факторов: высыхание, прогревание при 55°C в течение 15 минут, в присутствии кислот, щелочей, дезинфицирующих средств, 50–56° этилового спирта. В то же время низкие температуры способствуют длительному выживанию бледной трепонемы.

Трепонемы размножаются путем поперечного деления на два и более сегментов, каждый из которых превращается во взрослую особь. В благоприятных условиях существования деление бледной трепонемы происходит каждые 30–33 часа, это — очень длительный период, не характерный для других бактерий (этой особенностью микроорганизма может объясняться выраженная длительность инкубационного периода при развитии заболевания и смене его клинических стадий).

Помимо описанной классической спиралевидной формы, трепонема может существовать в виде зернисто-гранулярной, цист- и L-форм, которые являются временными трансформациями для её выживания и размножения в неблагоприятных условиях.

Инфицирование макроорганизма *T. pallidum* происходит через мелкие повреждения в эпидермисе кожи или слизистых оболочек; благодаря своей подвижности возбудители легко проникают в ткани, где они усиленно размножаются в большом количестве, вызывая клинические изменения. В отличие от многих других спирохет, *T. pallidum* является тканевым паразитом. Уже на ранних сроках инфицирования происходит активное распространение возбудителей из первичного очага инокуляции (генерализация инфекции), используя дренажную лимфатическую систему и венозный кровоток. Кровяное русло служит для распространения этих микроорганизмов, высокое парциальное давление кислорода в сосудах побуждает бледных трепонем покидать капилляры и колонизировать новые ткани, в том числе проникать в центральную нервную систему через перинеуральные лимфатические пространства.

Вслед за инкубационным периодом сифилиса (от момента заражения до появления первых клинических симптомов болезни), длящемся довольно продолжительное время (в среднем 3–4 недели), наступает период формирования начальных клинических проявлений инфекции. Для периода первичного сифилиса характерно развитие инфильтративно-пролиферативного воспаления на месте первичного внедрения бледной спирохеты с поражением регионарных лимфатических сосудов и лимфатических узлов (цикл развития и инволюции первичной сифиломы завершается в среднем через 2–2,5 месяца от момента первичного инфицирования).

Через 5–7 недель с момента проявления первичной сифиломы картина заболевания изменяется: появляются симптомы общего недомогания и интоксикации, развиваются генерализованные проявления на большей части кожного покрова и видимых слизистых оболочках — вторичный сифилис. На этом этапе инфекции, длящемся 2–2,5 года, периоды развития клинических проявлений заболевания с высыпаниями сифилидов сменяются периодами видимого затишья — скрытый сифилис.

Электронно-микроскопические исследования показали, что спиралевидная *T. pallidum* может длительно существовать в клетках организма хозяина. Так, внутрь макрофагов трепонемы попадают путем фагоцитоза, но при его незавершенном характере они продолжают сохранять свою жизнеспособность. После гибели макрофага первичная фагосома может повторно поглощаться новой макрофагальной клеткой с формированием полимембранной фагосомы; где возбудитель сифилиса защищен от неблагоприятного воздействия многих повреждающих веществ, в том числе специфических антител и лекарств.

Высвобождение бактерий из клеток приводит к их активации, сопровождающейся дальнейшими повреждениями тканей жизненно важных систем организма хозяина.

Измененные формы существования *T. pallidum* (гранулы-зерна и L-формы) характеризуются отсутствием клеточной стенки, большим количеством рибосом и полирибосом, что свидетельствует об их высокой метаболической активности. Эти формы имеют иные антигенные свойства, так как значительная часть рецепторных антигенов теряется с утратой клеточной стенки. Такие формы возбудителя покрыты мукополисахаридной субстанцией, что делает их малодоступными для фагоцитов и опсонизирующего воздействия антител, позволяя уклоняться от иммунной защиты организма хозяина. Вышеописанные формы бледной трепонемы способны лизировать основное вещество соединительной ткани, коллагеновые фибриллы, активно проникать в цитоплазму и ядра клеток макроорганизма.

Длительное взаимодействие бледных трепонем и микроорганизма может приводить к качественному изменению проявлений сифилиса, формированию гранулематозного характера воспалительных реакций на присутствие малого числа возбудителей, с разрушением окружающих тканей и нарушением функции внутренних органов больного — период третичного сифилиса (он наступает обычно через 3–5 и более лет после заражения).

Течение сифилиса может варьировать в широких пределах. Инфекция может длительно развиваться без видимых клинических симптомов, но *T. pallidum* в организме сохраняются (по-видимому, в виде цист и L-форм); возможны также и редкие случаи самоизлечения. У отдельных больных спустя многие годы после заражения (10 и более лет) на фоне снижения защитных механизмов иммунитета, обусловленного внешними неблагоприятными факторами и/или пожилым возрастом, при медицинских обследованиях определяются деструктивные изменения солидных органов и тканей, развиваются поражения со стороны нервной системы — спинная сухотка, прогрессивный паралич.

Своевременное выявление сифилиса при профилактических медицинских мероприятиях с применением технологий лабораторного исследования позволяет в более ранние сроки поставить правильный диагноз, провести адекватное лечение и предупредить развитие тяжелых необратимых патологических изменений и осложнений.

### 1.3 КЛИНИЧЕСКИЕ ФОРМЫ СИФИЛИСА

- *Кодирование по Международной статистической классификации болезней и проблем, связанных со здоровьем, 10 пересмотра (МКБ 10, версия 2019) - A50 / A51 / A52 / A53 / P00.2*

#### **A50 Врожденный сифилис**

**A50.0 Ранний врожденный сифилис с симптомами** — любое врожденное сифилитическое состояние, уточненное как раннее или проявившееся в возрасте до двух лет.

Ранний врожденный сифилис:

- кожи;
- кожи и слизистых оболочек;
- висцеральный.

Ранний врожденный сифилитический (ая):

- ларингит;
- окулопатия;
- остеохондропатия;
- фарингит;
- пневмония;
- ринит.

**A50.1 Ранний врожденный сифилис скрытый** — врожденный сифилис без клинических проявлений, с положительной серологической реакцией и отрицательным результатом при исследовании цереброспинальной жидкости, проявившийся в возрасте до двух лет.

**A50.2 Ранний врожденный сифилис неуточненный** — врожденный сифилис без дополнительных уточнений, проявившийся в возрасте до двух лет.

#### **A50.3 Позднее врожденное сифилитическое поражение глаз**

Поздний врожденный сифилитический интерстициальный кератит (H19.2).

Поздняя врожденная сифилитическая окулопатия (H58.8).

Исключена триада Гетчинсона (A50.5).

#### **A50.4 Поздний врожденный нейросифилис (ювенильный нейросифилис)**

Деменция паралитическая ювенильная.

Ювенильный (ая):

- прогрессивный паралич;

- спинная сухотка;
- табопаралич.

Поздний врожденный сифилитический (ая):

- энцефалит (G05.0);
- менингит (G01);
- полиневропатия (G63.0).

При необходимости идентифицировать любое связанное с данным заболеванием психическое расстройство используют дополнительный код.

Исключена: триада Гетчинсона (A50.5).

**A50.5 *Другие формы позднего врожденного сифилиса с симптомами*** — любое врожденное сифилитическое состояние, уточненное как позднее или проявившееся через два года или более с момента рождения.

Суставы Клаттона (M03.1).

Гетчинсона:

- зубы;
- триада.

Поздний врожденный:

- кардиоваскулярный сифилис (198.);
- сифилитическая:
  - артропатия (M03.1);
  - остеохондропатия (M90.2).

Сифилитический седловидный нос.

**A50.6 *Поздний врожденный сифилис скрытый*** — врожденный сифилис без клинических проявлений, с положительной серологической реакцией и отрицательным тестом цереброспинальной жидкости, проявившийся в возрасте двух и более лет.

**A50.7 *Поздний врожденный сифилис неуточненный*** — врожденный сифилис БДУ, проявившийся в возрасте двух и более лет.

**A50.9 *Врожденный сифилис неуточненный***

**A51 *Ранний сифилис***

**A51.0 *Первичный сифилис половых органов*** — сифилитический шанкр без дополнительных уточнений.

**A51.1 *Первичный сифилис анальной области***

**A51.2 *Первичный сифилис других локализаций***

**A51.3 *Вторичный сифилис кожи и слизистых оболочек***

Широкая кондилома.

Сифилитическая (ие):

- алопеция (L99.8);
- лейкодерма (L99.8);
- очаги на слизистых оболочках.

#### **A51.4 Другие формы вторичного сифилиса**

Вторичные сифилитические (ое) (ая):

- воспалительное заболевание женских тазовых органов (N74.2);
- иридоциклит (H22.0);
- лимфаденопатия;
- менингит (G01);
- миозит (M63.0);
- окулопатия НКДР (H58.8);
- периостит (M90.1).

**A51.5 Ранний сифилис скрытый** — сифилис (приобретенный) без клинических проявлений с положительной серологической реакцией и отрицательной пробой цереброспинальной жидкости, давностью менее двух лет после заражения.

**A51.9 Ранний сифилис неуточненный** (диагноз в РФ не используется)

#### **A52 Поздний сифилис**

##### **A52.0 Сифилис сердечно-сосудистой системы**

Кардиоваскулярный сифилис без дополнительных уточнений (198.0).

Сифилитическая (ий):

- аневризма аорты (179.0);
- аортальная недостаточность (139.1);
- аортит (179.1);
- церебральный артериит (168.1);
- эндокардит без дополнительных уточнений (139.8);
- миокардит (141.0);
- перикардит (132.0);
- легочная недостаточность (139.3).

##### **A52.1 Нейросифилис с симптомами**

Артропатия Шарко (M14.6).

Поздний сифилитический (ая):

- неврит слухового нерва (H49.0);
- энцефалит (G05.0);

- менингит (G01);
- атрофия зрительного нерва (H48.0);
- полиневропатия (G63.0);
- ретробульбарный неврит (H48.1).

Сифилитический паркинсонизм (G22).

Спинальная сухотка. Прогрессирующий паралич. Табопаралич.

**A52.2 Асимптомный нейросифилис**

**A52.3 Нейросифилис неуточненный** (диагноз в РФ не используется)

**A52.7 Другие симптомы позднего сифилиса**

Сифилитическое поражение почечных клубочков (N 08.0).

Гумма (сифилитическая) любых локализаций, кроме классифицированных в рубриках A52.0–A52.3.

Сифилис поздний, или третичный.

Поздний сифилитический (ая):

- бурсит (M73.1);
- хориоретинит (H32.0);
- эписклерит (H19.0);
- воспалительное заболевание женских тазовых органов (N74.2);
- окулопатия НКДР (H58.8);
- перитонит (K67.2).

Сифилис (без уточнения стадии):

- кости (M90.2);
- печени (K77.0);
- легкого (J99.8);
- мышц (M63.0);
- синовиальный (M68.0).

**A52.8 Поздний сифилис скрытый** — сифилис (приобретенный) без клинических проявлений, с положительной серологической реакцией и отрицательной пробой цереброспинальной жидкости, давностью два года или более после заражения.

**A52.9 Поздний сифилис неуточненный**

**A53 Другие и неуточненные формы сифилиса**

**A53.0 Скрытый сифилис, неуточненный как ранний или поздний**

Скрытый сифилис без дополнительных уточнений.

Положительная серологическая реакция на сифилис.

**A53.9 Сифилис неуточненный** — инвазия, вызванная *Treponema pallidum*, без дополнительных уточнений.

Сифилис (приобретенный) без дополнительных уточнений.

Исключен: сифилис без дополнительных уточнений, явившийся причиной смерти в возрасте до двух лет (A50.2).

При этом необходимо учитывать, что МКБ-10 не всегда адекватно отражает все клинические формы заболевания. Так, A51.4 (другие формы вторичного сифилиса) включает раннее поражение нервной системы, внутренних органов и опорно-двигательного аппарата. Также нет разделения асимптомного нейросифилиса на ранний и поздний, вследствие чего всех больных с бессимптомным течением нейросифилиса независимо от давности заболевания относят к позднему сифилису (A52.2). Следует отметить, что шифр МКБ-10, оканчивающийся цифрой 9 (A50.9; A51.9, A52.9 и A53.9), а также A50.2 и A50.7 отражают формы инфекции, не подтвержденные лабораторными методами исследования, являясь «корзиной, в которую сбрасываются неправильно оформленные извещения».

## 1.4 КЛИНИЧЕСКАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ СИФИЛИСА

В клиническом отношении МКБ-10 не лишена недостатков, она предназначена для статистических целей, а для практического применения и назначения терапии специалисты используют традиционную клиническую классификацию сифилиса:

### **Приобретенный сифилис**

**Инкубационный период** — начинается с внедрения через слизистую оболочку или поврежденную кожу возбудителя сифилиса и заканчивается появлением первичного аффекта; составляет в среднем 3–4 недели, длительность может варьировать от 10 до 190 дней.

**Сифилис первичный серонегативный** (*syphilis primaria seronegativa*) — при наличии первичного аффекта (твердый шанкр, лимфангоит и регионарный склераденит) и положительных (либо слабоположительных) результатах ТТ и отрицательных результатах НТТ с сывороткой/плазмой крови. При локализации первичного аффекта не на половых органах к диагнозу «первичный сифилис» добавляют слово «экстрагенитальный».

**Сифилис первичный серопозитивный** (*syphilis primaria seropositiva*) — при наличии первичного аффекта (твердый шанкр, лимфангоит и регионарный склераденит) и положительных (либо слабоположительных) результатах ТТ и НТТ с сывороткой/плазмой крови.

**Сифилис вторичный свежий** (*syphilis secundaria recens*) — первое

высыпание вторичного периода в форме обильных, мелких, симметричных вторичных сифилидов (чаще — розеол, реже — папул), полиаденита, при сохранении остатков первичного аффекта (твердый шанкр), положительных результатах ТТ и НТТ с сывороткой/плазмой крови.

**Сифилис вторичный рецидивный** (*syphilis secundaria recidiva*) — последующие «волны» высыпаний вторичного периода в виде немногочисленных, более крупных, сгруппированных вторичных сифилидов (чаще — папулезных и везикуло-пустулезных), полиаденита, алопеции, лейкодермы и при отсутствии первичного аффекта, положительных результатах ТТ и НТТ с сывороткой/плазмой крови.

**Сифилис третичный активный** (*syphilis tertiaria activa*) — характеризуется наличием бугорковых или гуммозных сифилидов, положительными результатами ТТ и отрицательными либо положительными результатами НТТ с сывороткой/плазмой крови.

**Сифилис третичный скрытый** (*syphilis tertiaria latens*) — диагностируют у больных, перенесших активные проявления третичного сифилиса и имеющих на момент обследования вторичные изменения в виде патогномоничных штампованных рубцов, положительные значения ТТ и отрицательные либо положительные результаты НТТ с сывороткой/плазмой крови.

**Сифилис скрытый ранний** (*syphilis latens praesox*) — заболевание у ранее не получавших противосифилитическую терапию пациентов при отсутствии клинических проявлений, положительных результатах ТТ и НТТ с сывороткой/плазмой крови, при предположительной длительности инфекции до 2 лет.

**Сифилис скрытый поздний** (*syphilis latens tarda*) — сифилис у ранее не получавших противосифилитическую терапию пациентов при отсутствии клинических проявлений, положительных значениях ТТ, отрицательных/слабоположительных/положительных результатах НТТ с сывороткой/плазмой крови, а также длительности заболевания более 2 лет.

**Сифилис скрытый неуточненный как ранний или поздний** (*syphilis latens ignorata*) — диагностируют у ранее не получавших противосифилитической терапии пациентов при отсутствии клинических проявлений заболевания, положительных значениях ТТ и отрицательных/слабоположительных/положительных результатов НТТ с сывороткой/плазмой крови и неустановленной давности инфицирования.

**Сифилис нервной системы ранний** (*neurosyphilis praesox*) — у

больных с подтвержденным диагнозом сифилиса при наличии неврологической/ психиатрической симптоматики, обусловленной экссудативно-воспалительным и пролиферативным процессом в мозговых оболочках и сосудах, при патологических изменениях цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) или при наличии только патологии ликвора (асимптомный ранний нейросифилис), положительных значениях ТТ, отрицательных/ слабоположительных/ положительных результатов НТТ с сывороткой/плазмой крови и ЦСЖ, при длительности инфекции до 5 лет.

**Сифилис нервной системы поздний** (*neurosyphilis tarda*) — у больных с подтвержденным диагнозом сифилиса при наличии неврологической/ психиатрической симптоматики, обусловленной дегенеративно-дистрофическим процессам в паренхиме головного и/или спинного мозга, и патологическими изменениями ЦСЖ или при наличии только патологии ликвора (асимптомный поздний нейросифилис), положительных значениях ТТ, отрицательных/ слабоположительных/ положительных результатах НТТ с сывороткой/плазмой крови и ЦСЖ, при длительности инфекции более 5 лет.

**Сифилис внутренних органов** (с указанием пораженного органа) **ранний** (*syphilis visceralis praecox*) — у больных с подтвержденным диагнозом сифилиса при наличии клинической симптоматики поражения соответствующего органа на основании обнаружения при патоморфологическом исследовании биоптата лимфоплазмоцитарной инфильтрации и/или обнаружении бледных трепонем при соответствующих методиках окраски, а также положительной динамике процесса на фоне специфической терапии.

**Сифилис внутренних органов поздний** (*syphilis visceralis tarda*) — у больных с подтвержденным диагнозом сифилиса при наличии клинической симптоматики поражения соответствующего органа на основании обнаружения при патоморфологическом исследовании биоптата гранулематозного воспаления и/или обнаружении бледных трепонем при соответствующих методиках окраски, а также положительной динамике процесса на фоне специфической терапии, что достигается не во всех случаях.

**Врожденный сифилис.**

**Сифилис плаценты и плода.**

**Ранний врожденный сифилис** (*syphilis congenita praecox*) — у детей в возрасте до 2 лет, его подразделяют на:

- **сифилис грудного возраста** — от 0 до 1 года:
  - активный (с клиническими проявлениями);

- скрытый — без клинических проявлений, но с положительными серологическими реакциями;
- **сифилис раннего детского возраста** — от 1 до 2 лет:
  - активный (с клиническими проявлениями);
  - скрытый — без клинических проявлений, но с положительными серологическими реакциями.

**Поздний врожденный сифилис** (*syphilis congenita tarda*) — у детей старше 2 лет, его делят на:

- **сифилис детей от 2 до 5 лет** с признаками вторичного сифилиса:
  - активный (с клиническими проявлениями);
  - скрытый — без клинических проявлений, но с положительными серологическими реакциями;
- **сифилис детей старше 5 лет и взрослых** с признаками третичного сифилиса:
  - активный (с клиническими проявлениями);
  - скрытый — без клинических проявлений, но с положительными серологическими реакциями.

Приведенная клиническая классификация отражает стадийность течения сифилиса, современные представления о патогенезе заболевания и удобна для обучения молодых специалистов; она хорошо зарекомендовала себя за десятилетия практического использования в практическом здравоохранении.

Деление сифилиса на ранние и поздние формы является условным; выбор критерия 2 года с момента заражения обусловлен тем обстоятельством, что до 2 лет больные представляют опасность в эпидемиологическом отношении, и требуют проведения адекватных противоэпидемических мер, а после 2 лет больные сифилисом практически не заразны. Кроме того, наблюдаемые поздние клинические проявления, в основе которых лежит гранулематозное воспаление (бугорки и гуммы), как правило, не появляются ранее 2 лет с момента инфицирования.

При назначении лечения больным к ранним формам сифилиса целесообразно относить только случаи с длительностью до 1 года, а при более длительном заболевании или не установленной его продолжительности предпочтительнее проводить лечение по схемам позднего сифилиса, как обеспечивающими большую надежность и эффективность.

## Глава 2. ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ СИФИЛИСА

Диагноз манифестной формы сифилиса, какой бы типичной ни была наблюдаемая у пациента клиническая картина, не может быть установлен клиническим специалистом без обязательного подтверждения результатами лабораторных исследований. Для этиологического диагноза приоритетное значение имеют лабораторные исследования с **прямым выявлением** возбудителя заболевания или его уникального генетического материала непосредственно в очагах поражения. Однако в ряде случаев выполнение подобных исследований не представляется возможным по причине трудностей получения биологических образцов, содержащих возбудителя.

Непрямыми, дополнительными или **косвенными методами** лабораторных исследований при этиологической диагностике инфекций являются иммунохимические (серологические исследования) жидких сред макроорганизма с определением в них иммунных антител разных классов к наиболее специфичным антигенам в структуре возбудителя заболевания.

Многообразие клинических форм сифилиса во многих случаях вызывает необходимость сочетанного применения разных диагностических тестов. Так, прямое определение патогенных *T. pallidum* в биологическом материале из очагов поражения позволяет рано и достоверно установить диагноз при манифестных формах сифилиса. Применение на этом начальном этапе непрямых методов диагностики обеспечивает возможность оценки динамики показателей здоровья пациента в процессе и после проведения ему адекватной антибактериальной терапии, а также для обоснованного прекращения клинико-серологического наблюдения за результатами терапии.

В то же время у больных скрытыми формами сифилиса или при подозрении на реинфекцию у лиц с сифилисом в анамнезе ключевую роль играют результаты иммунохимических исследований с определением специфических антител разных классов (IgM и/или IgG).

### 2.1. ПРЯМЫЕ МЕТОДЫ ДЕТЕКЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИФИЛИСА

Возбудитель сифилиса был установлен в 1905 году, когда немецкий микробиолог Fritz Schaudinn в неокрашенных нативных мазках, приготовленных немецким дерматовенерологом Paul Erich Hoffmann из папулы

больной сифилисом женщины, обнаружил ранее неизвестные микроорганизмы.



Рис. 3. Эрих Гофман (1968–1959) и Фриц Шаудин(1871–1906)

В 1909 году А.С. Coles впервые описал технику исследования в темном поле микроскопа [dark field microscopy — DFM] для исследования бледной трепонемы и отметил при этом особенности движений микроорганизма.

Этот метод до настоящего времени с успехом применяется для выявления бледных трепонем при диагностике сифилиса. Непосредственное выявление возбудителя заболевания — *Treponema pallidum* — является абсолютным критерием установления диагноза.

В образцах биологического материала, полученных с поверхности эрозивных и язвенных твердых шанкров, экскориированных папул, из регионарных лимфатических узлов при раннем сифилисе или из пузырей и папул при врожденном сифилисе, *T. pallidum* может быть обнаружена следующими методами:

- микроскопия в темном поле зрения микроскопа;
- прямая иммунофлуоресценция (для образцов из поражений в полости рта или перианальной области, из других очагов, где возможна контаминация трепонемами-комменсалами);
- методами амплификации нуклеиновых кислот (МАНК): в полимеразной цепной реакции (ПЦР) или с применением технологии НАСБА (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification).

### ***МИКРОСКОПИЯ В ТЕМНОМ ПОЛЕ ЗРЕНИЯ***

***Показания:*** поиск и идентификация *T. pallidum* в отделяемом сифилидов при подозрении на ранние формы сифилиса (первичный, вторичный, ранний врожденный).

***Противопоказания:*** не установлены.

**Принцип метода:** прямая визуализация *T. pallidum* в темном поле зрения микроскопа по характерным морфологическим признакам и наблюдаемым видам активного движения. Метод позволяет изучать *T. pallidum* в живом виде и дифференцировать ее от других трепонем; эта же технология применяется также при учете результатов в реакции иммобилизации бледных трепонем (РИБТ).



Рис. 4. *T. pallidum* в темном поле зрения

Визуализация микроорганизмов в темном поле происходит за счет бокового освещения и отражения света клеточными структурами. Бледная спирохета выглядит в виде очень нежной светящейся серебристым блеском подвижной спирали или в виде пунктира, благодаря более яркому освещению выпуклой части завитков.

**Материал для исследования:** серозное отделяемое (райц-серум) с поверхности эрозивного/язвенного твердого шанкра, мацерированной/эксорирированной/эрозивной папулы или со дна пузырьного элемента (на коже новорожденного); пунктат увеличенного регионарного лимфатического узла.

**Взятие биоматериала** осуществляется исключительно лабораторным медицинским работником, прошедшим специальную подготовку и соблюдающим все меры предосторожности; выбор типичных очагов поражения для обследования определяет клиницист, проводивший осмотр пациента.

**1.** Проводят тщательную и нетравмирующую очистку поверхности выбранных для обследования очагов поражения с помощью марлевого тампона, смоченного стерильным физиологическим раствором (для механического удаления клеточного детрита, лейкоцитов и сопутствующей микрофлоры, затрудняющих исследование). Бактериологической петлей или стерильной ложкой Фолькмана производят осторожные поглаживающие движения по поверхности эрозивно-язвенного элемента, что вызывает поступление межтканевой жидкости, содержащей большое количество возбудителей из глубины инфильтрата на поверхность, она определяется в

виде мелких сливающихся капелек. Используемым инструментом собирают выделившуюся жидкость и переносят в несколько повторных приемов на поверхность предметного стекла в каплю стерильного физиологического раствора.

При получении материала не допускать травмирования поверхностных капилляров, чтобы не получить кровотечения. Наличие в препарате лейкоцитов или клеточного детрита, эритроцитов значительно усложняет исследование.

Техника получения межтканевой жидкости более подробно приводится в соответствующих методических указаниях для специалистов лабораторной медицины.

**2.** Поверхность кожи над увеличенным лимфатическим узлом обрабатывают спиртовой салфеткой (с пропиловым или этиловым спиртом) как перед внутримышечными инъекциями, и дают время для полного испарения дезинфектанта с поверхности кожи. В стерильный 2,0 мл шприц набирают 0,5–0,75 мл стерильного физиологического раствора, стерильной иглой на этом шприце делают прокол кожи и оболочки лимфатического узла, плотно фиксированного между пальцами оператора; нагнетают внутрь л/узла набранный объем физиологического раствора и осуществляют разминающие движения пальцами, фиксирующими л/узел. Обратным ходом поршня из обследуемого л/узла получают небольшое количество жидкости, которую переносят на предметное стекло. Место прокола обрабатывают стерильной салфеткой и заклеивают полоской лейкопластыря с марлевой вкладкой.

Пунктат лимфатического узла наносят на предметное стекло, физиологическим раствором дополнительно не разводят.

**3.** Каплю биоматериала на предметном стекле сразу же накрывают покровным стеклом 25x25 мм и приступают к микроскопическому исследованию. Подсыхание капли биоматериала снижает эффективность исследования. Использование покровных стекол 18x18 мм приводит к более активному перемещению жидкости к краевой зоне, что мешает микроскопии.

**Результат исследования.** На бланке направления лабораторный специалист, выполнивший исследование, отмечает:

- «*T. pallidum* обнаружена», указывает обследованный очаг, красной ручкой или карандашом подчеркивает результат;

- «*T. pallidum* не обнаружена», уточняет обследованные очаги и пишет рекомендации для последующего обследования (например, «повто-

ритель исследование после назначения на очаг примочек со стерильным физиологическим раствором»).

### **Интерпретация результата исследования**

Выявление возбудителя заболевания — *Treponema pallidum* — в материале из очага поражения является абсолютным критерием установления диагноза «сифилис». Ложный положительный результат может быть обусловлен низкой квалификацией лабораторного специалиста.

Отрицательный результат исследования наблюдают после нанесений на очаги поражения антисептических или антибактериальных препаратов, приема внутрь антибиотиков, при недостаточном опыте работы лабораторного специалиста.

**Недостатки метода:** относительно низкая чувствительность (предел детекции —  $10^5$  подвижных клеток/мл). Присутствие непатогенных трепонем-комменсалов (*T. refringers*, *T. phagedenis (reiteri)*, *T. denticola*) делает трудным и малодостоверным исследование с материалом, полученным с проявлений на слизистых оболочках полости рта, прямой кишки или перианальной области, так как морфологически эти трепонемы сходны с *T. pallidum*. При необходимости проведения исследования материала, полученного из этих локализаций, лучше отдать предпочтение методу ПИФ.

### **МЕТОД ПРЯМОЙ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ**

**Показания:** поиск и идентификация *T. pallidum* в отделяемом сифилидов при подозрении и на ранние формы сифилиса (первичный, вторичный, ранний врожденный).

**Противопоказания:** не установлены.

**Принцип метода:** биоматериал, содержащий бледные трепонемы, полученный из очагов поражения и помещенный на предметное стекло фиксируют, обрабатывают моноклональными анти-*T. pallidum* антителами, мечеными флюоресцирующими метками (ФИТЦ) и промывают. При люминесцентной микроскопии наблюдается специфическое ярко-зеленое свечение бледных трепонем.

**Материал для исследования:** серозное отделяемое (райц-серум) с поверхности эрозивного/ язвенного твердого шанкра, мацерированной/ экскориированной/ эрозивной папулы или со дна пузырьного элемента на коже новорожденного; пунктат увеличенного регионарного лимфатического узла.

**Взятие биоматериала** смотри аналогичные разделы **1** и **2** для «микроскопии в темном поле».

**Результат исследования.** На бланке направления лабораторный специалист, выполнивший исследование, отмечает:

- «***T. pallidum* обнаружена**», указывает обследованный очаг, красной ручкой или карандашом подчеркивает результат;

- «***T. pallidum* не обнаружена**», уточняет обследованные очаги и пишет рекомендации для последующего обследования (например: «повторить исследование после назначения на очаг примочек со стерильным физиологическим раствором»).

### **Интерпретация результата исследования**

Выявление возбудителя заболевания — *Treponema pallidum* — в материале из очага поражения является абсолютным критерием установления диагноза «сифилис».

Отрицательный результат исследования наблюдают при некачественном получении материала для исследования, после нанесений на очаги поражения антисептических или антибактериальных препаратов, приема внутрь антибиотиков, при недостаточном опыте работы лабораторного специалиста.

### **Оценка диагностической значимости метода**

Метод удобен при исследовании биоматериала, полученного со слизистых оболочек полости рта и прямой кишки, материала, а также при биопсии или аутопсии. За счет использования видоспецифических моноклональных антител метод позволяет дифференцировать патогенную *T. pallidum* от трепонем-комменсалов. Применение светящихся в люминесцентном свете меток повышает чувствительность до детекции -  $10^4$  клеток / мл).

**Недостатки метода:** в России отсутствуют необходимые реагенты (гипериммунные или моноклональные антитела к *T. pallidum*, меченные ФИТЦ), нет промышленного производства и/ или их регистрации.

## **МЕТОДЫ АМПЛИФИКАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ**

Методы амплификации нуклеиновых кислот (МАНК) позволяют обнаружить единичные молекулы ДНК возбудителя среди множества других молекул. В настоящее время одним из наиболее часто используемых МАНК для диагностики сифилиса является полимеразная цепная реакция (ПЦР).

## ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ (ПЦР)

**Показания:** поиск и идентификация *T. pallidum* в отделяемом сифилидов при подозрении на ранние стадии сифилиса (первичный, вторичный, ранний врожденный).

**Противопоказания:** не установлены.

**Принцип реакции.** Метод основан на принципе контролируемой репликации (амплификации) в пробирке определяемых высокоспецифичных фрагментов ДНК возбудителя в процессе повторяющихся температурных циклов. При каждом повторе вновь синтезированные молекулы копируются ферментом ДНК-полимеразой, благодаря чему происходит многократное увеличение количества специфических фрагментов ДНК.

В реакционную пробирку вносят:

- исследуемый биологический материал;
- олигонуклеотидные праймеры (искусственно синтезированные заправки из 15–20 пар нуклеотидов, комплементарные концевым участкам уникального фрагмента ДНК, подлежащего выявлению и амплификации, и ограничивающие его);
- смесь четырех нуклеотидных оснований (аденин, тимин, гуанин, цитозин), необходимых для синтеза новых комплементарных цепей ДНК;
- термостабильный фермент Taq-полимераза, получаемый из штамма бактерий *Thermus aquaticus*, осуществляющий достраивание каждой из расплетенных цепочек ДНК до состояния 2-х цепочечной молекулы.

Каждый цикл амплификации состоит из 3 этапов.

На *I этапе* при нагревании реакционной среды в микропробирке до 93–95°C происходит денатурация ДНК (расплетение двойной спирали ДНК с образованием двух одноцепочечных молекул).

*II этап* — присоединение (отжиг) праймеров — взаимодействие праймеров с ДНК-матрицей, содержащейся в обследуемом клиническом материале (с соответствующими последовательностями специфического фрагмента на противоположных нитях ДНК). Температура отжига подбирается для каждой пары праймеров (как правило, в интервале 50–65°C). Праймеры, присоединяющиеся комплементарно (как ключ к замку) к концевым участкам искомой ДНК и фланкируют (обозначают) участок ДНК, подлежащий амплификации. От подбора праймеров и температуры отжига зависит уровень амплификации ДНК, чувствительность и специфичность исследования.

*III этап* — элонгация (удлинение) цепи ДНК — присоединившиеся праймеры формируют стартовые блоки, с которых начинается процесс амплификации (доставления) каждой из расплетенных цепочек ДНК до состояния 2-х цепочечной молекулы), который осуществляется термостабильной Taq-полимеразой благодаря присутствию в реакционной смеси необходимых нуклеотидов (аденин, тимин, гуанин и цитозин).

Образовавшиеся в первом цикле амплификации продукты синтеза ДНК служат матрицами для последующих циклов амплификации. Вновь синтезированные фрагменты ДНК, многократно умножаются, происходит экспоненциальное накопление целевых фрагментов ДНК (ампликонов) в реакционной смеси. За 30–40 циклов амплификации в растворе накапливается количество ампликонов, достаточное для детекции другими дополнительными методами с меньшей аналитической чувствительностью.

Для детекции ДНК *T. pallidum* в настоящее время наиболее часто применяют наборы реагентов, в которых в качестве мишени используются гены *trp47* и *polA T. pallidum*.

С середины 90-х годов XX века применяется и новая модификация — ПЦР в реальном времени; её преимуществом является снижение временных затрат на проведение теста и риска контаминации, возможность выявления и количественной оценки определяемой ДНК в исследуемом материале.

**Материал для исследования:** отделяемое генитальных язв, биопсийный материал кожных сифилидов, спинномозговая или амниотическая жидкость, плацента, периферическая кровь и семенная жидкость. Наиболее адекватным биоматериалом для исследования является райц-серум генитальных язв.

**Взятие биоматериала** смотри аналогичные разделы **1** и **2** для «микроскопии в темном поле».

**3.** Биопсийный материал из кожных сифилисов получают с помощью специальных заборных устройств пункционных игл с широким просветом или Derm Punch лезвий различного диаметра, позволяющих с минимальной травматизацией и контролем глубины проникновения осуществлять эксцизию поверхностных фрагментов воспалительного инфильтрата из очагов поражения.

Получение биопсийного материала относится к микрохирургическим манипуляциям, для их проведения необходима специальная подготовка медицинского персонала и обеспечение помещением малой опера-

ционной. По завершении процедуры может потребоваться наложение швов на кожу.

**4.** Получение образцов спинномозговой или амниотической жидкости для исследования обеспечивается соответствующими специалистами, имеющими допуск к проведению спинномозговой пункции (неврологи и реаниматологи) и амниоцентеза (акушеры и гинекологи). Для получения необходимых образцов биоматериала требуется госпитализация пациента, проведение указанной процедуры в условиях малой операционной и последующее послеоперационное наблюдение.

**Результат исследования.** На бланке направления лабораторный специалист, выполнивший молекулярно-биологическое исследование, отмечает:

- «ДНК *T. pallidum* обнаружена», указывает вид обследованного биоматериала, красной ручкой или карандашом подчеркивает результат;
- «ДНК *T. pallidum* не обнаружена», уточняет вид обследованного биоматериала и пишет рекомендации для последующего обследования.

#### **Интерпретация результата исследования**

Выявление ДНК возбудителя заболевания — *Treponema pallidum* — в биоматериале из очага поражения является абсолютным критерием установления диагноза «сифилис».

Отрицательный результат исследования наблюдают при некачественном получении образца биоматериала для исследования.

**Оценка диагностической значимости метода.** По данным зарубежных и отечественных авторов ПЦР благодаря своим преимуществам имеет широкую перспективу внедрения в комплексную диагностику сифилиса.

Аналитическая чувствительность амплификационных тестов составляет 10–1000 клеток в пробе, в то время как для других прямых диагностических тестов она составляет  $10^3$ – $10^5$  клеток. Чувствительность метода во многом зависит от вида используемого клинического материала (кровь, спинномозговая жидкость, райц-сыворотка сифилидов и другое). Наибольшая чувствительность достигается при исследовании отделяемого сифилидов ввиду большей концентрации возбудителя в биоматериале. При первичном сифилисе (локализация шанкров в генитальной, оральной и перианальной областях) чувствительность — 78,4%; раннем врожденном сифилисе (материал — кровь) — 83,0%; специфичность метода превышает 95%. Специфичность метода во многом обусловлена правильным выбо-

ром мишени для амплификации, качеством праймеров и подбора температурных условий амплификации.

Приоритеты использования ПЦР для диагностики сифилиса:

- исследование генитальных язв при первичном сифилисе и отрицательных результатах серологических тестов.
- локализация высыпаний на слизистой полости рта и в других местах, где возможна контаминация трепонемами-комменсалами.
- необходимость исследования тканей и цереброспинальной жидкости, крови (хотя в крови чувствительности метода относительно невысока).

### ***ДРУГИЕ ПРЯМЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ СИФИЛИСА***

К «другим» методам диагностики сифилиса могут быть отнесены методы, связанные с техникой окраски препаратов, содержащих бледную трепонему, а также современные иммуногистохимические методы, используемые в патоморфологических подразделениях.

Обобщая раздел по прямым методам исследования, следует отметить, что прямые методы детекции возбудителя сифилиса являются *абсолютным доказательством* наличия заболевания. Это касается обнаружения бледной трепонемы в образцах, полученных из очагов поражений, с помощью микроскопии в темном поле зрения, просмотра окрашенных препаратов в световом микроскопе, прямой иммунофлюоресценции, иммуногистохимии, гибридизации в тканях с флуоресцентным окрашиванием, а также выявления специфических нуклеиновых кислот возбудителя (ДНК или РНК). МАНК являются превосходными методами для диагностики сифилиса при небольшом количестве трепонем в исследуемом материале; они высоко специфичны, чувствительны, воспроизводимы и универсальны; при качественном получении и обработке образцов надежны и практически не дают ложных результатов.

Прямые методы используются преимущественно для диагностики сифилиса раннего манифестного (первичный и вторичный — источник получения материала — эрозивно-язвенные элементы) и раннего врожденного сифилиса (источник получения материала — ткань пуповины, плаценты, содержимое пузырей, отделяемое слизистой оболочки носа, отделяемое с поверхности папул и органы плода).

## 2.2. ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ (СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ) МЕТОДЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ СИФИЛИСА

При обследовании на сифилис широкое применение получили серологические методы исследования, принцип которых заключается в выявлении в сыворотке/плазме крови или цереброспинальной жидкости пациентов антител, ассоциированных с сифилитической инфекцией.

В настоящее время наиболее часто для скрининга сифилиса и установления клинического диагноза применяют трепонемоспецифические тесты (ТТ), позволяющие определять антитела к нативным антигенам возбудителя сифилиса или к рекомбинантным аналогам наиболее специфичных антигенов бледной трепонемы, полученных генно-инженерными методами.

Для определения активности инфекционного процесса при сифилисе, оценки эффективности проведения антибактериальной терапии применяются исследования с качественным и полуколичественным определением в крови антител к кардиолипиновому антигену. Этот антиген характерен для сложных молекулярных структур, входящих в состав клеточных стенок и мембран, как возбудителя сифилиса, так и клеток человека. Кардиолипиновый антиген получают при смешивании химически очищенных липоидных субстанций, полученных не от возбудителя сифилиса, поэтому лабораторные исследования с применением такого антигена называют нетрепонемными тестами (НТТ).

*Материалом исследования* в ТТ и НТТ служит сыворотка или плазма крови, а также цереброспинальная жидкость. От условий получения образцов крови и ликвора у обследуемых лиц, хранения этих биологических материалов до начала исследования в лаборатории в существенной степени зависят результаты определения антител. Техника выполнения тестов с ликвором может отличаться от исследования сыворотки/плазмы крови по количеству исследуемого образца, что зависит от меньшего содержания в ней белковых структур и специфических антител.

### *Техника взятия крови для серологического исследования*

Кровь у обследуемых лиц берут натощак, через 12 часов после последнего приема пищи, лучше утром или в первую половину дня. Накануне взятия крови для исследования в иммунохимических тестах пациенту не следует употреблять алкоголь, наркотические и медикаментозные препараты и принимать жирную пищу во избежание получения ложноположительных результатов исследования. По этой же причине не берут

кровь для исследований во время и в течение недели после лихорадочных состояний, у женщин — во время менструаций, в первую неделю после родов.

**Техника получения венозной крови из локтевой вены** не отличается от стандарта взятия крови для других клинических диагностических исследований в медицинской лаборатории:

- на плечо в срединной части накладывают резиновый/пластиковый жгут или манжету для обеспечения наполнения кровью поверхностных вен предплечья или локтевого сгиба; улучшить наполнение поверхностных вен помогает энергичное повторное сжатие кисти руки в кулак после наложения жгута или легкое поколачивание по коже в области вены;
- в области локтевого сгиба имеется несколько поверхностных вен, для венепункции выбирают и пальпируют наиболее развитую из них;
- участок кожи в области предполагаемого прокола обрабатывают при помощи стерильного ватного или марлевого тампона, смоченного антисептическим раствором (70° раствор этилового/изопропилового спирта или 70° раствор этилового спирта с хлоргексидином);
- выполняют прокол вены иглой со шприцом одноразового применения или иглой, фиксированной на пластиковом держателе, для получения крови в вакутейнеры;
- набирают необходимое количество венозной крови в шприц или в пробирки-вакутейнеры с активатором свертывания (красная или желтая крышка) и ослабляют давление жгута или манжеты;
- по окончании забора крови иглу быстро извлекают из вены, придавливая стерильной салфеткой или ватным тампоном место пункции во избежание образования гематомы;
- пробирку с кровью маркируют и помещают в вертикальном положении в штатив для хранения пробирок;
- в случае получения крови с помощью шприца, хирургическую иглу с него снимают, и кровь осторожно по стенке переливают в пробирку с гелем, активатором свертывания или без консерванта; выдавливание крови из шприца через иглу приводит к травматизации эритроцитов и гемолизу, что может приводить к неадекватным результатам лабораторных исследований;
- у грудных детей необходимое количество венозной крови получают при пункции височной вены, набухающей при плаче или крике ребенка; изредка применяют технику прокола или неглубокого надреза

ланцетом кожи в пяточной области (такие способы получения крови требуют опыта).

**Плазму крови** получают аналогичным способом, используя пробирки-вакутейнеры с фиолетовыми крышками (в пробирке имеются антикоагулянт К2 EDTA или К3 EDTA), зелеными (в качестве антикоагулянта — литий-гепарин или натрий-гепарин), голубыми крышками (содержат цитрат натрия).

Техника получения плазмы крови путем прокола кожи ланцетом на пальце руки и сборе крови с помощью капилляра аппарата Панченкова в настоящее время не рекомендуется к применению, так как не обеспечивает качественного получения необходимого объема плазмы и условий стерильности, для стабилизации крови используется 5% раствор натрия цитрата лабораторного приготовления и стерилизации.

### ***Транспортировка и хранение материала***

Маркированные пробирки с кровью, расставленные в лабораторные штативы в вертикальном положении осторожно транспортируют в лабораторию в специальном закрытом транспортном контейнере. При невозможности немедленной доставки в лабораторию пробирки с кровью хранят в холодильнике при температуре  $+4-8^{\circ}\text{C}$ , не допуская замораживания.

В летнее и зимнее время для продолжительной транспортировки крови с использованием транспорта обязательно используют транспортные термоконтейнеры с датчиками температуры.

В лаборатории образцы крови подвергают подготовке к исследованию: центрифугированию в лабораторной центрифуге в течение 10 минут при скорости вращения ротора 3 000 оборотов в минуту. При этом гель или гранулы со дна пробирки поднимаются над сгустком и отделяет его от сыворотки крови, облегчая последующее извлечение сыворотки.

При поступлении в лабораторию свежих, не свернувшихся образцов крови без стабилизатора, пробирки помещают в термостат при  $+37^{\circ}\text{C}$  на 15–20 минут для образования и ретракции сгустка фибрина, после чего их также подвергают центрифугированию. После центрифугирования пробирки переставляют в штативы, при этом обращают внимание на пригодность сыворотки крови для полноценного исследования.

Для исследования в иммунохимических (серологических) тестах при диагностике сифилиса непригодны образцы сыворотки/плазмы крови с выраженным гемолизом, содержащие жировые включения и со следами бактериального пророста.

Образцы сыворотки крови, хранящиеся в условиях бытового холодильника при температуре +4-8° С в пробирках над разделительным гелем или сгустками пригодны для исследования в течение 1 недели после получения.

При необходимости хранения образцов крови в течение более длительных сроков проводят замораживание сыворотки крови при разделении ее на несколько дублирующих аликвот по 0,5–1,0 мл в маркированных пробирках-эппендорфах. Замораживание при температуре минус 18–20°С позволяет хранить образцы в течение 1–1,5 месяцев, при более низких температурах (минус 65–80° С) сроки хранения практически не лимитируются. Не допускают оттаивание и повторное замораживание сыворотки крови — это особенно важно в отношении исследований содержания IgM; при необходимости проведения повторного исследования используют дублирующую пробирку (эппендорф) с образцом от этого пациента.

Оттаивание сыворотки крови для исследования проводят при комнатной температуре или при температуре плюс 2-8° С бытового холодильника. Для гомогенизации содержимого пробирки после оттаивания его **в обязательном порядке** несколько раз тщательно перемешивают перед исследованием.

По показаниям перед исследованием образцы сыворотки крови подвергают прогреванию в суховоздушном инактиваторе при 56° С в течение 30 минут; сыворотки, инактивированные накануне, подвергают повторной инактивации при той же температуре в течение 15 минут.

### 2.2.1. ТРЕПОНЕМОСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ТЕСТЫ

В трепонемных (трепонемоспецифических) тестах применяется антиген трепонемного происхождения:

- живая патогенная бледная трепонема штамма Nichols (РИБТ);
- фиксированная на предметном стекле патогенная бледная трепонема штамма Nichols (РИФ в разных модификациях);
- рекомбинантные белки, полученные генно-инженерным способом или пептиды, полученные путем искусственного биосинтеза (ИФА, РПГА, ИБ, ИХлА, ИХр, исследование на белковых иммуночипах).

**Показания к применению ТТ:** для скрининга сифилиса при массовых обследованиях населения, в качестве дополнительного лабораторного теста при установлении клинического анализа при манифестных формах раннего сифилиса, основного метода диагностики скрытых и поздних форм заболевания, при клинико-серологическом наблюдении больных,

ранее получивших антибактериальную терапию, для дифференциации ложноположительных результатов нетрепонемных тестов, для установления ретроспективного диагноза.

***Ограничения применения ТТ:***

- не могут служить для оценки эффективности проведенного антибактериального лечения, так как специфические антитрепонемные антитела длительное время циркулируют в крови переболевших сифилисом людей (нередко в течение всей последующей жизни),
- разные модификации одного и того же ТТ предназначены для разных клинических целей: определение содержания суммарных антител к возбудителю сифилиса является предпочтительным для скрининга, определение специфических IgG — для скрининга и подтверждения инфекции, определение ИФА-IgM — для ранней диагностики на начальных этапах развития инфекции (период инкубации, первичный, ранний врожденный сифилис), а также и для дифференциации рецидива и реинфекции; одновременное исследование IgG и IgM-антител может оказать помощь при установлении фазы инфекции (ранняя, поздняя) и ретроспективной диагностики.

***РЕАКЦИЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ БЛЕДНЫХ ТРЕПОНЕМ  
(РИБТ, РИТ)***

***Показания:*** серодиагностика сифилиса и нейросифилиса (определение трепонемоспецифических антител при диагностике сифилиса в сыворотке/плазме крови и при диагностике нейросифилиса — в ликворе).

***Противопоказания:*** не установлены.

***Ограничение:*** любые формы антибактериальной терапии у обследуемых лиц в период получения у них образцов крови или ликвора, так как присутствие антибиотика (особенно пенициллина) в исследуемой пробе губительно действует на живые патогенные бледные трепонемы, используемые в реакции.

***Принцип метода.*** Реакция основана на гибели и/или потере подвижности бледными трепонемами патогенного штамма Nichols в присутствии иммобилизирующих противотрепонемных антител, содержащихся в исследуемых образцах сыворотки/плазмы крови больного сифилисом или ликворе больного нейросифилисом, и избытка комплемента животного происхождения при инкубации в условиях анаэробноз.

**Подготовительный этап.** Постановке реакции предшествует большая подготовительная работа. В условиях вивария организуется регулярная перевивка *T. pallidum* патогенного штамма *Nichols* на лабораторных кроликах. Для этого здорового животного заражают внутрь яичка взвесью бледных трепонем, полученных от кролика, на котором осуществлялся предшествовавший пассаж возбудителя сифилиса; через 7–9 дней у этого кролика развивается специфический орхит, и в тканях его яичка накапливается большое количество подвижных бледных трепонем. Взвесь бледных трепонем в день ее получения от кролика с орхитом, используется для постановки РИБТ и заражения нового кролика. Концентрированную суспензию бледных трепонем разводят стерильным физиологическим раствором для приготовления рабочей концентрации (10–15 микроорганизмов) — антиген для РИБТ.

От здоровых морских свинок из полости сердца в стерильных условиях получают кровь и отделяют ее сыворотку, богатую комплементом. В исследовании используется пул сыворотки крови (комплемент), полученной от 8–10 животных, который сохраняют в лаборатории в замороженном виде.

Вся лабораторная посуда, используемая для постановки РИБТ (пипетки, или наконечники дозирующих устройств, пробирки, проницаемые для воздуха пробки к пробиркам, флаконы и другое), должны быть стерильными.

#### ***Ход исследования сыворотки/плазмы крови в РИБТ***

**День 1.** Постановку реакции проводят в ламинарном боксе. Каждую сыворотку крови исследуют в двух маркированных пробирках: опытной (с активным комплементом) и контрольной (с комплементом инактивированным).

В обе пробирки вносят по 0,05 мл исследуемой сыворотки крови (прогретых при +37° С для инактивации собственного комплемента) и по 0,35 мл антигена (рабочая взвесь живых подвижных бледных трепонем штамма Никольс). В опытную пробирку добавляют 0,15 мл активного комплемента, а в контрольную — такое же количество инактивированной сыворотки крови морской свинки. Аналогично поступают с другими исследуемыми образцами и контрольными сыворотками крови: К+ и К-. Содержимое пробирок перемешивают легким встряхиванием и все их помещают в микроанаэростат, из которого с помощью вакуумного насоса удаляют атмосферный воздух и заполняют его газовой смесью из баллона (содержит азот — 95 частей и углекислый газ — 5 частей). Микроанаэро-

стат с пробирками помещают в термостат с температурой 35° С на 18–20 часов.

Таким образом, в РИБТ осуществляется 5 контрольных исследований: с заведомо положительной и отрицательной сыворотками крови, с активным и инактивированным комплементом и еще с реагентами для приготовления рабочей суспензии бледных трепонем. Контрольную отрицательную сыворотку крови (К-) применяют для суждения о степени подвижности бледных трепонем, К+ — для оценки иммобилизирующей активности в условиях данного опыта. Исследование активного и инактивированного комплемента и физ. раствора проводят для определения их влияния на подвижность бледных трепонем.

**День 2.** Через 18–20 часов инкубации пробирки вынимают из термостата и микроанаэростата и расставляют в штативе попарно (опытная и контрольная). Из каждой пары пробирок готовят препараты на предметных стеклах, накрывают их покровными стеклами и исследуют под микроскопом с конденсором темного поля с объективом х40 и окуляром х10. Просматривают несколько полей зрения в разных участках препарата, подсчитывая число подвижных и неподвижных бледных трепонем. Подсчет начинают с препарата из контрольной, а затем — из опытной пробирки.

Оценка результатов реакции проводится по % иммобилизации: соотношению числа подвижных и неподвижных трепонем в опыте (активный комплемент) и контроле (неактивный комплемент) — рассчитывается по следующей формуле:

$$X = \frac{A-B}{A} \times 100 ,$$

где X – процент иммобилизации:

A – количество подвижных трепонем в контрольной пробирке;

B – количество подвижных трепонем в опытной пробирке.

После регистрации результатов РИБТ в содержимом пробирок определяют остаточный комплемент путем добавления в каждую пробирку гемолитической системы в объеме 0,1 мл, пробирки помещают в термостат при 37°С на 45 минут. В опытных пробирках должен наступить гемолиз эритроцитов, в контрольных пробирках — задержка гемолиза.

#### ***Техника постановки РИБТ с ликвором***

Ликвор в пробирки вводят в увеличенном в 4 раза объеме (по 0,2 мл), цельным и неинактивированным, антиген (взвесь бледных трепонем) разводят до концентрации 20–25 микроорганизмов в поле зрения, а

объемы комплемента и антигена не меняются. В остальном техника постановки аналогична исследованию сыворотки/ плазмы крови.

### ***Интерпретация результатов исследования***

В лечебную сеть из лаборатории результаты исследования в РИБТ выдаются в виде % **иммобилизации** и заключения лабораторного специалиста.

Результаты РИБТ считаются отрицательными (свидетельствующими об отсутствии в исследуемой пробе антител, иммобилизующих трепонемы) при показателе иммобилизации в пределах 0–20%, сомнительными — от 21 до 30%, слабоположительными — от 31 до 50% и положительными — выше 50% (выявление в исследуемой пробе иммобилизующих трепонемы антител).

Образцы с сомнительными и слабоположительными результатами РИБТ нуждаются в повторном исследовании для подтверждения или получения более достоверных результатов; повторному исследованию целесообразно также подвергать все биологические пробы, давшие полное расхождение результатов с результатами других трепонемоспецифических тестов. Такой подход с повторным воспроизведением РИБТ обеспечивает высокое качество и надежность результатов исследования и дает возможность клиницисту судить о наличии или отсутствии сифилиса у обследуемых лиц.

***Источниками ошибок при постановке РИБТ*** могут являться:

- токсичность исследуемых проб сыворотки/плазмы крови или ликвора (содержат антибактериальные компоненты, вызывающие гибель бактерий);
- бактериальное загрязнение исследуемых образцов, антигена, комплемента, физиологического раствора;
- недостаток комплемента в опыте;
- нарушение герметичности микроанаэростата, приводящее к проникновению в него кислорода из атмосферного воздуха;
- повышение или понижение температуры в термостате в течение реакции;
- повышенная кислотность или щелочность используемой лабораторной посуды.

### ***Оценка диагностической значимости РИБТ***

РИБТ признается самым специфичным тестом на сифилис. Вместе с тем эта реакция не лишена недостатков: мало пригодна для диагностики ранних стадий сифилиса ввиду позднего (не ранее 3–6 недель от момента

заражения) появления антител — иммубилизинов. По данным ЦНИКВИ, ее клиническая чувствительность (суммарно по всем стадиям сифилиса) составляет 87,7%.

РИБТ — достаточно сложное, трудоемкое и дорогостоящее исследование, требующее высокой квалификации персонала и содержания вивария, в связи с чем применение данного метода в последние годы существенно сократилось.

### ***РЕАКЦИЯ НЕПРЯМОЙ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ (РИФ)***

***Показания:*** серодиагностика сифилиса и нейросифилиса (определение трепонемоспецифических антител при диагностике сифилиса в сыворотке/плазме крови и при диагностике нейросифилиса — в ликворе).

***Противопоказания:*** не установлены.

***Принцип непрямого метода:*** трепонемоспецифические антитела, содержащиеся в сыворотке крови больных сифилисом, взаимодействуют с антигенами бледных трепонем strain Nichols, фиксированными на предметных стеклах, с образованием специфических комплексов антиген-антитело, которые выявляют иммунной антивидовой (против глобулинов человека) сывороткой, меченной флюорохромом. При люминесцентной микроскопии наблюдается свечение бледных трепонем, пропорциональное содержанию антител в пробе.

Исследование в РИФ проводят только с реагентами или наборами реагентов, разрешенными для применения в учреждениях здравоохранения для диагностических целей.

#### ***Ход исследования сыворотки/плазмы крови в РИФ***

***I фаза реакции.*** Подготовленные испытуемые наносят на фиксированный на предметных стеклах антиген и инкубируют 30 минут во влажной камере у в термостате при температуре +37° С. Осуществляют промывание стекол от не вступивших в реакцию компонентов.

***II фаза реакции.*** На препараты наносят люминесцирующую сыворотку и вновь помещают во влажную камеру на 30 минут при комнатной температуре. По окончании инкубации препараты промывают, высушивают и монтируют для люминесцентной микроскопии (наносят на поверхность мазков по капле нелюминесцирующего иммерсионного масла или диметилфталата).

С целью повышения клинической чувствительности применяют модификации РИФ, позволяющие минимизировать влияние неспецифических антител, содержащихся в исследуемых образцах, на результаты ис-

следования: с предварительным разведением в 200 раз (**РИФ<sub>200</sub>**) или устранением их активности путем абсорбции антигеном из непатогенных трепонем strain Reuter (**РИФ<sub>abc</sub>**). Исследование цереброспинальной жидкости осуществляется без ее предварительного разведения (в цельном виде) — **РИФ<sub>ц</sub>**.

Кроме того, разработаны лабораторные техники отдельного определения специфических антител класса М и G в каждой модификации реакции.

#### ***Ход исследования сыворотки/плазмы крови в РИФ-IgG и РИФ-IgM***

При определении трепонемоспецифических IgG исследуемые образцы подвергаются обработке в соответствии с применяемой модификацией РИФ, а при определении специфических IgM сыворотку/ плазму крови или ликвор предварительно инкубируют с РФ-сорбентом, что позволяет удалить неспецифическое влияние на результаты исследования со стороны ревматоидного фактора сыворотки крови и предотвращать вытеснение из иммунной реакции специфических антител класса М антителами класса G.

#### ***Ход исследования цереброспинальной жидкости в РИФ<sub>ц</sub>***

Для постановки РИФ-ц используют тот же антиген и люминесцирующую сыворотку, ликвор вводится в реакцию неинактивированным и цельным.

#### ***Интерпретация результатов исследования***

Исследование препаратов при исследовании в РИФ проводят в люминесцентном микроскопе с ртутно-кварцевой лампой ДРШ-250 с иммерсионной системой, окуляром 4х или 5х и фильтрами СЗС-7 или 14, ФС-1, БС-8 и ЖС-18 или Т-2Н.

Учет реакции осуществляется путем оценки степени свечения бледных трепонем по системе «4 плюсов». Положительными в РИФ считают образцы, с которыми получено зелено-желтое свечение на «++++» (яркое, блестящее), «+++» (яркое) и «++» (слабое), что указывает на присутствие в исследуемой пробе трепонемоспецифических антител.

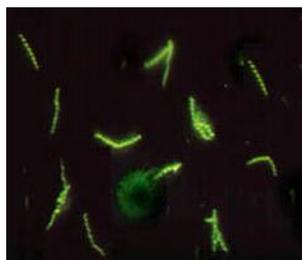


Рис. 5. *T. pallidum* под люминесцентным микроскопом

Отрицательные результаты: «+» (очень слабое свечение, тени трепонем) или «-» (на уровне фона) — свидетельство отсутствия в исследуемой пробе антител к антигенам трепонемы.

Раздельное определение антител не только класса G, но и M используют для диагностики сифилиса в целом, а также для ранней диагностики ранних форм заболевания, подтверждения диагноза раннего врожденного сифилиса, дифференциации рецидива и реинфекции (определение специфических IgM).

**Источниками ошибок при постановке РИФ** являются:

- низкое качество антигена, несоблюдение условий хранения реагентов и постановки реакции;
- нанесение исследуемого материала или люминесцирующей сыворотки при постановке реакции не на препарат, а на обратную сторону предметного стекла;
- неправильная установка освещения в люминесцентном микроскопе.

**Оценка диагностической значимости РИФ**

РИФ<sub>-abc</sub> считается наиболее чувствительным тестом на сифилис и «золотым стандартом» серодиагностики (сыворотку разводят в 5 раз и обрабатывают сорбентом для удаления групповых антител); при постановке РИФ<sub>-200</sub> сыворотку разводят в 200 раз; при этом специфичность реакции возрастает, но чувствительность несколько падает. Как правило, обе модификации РИФ<sub>-abc</sub> и РИФ<sub>-200</sub> назначают и выполняют одновременно, что обеспечивает большую информативность и надежность результатов теста.

РИФ достаточно альтернативна и относительно проста в постановке, чувствительна на всех стадиях инфекции, начиная от периода инкубации и кончая поздним сифилисом, может применяться как подтверждающий тест при скрытом сифилисе и в качестве экспертного метода — при установлении ретроспективного диагноза и дифференциации сифилиса и ложноположительных результатов. По данным ВОЗ ее чувствительность составляет: при первичном сифилисе — 70–100%, при вторичном и позднем — 96–100%, а специфичность — 94–100%; по данным ГУ ЦНИКВИ чувствительность РИФ при всех формах сифилиса составляет 99,1%.

РИФ<sub>-ц</sub> обладает максимальной чувствительностью, по сравнению со всеми другими используемыми для ликвородиагностики сифилиса тестами, поэтому эта модификация РИФ может быть рекомендована для диагностики нейросифилиса при всех его формах.

РИФ достаточно широко используется в качестве подтверждающего теста, но вместе с тем она имеет ряд недостатков.

- в техническом отношении метод является трудоемким и не может применяться для скрининга на сифилис;
- выполнение теста и чтение его результатов требует высокой квалификации персонала;
- может давать ложноположительные результаты примерно у 1% населения, в особенности у больных с аутоиммунной патологией, лепрой, тропическими трепонематозами, что требует осторожности ее трактовки у этих больных.

### **ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ (ИФА)**

**Показания:** серодиагностика сифилиса и нейросифилиса (определение трепонемо-специфических антител при диагностике сифилиса в сыворотке/плазме крови и при диагностике нейросифилиса — в ликворе).

**Противопоказания:** не установлены.

**Принцип метода** состоит во взаимодействии антител больных сифилисом с антигенами бледной трепонемы, фиксированными на внутренней поверхности лунок полистиролового планшета для иммунологических исследований, и последующего выявления образовавшихся иммунных комплексов с помощью специфических конъюгатов в цветной реакции при добавлении соответствующих субстратно-хромогенных добавок.

Специфические антигены, применяемые для ИФА, могут иметь различное происхождение:

- ультразвученные (разрушенные ультразвуком или иным методом клетки *T. pallidum*);
- рекомбинантные (полученные генно-инженерными технологиями: внедрением в геном способных к культивированию микроорганизмов (например: *E. coli* или *Saccharomyces ssp.*) гена, ответственного за синтез определенного антигена *T. pallidum*, с последующим наращиванием бактериальной массы продуцирующих микроорганизмов, разрушением этих клеток, выделением и очисткой антигена); наиболее часто применяют иммунодоминантные белки бледной трепонемы с молекулярной массой 15, 17 и 47кД;
- пептидные (полученные в результате последовательного химического синтеза антигенных эпитопов белков *T. pallidum*).

### ***Ход исследования сыворотки/плазмы крови в ИФА***

Предложено несколько принципиальных вариантов ИФА на твердофазном носителе: классический (непрямой), ловушечный и модифицированный двухфазный.

- ***классический (непрямой) вариант ИФА:***

- в производственных условиях внутреннюю поверхность лунок иммунологического планшета сенсibiliзируют антигенами *T. pallidum*;
- при внесении в лунки испытуемых сывороток, содержащих специфические антитела, и инкубировании образуются иммунные комплексы, которые остаются связанными после отмыwania буферным раствором (I фаза);
- в лунки добавляют конъюгат (антитела к иммуноглобулинам человека, меченные ферментом — пероксидазой хрена) и инкубируют (II фаза);
- после отмыwania буфером образование сложных иммунных «сэндвич-комплексов» определяют внесением в лунки субстратно-индикаторного раствора (перекиси водорода, расщепляемой ферментом конъюгата) с хромогеном (ТМБ, изменяющим цвет при взаимодействии с атомарным кислородом) (III фаза);
- насыщенность цвета реакционной среды в лунке пропорциональна количеству антитрепонемных антител из исследуемого образца, включившихся в реакцию, что измеряется на спектрофотометре;

- ***ловушечный вариант*** (для выявления иммуноглобулинов определенных классов):

- в производственных условиях внутреннюю поверхность лунок иммунологического планшета сенсibiliзируют аффинно очищенными антителами к иммуноглобулинам человека определенного класса (например: IgM, IgG или IgA);
- при внесении в лунки испытуемых сывороток и инкубировании иммуноглобулины соответствующего класса, связываются с антителами на стенках лунок (I фаза);
- наличие специфических антител среди иммобилизованных иммуноглобулинов выявляют внесением антигенов бледной трепонемы, конъюгированных с ферментом — пероксидазой хрена (II фаза);
- результаты реакции визуализируют добавлением в реакцию хромоген-субстратной смеси (III фаза).

• **модифицированный двухфазный вариант** (для выявления *антител*, специфических к определенному антигену *суммарно*, независимо от их класса):

- в производственных условиях внутреннюю поверхность лунок иммунологического планшета сенсibiliзируют антигенами *T. pallidum*;
- специфические антитела испытуемой сыворотки крови взаимодействуют одновременно с антигеном, фиксированным на внутренней поверхности лунок и тем же антигеном, помеченным с ферментом, при совместном инкубировании испытуемого образца и конъюгата (I фаза);
- образование иммунных комплексов определяют с помощью субстратно-индикаторной смеси с ТМБ (II фаза).

ИФА выполняется в цельных или разборных иммунологических планшетах (12 стрипов по 8 лунок), в качественном и количественном вариантах.

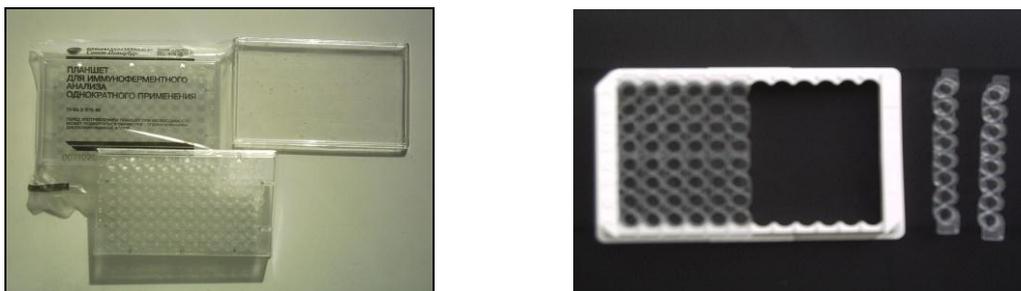


Рис. 6. Иммунологические планшеты для постановки ИФА

### **Особенности исследования цереброспинальной жидкости в ИФА**

Исследование ликвора с целью диагностики нейросифилиса проводят с наборами реагентов для выявления иммуноглобулинов класса G (по первой схеме проведения реакции — классический непрямой вариант). Ликвор в реакцию водят цельным и неинактивированным. Проведение ИФА и учет результатов осуществляют в соответствии с инструкцией по применению тест-систем, за исключением пунктов, касающихся разведения ликвора и приготовления рабочих растворов конъюгата. Так, разведение ликвора в I фазе соответствует 1:2 (50 мкл ликвора + 50 мкл раствора для разведения), в отличие от разведения сыворотки/плазмы крови 1:10 (10 мкл сыворотки/плазмы крови + 90 мкл раствора для разведения), а во II фазе реакции — концентрацию раствора конъюгата увеличивают в 4 ра-

за по сравнению с указаниями в инструкции для сыворотки или плазмы крови.

По своей диагностической эффективности исследование ликвора в ИФА приближено к РИФ-ц — самой чувствительной и специфичной реакции при диагностике нейросифилиса.

### ***Интерпретация результатов исследования***

Результаты исследований в ИФА оценивают с помощью автоматических программируемых спектрофотометров по величине оцифрованных показателей оптической плотности (ОП) окрашенного субстрата в лунках. При каждой постановке ИФА (в аналитической серии) рассчитывают критическое значение  $ОП_{крит}$  (или cut off) и «серую зону» (неопределенный результат — это интервал результатов исследования в пределах  $\pm 10\%$  от  $ОП_{крит}$ ).

Результат исследования учитывают как **положительный** (выявление в исследуемой пробе трепонемных антител), если ОП с данным образцом имеет более высокое значение, чем «серая зона»; как **сомнительный** или **неопределенный**, если ОП — в пределах «серой зоны»; и как **отрицательный** (отсутствие в исследуемой пробе антител к антигенам трепонемы), если значение ОП меньше «серой зоны».

Для количественной оценки содержания антител в испытуемом образце в настоящее время используют вычисление коэффициента позитивности (**КП**), равного отношению  $ОП_i$  — для исследованного образца к  $ОП_{крит}$ :  $КП = \frac{ОП_i}{ОП_{крит}}$ . Расчет значения КП осуществляется автоматически при настройке современных автоматических спектрофотометров.

В тест-системах с выделением «серой зоны» КП у положительных образцов — выше 1,1, у сомнительных — в интервале от 0,9 до 1,1 и у отрицательных — ниже 0,9. В тест-системах, не предусматривающих выделение «серой зоны» при интерпретации полученных результатов, положительный результат — при КП выше или равен 1,0, а отрицательный — ниже 1,0.

Величину КП учитывают при оценке динамики выработки антител у пациентов в процессе клинико-серологического наблюдения за ними, при этом обязательно используют одну и ту же тест-систему; эта методика не требует дополнительных затрат и дает представление об эффективности лечения.

Все выпускаемые промышленным способом и разрешенные к применению в медицинских организациях наборы реагентов (тест-системы)

для ИФА невозможно привести к единому стандарту. Это зависит от конструкции самой тест-системы, используемого оригинального комплекса антигенов *T. pallidum*, концентрации конъюгата и других составляющих, а также от методики подсчета величины  $ОП_{крит}$ . В связи с этим один и тот же образец биоматериала может демонстрировать в разных тест-системах отличающийся уровень окрашивания раствора субстрата (и отличающийся уровень содержания антител).

Исследованные образцы, для которых получены сомнительные или неопределенные результаты (КП — в интервале 0,9–1,1), подлежат повторному исследованию. Рекомендуется исследование новой порции крови, взятой у этого пациента через 3–7 дней или одновременное исследование этих обеих сывороток (парных сывороток). Динамика показателя КП будет отражать изменения в содержании специфических антител у пациента.

**Источники ошибок при постановке ИФА** подразделяются на внелабораторные (нарушения техники взятия крови, условий транспортировки и хранения проб, а также и тест-систем) и внутрिलाбораторные (преаналитические, собственно аналитические и постаналитические).

#### **Оценка диагностической значимости ИФА**

ИФА приобрел широкую распространенность в связи с удобным форматом для исследования в образцах биоматериала разных видов аналитов (антител разных классов и разной специфичности отдельно или совместно, гормонов, витаминов, онкомаркеров и других).

Для проведения ИФА необходимо дополнительное специальное оборудование, методики постановки выполняются в течение одной рабочей смены лаборатории. ИФА удобно использовать при одновременном исследовании большого количества образцов, с сохранением высокой аналитической и клинической специфичности и чувствительности, проведение исследования и чтение результатов легко автоматизируется, отчеты создаются в электронном виде, что исключает технические ошибки при их записи вручную, минимизировано влияние субъективного элемента.

К преимуществам ИФА также относят высокую клиническую специфичность (96–100%) и чувствительность (98–100%) результатов (по приказу № 87 МЗ РФ от 2001 года чувствительность ИФА при сифилисе составляет 99,1%).

## **РЕАКЦИЯ ПАССИВНОЙ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ (РПГА)**

**Показания:** серодиагностика сифилиса и нейросифилиса (определение трепонемоспецифических антител при диагностике сифилиса в сыворотке/плазме крови и при диагностике нейросифилиса — в ликворе).

**Противопоказания:** не установлены.

**Принцип метода.** При взаимодействии трепонемоспецифических антител, содержащихся в сыворотке крови больных сифилисом, с антигенами бледной трепонемы, сенсibiliзирующими стабилизированные эритроциты животных (носитель антигена), происходит образование иммунных комплексов и видимая невооруженным глазом агглютинация эритроцитов.

### **Ход исследования в РПГА**

Используют наборы реагентов для РПГА промышленного производства, разрешенные к применению в медицинских учреждениях здравоохранения.

В РПГА исследуют сыворотку крови (*не используют плазму крови* в связи с возможностью дестабилизации и выпадении нитей фибрина из раствора) или цереброспинальную жидкость.

**Качественное исследование** проводят в 3 лунках с полусферическим U-образным дном иммунологических планшетов:

- в первой лунке готовят разведение исследуемого образца в растворе для разведения образца в соотношении 1:20;
- во второй лунке смешивают 1 часть приготовленного разведения 1:20 исследуемого образца и 3 части контрольных эритроцитов;
- в третьей лунке смешивают 1 часть приготовленного разведения 1:20 исследуемого образца и 3 части тест-эритроцитов, которые сенсibiliзированы ультразвученным антигеном патогенной бледной трепонемы или рекомбинантными белками: TrN15, TrN17, TrN47, (финальное разведение исследуемого образца 1:80);
- планшет выдерживают на неподвижной основе не менее 45–60 минут.

**Количественное исследование** проводят в 8–11 лунках с полусферическим U-образным дном иммунологических планшетов (в зависимости от целей исследования и возможностей лаборатории):

- в первой лунке готовят разведение исследуемого образца в растворе для разведения образца в соотношении 1:20;

- во второй лунке смешивают 1 часть приготовленного разведения 1:20 исследуемого образца и 3 части контрольных эритроцитов;
- в третьей лунке смешивают 1 часть приготовленного разведения 1:20 исследуемого образца и 3 части сенсibilизированных тест-эритроцитов, (финальное разведение исследуемого образца 1:80);
- в 4–8 или 4–11 лунки готовят серию последовательных 2-кратных разведений исходного разведения 1:20 исследуемого образца и добавляют к каждому по 3 части сенсibilизированных тест-эритроцитов, (финальное разведение исследуемых образцов 1:160 – 1:2 560 или 1:160 – 1:20 480 соответственно);
- планшет выдерживают на неподвижной основе не менее 45–60 минут.

### ***Интерпретация результатов исследования***

Присутствие специфических антител в исследуемом образце и их взаимодействие с антигенами бледной трепонемы на эритроцитах приводит к образованию пространственных структур иммунных комплексов антитело+антиген-на-эритроцитах, которые под действием сил тяжести постепенно опускаются вниз, распределяются по всей поверхности дна лунки и формируют характерную картину осадка в виде «перевернутого зонтика». В зависимости от количества иммунных антител величина осадка варьирует от максимального, занимающего всю поверхность U-образного дна лунки, до небольшого участка в центральной, наиболее низко расположенной его части, с выраженным просветлением в центре и формированием более интенсивного кольца из осевших эритроцитов по периферии.

При отсутствии в исследуемом образце специфических антител или при добавлении к образцу интактных (контрольных) эритроцитов иммунные комплексы не образуются, и эритроциты собираются в самой нижней точке дна лунки, формируя компактное пятно или «пуговку», редко с незначительным просветлением в центре.

Результаты исследований в РПГА оценивают визуально или с помощью автоматических сканирующих устройств с распознаванием визуального изображения. Результат учитывают по системе «четырёх плюсов»:



Рис.7. Чтение результатов РПГА

В целях повышения специфичности диагностикума антитела к непатогенным видам трепонем, потенциально содержащиеся в исследуемых образцах, адсорбируют водным экстрактам антигенов трепонемы штамма Рейтера, входящим в состав раствора для разведения образцов.

### ***Ошибки при постановке РПГА***

К наиболее типичным **техническим ошибкам** при постановке РПГА, приводящим к получению недостоверных результатов, следует отнести неточное разведение ингредиентов, несоблюдение времени инкубации или вибрация основы, на которую помещен иммунологический планшет (за счет микровстряхивания происходит скатывание иммунных комплексов и эритроцитов к центру дна лунки — «занижение» степени позитивности или ложный отрицательный результат).

### ***Оценка диагностической значимости результатов РПГА***

Гемагглютинационные трепонемные тесты отличаются высокой клинической чувствительностью и специфичностью, простотой и быстротой (45–60 мин) постановки; пригодны для исследования аналитической серии или единичных образцов, не требуют специального оборудования и высокой квалификации персонала; имеют невысокую стоимость; могут применяться как для скрининга, так и для подтверждения сифилиса; позволяют производить полуколичественные измерения количества (титра) специфических антител в образцах. Кроме того, имеется возможность автоматизации учета результатов с помощью специальных сканирующих устройств и компьютерных программ.

Реакция становится положительной спустя 3–4 недели после появления твердого шанкра. В зависимости от стадии заболевания клиническая чувствительность РПГА колеблется: от 76% — при первичном, до 100% — при вторичном сифилисе и 94–97% — при скрытых формах течения этой инфекции. По данным ЦНИКВИ чувствительность РПГА при диа-

гностике сифилиса составила 99,4% (Приказ №87 МЗ РФ). Большинство исследователей отмечают 98–99% специфичность РПГА.

К недостаткам РПГА можно отнести возможность получения (как и в других диагностических методах) ложноположительных результатов.

### **ЛИНЕЙНЫЙ ИММУНОБЛОТТИНГ (ЛИБ)**

**Показания:** серодиагностика сифилиса и нейросифилиса (определение трепонемоспецифических антител при диагностике сифилиса в сыворотке/плазме крови и при диагностике нейросифилиса — в ликворе).

**Противопоказания:** не установлены.

**Принцип метода:** при взаимодействии антител, содержащихся в испытуемой сыворотке/плазме крови больных сифилисом, с дискретно иммобилизованными на линейном стрипе рекомбинантными антигенами *T. pallidum*, образуются комплексы антиген-антитело; выявление этих комплексов проводится иммуноферментным методом. В качестве антигенов наиболее часто используются рекомбинантные белки TrpN15, TrpN17, TrpA (41-44.5), TrpN47.

#### **Ход исследования в ЛИБ**

В России для диагностики сифилиса методом ЛИБ разрешено использовать только разрешенные наборы реагентов:

- в индивидуальные маркированные продольные лоточки вносят по 1 мл разводящего раствора, погружают по одному нумерованному стрипу для ЛИБ и добавляют по 10–20 мкл исследуемой сыворотки/плазмы крови; лоточки заклеивают адгезивной пленкой и помещают на орбитальный шейкер для постоянного перемешивания реакционной среды при комнатной температуре (+18-30°C); срок инкубации — от 2 до 16 часов (ночная экспозиция) с разными наборами;
- с помощью пипеточного дозатора или вакуумного аспиратора из лоточков инкубирующий раствор удаляют, стрипы 3–5 раз промывают отмывающим раствором;
- в лоточки со стрипами вносят конъюгат и вновь инкубируют на платформе шейкера при комнатной температуре в течение 30 минут;
- вновь проводят процедуру отмывания стрипов;
- для визуализации результатов реакции в лоточек добавляют смесь субстрата и хромогена и инкубируют на шейкера при комнатной температуре в течение 30 минут;

- по завершении процесса исследования субстратную смесь удаляют и для прекращения ферментации в лоточки вносят стоп-раствор или стрипы промывают проточной водой;
- стрипы при помощи пластикового пинцета выкладывают на фильтровальную бумагу и просушивают;
- индивидуальные стрипы при помощи скотча закрепляют на стандартном бланке протокола исследования для регистрации и последующего хранения (при комнатной температуре в защищенном от света месте).

### ***Интерпретация результатов исследования***

При оценке результатов реакции в ЛИБ соблюдают ряд условий, необходимых для получения достоверных результатов:

- оценку интенсивности окрашивания полос проводят на высушенном стрипе;
- оценивают выраженность трех калибровочных линий: «3+», «1+» и «±/ 0,5+» (причем полоса «3+» должна быть окрашена интенсивнее «1+») и отсутствие окрашивания линии нанесения стрептавицина (при появлении окраски этого локуса результаты расцениваются как **неинтерпретируемые**, поскольку за счет присутствия антител к нему возможно окрашивание и других полос, что не отражает присутствия антител к другим антигенам);
- окрашивание каждой полосы сопоставляют с интенсивностью окрашивания калибровочных линий в условных единицах по «системе 4 плюсов»;
- результат считается **отрицательным**, если все антигенные полосы на стрипе не окрашены или окрашены с интенсивностью слабее «± / 0,5+»;
- результат считается **неопределенным** в случае окрашивания только одной антигенной полосы на стрипе с интенсивностью «1+» или выше (рекомендуется повторное исследование новой порции крови с интервалом в несколько недель);
- результат учитывается **положительным**, если две или более антигенные полосы на стрипе окрашены с интенсивностью «±» или **выше**.

### ***Источники ошибок при проведении линейного иммуноблоттинга:***

- использование некачественных образцов сыворотки/плазмы крови или ликвора (гемолизированные, хилезные, с бактериальным ростом);

- при несоблюдении условий постановки реакции (нарушение кратности и длительности процедуры отмыывания стрипов, сокращение времени инкубации);
- несоответствие параметров работы орбитального шейкера требуемым характеристикам;
- ошибки в учете и интерпретации результатов.

### ***Оценка диагностической значимости результатов в ЛИБ***

Иммуноблоттинг является одним из современных трепонемных методов лабораторной диагностики сифилиса, который применяют для дифференциальной диагностики ложных положительных результатов, определяемых в других трепонемных тестах. Выявление антител осуществляется к каждому рекомбинантному антигену бледной трепонемы дифференцированно, что позволяет понять причину положительных результатов в тестах, в которых на иммуносорбенте размещены несколько антигенов бледной трепонемы одновременно.

Линейный иммуноблоттинг используют для определения IgG или IgM.

Согласно данным зарубежной литературы и результатам изучения в ЦНИКВИ, при диагностике сифилиса ЛИБ обладает высокой клинической чувствительностью (98,8–100%) и специфичностью (97,1–100%).

Метод легко воспроизводим, относительно прост в исполнении и интерпретации результатов, дает возможность оценивать вклад в общий иммунный ответ антител различной специфичности. Применение высокоочищенных рекомбинантных и пептидных антигенов снижает до минимума неспецифическую реактивность сывороток.

Разработаны технические возможности для автоматизации процесса исследования в ЛИБ, а также инструментальной оценки окраски полос на стрипах (сканирование) с программированным анализом интенсивности цвета, что способствует более широкому внедрению в практическое здравоохранение.

### ***ИММУНОХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ (ИХЛА)***

***Показания:*** серодиагностика сифилиса и нейросифилиса (определение трепонемоспецифических антител при диагностике сифилиса в сыворотке/плазме крови и при диагностике нейросифилиса — в ликворе).

***Противопоказания:*** не установлены.

***Принцип метода:*** антитела к *T. pallidum*, содержащиеся в сыворотке/плазме крови или ликворе больных сифилисом, взаимодействуют с ре-

комбинантными антигенами *T. pallidum*, фиксированными на полистироловых шариках или парамагнитных частицах, и конъюгатом (видоспецифические антитела против иммуноглобулинов человека + фермент), с образованием сложных иммунных комплексов, включающих ферментную метку. При внесении в реакционную среду хемилюминесцентного субстрата возникает хемилюминесценция — излучение фотонов света молекулами хемилюминесцентного субстрата за счет его ферментативного расщепления. Световой поток регистрируется чувствительным датчиком, люминометром.

Детекция хемилюминесцентного сигнала выявляет присутствие антител к *T. pallidum* (используют рекомбинантные белки TrN15, TrN17, TrpA, TrN47 дифференцированно или в различных комбинациях) и их количество.

### ***Ход исследования в ИХЛА***

Исследование проводится на закрытых автоматических хемилюминесцентных анализаторах с наборами реагентов, разрешенными их создателями для использования:

- на борт анализатора загружают необходимые реагенты и осуществляют процедуру первичной настройки, калибровки и выполняют контрольные исследования;
- загружают исследуемые образцы и программируют их исследование;
- исследование осуществляется в автоматическом режиме: длительность для первого образца составляет 35 мин. и для каждого последующего — 30 мин.;
- результаты исследования снимают в виде оцифрованных значений индекса иммунохемилюминесценции —  $I_{ИХЛ}$ , представляющего частное от деления показателя хемилюминесцентного сигнала с исследуемым образцом на величину порогового значения (cut off), установленного при калибровке прибора.

### ***Интерпретация результатов исследования в ИХЛА***

В каждое исследование (аналитическую серию) включают К<sup>+</sup> и К<sup>-</sup> — контрольные образцы из состава набора реагентов.

В соответствии с инструкцией к набору реагентов результаты исследования образцов интерпретируют:

- как **отрицательные** при получении значений  $I_{ИХЛ}$  ниже 0,9;
- как **неопределенные** — в интервале значений  $I_{ИХЛ}$  0,9–1,1;
- как **положительные** — при значении  $I_{ИХЛ}$  1,1 и выше.

### **Источники ошибок при проведении ИХЛА**

- использование некачественных образцов сыворотки/плазмы крови или ликвора (гемолизированные, хилезные, с бактериальным про-ростом);
- при несоблюдении условий постановки реакции.

### **Оценка диагностической значимости ИХЛА**

Из всех неизотопных методов хемилюминесценция обеспечивает наиболее высокую аналитическую чувствительность. Для иммунометрических методов чувствительность ИХЛА на порядки превосходит чувствительность радиоиммуноанализа. На основе метода иммунохемилюминесценции разработан ряд высокочувствительных и специфичных (98–100%) тест-систем для диагностики сифилиса, применяемых в основном за рубежом.

Метод легко воспроизводим, относительно прост в исполнении и интерпретации результатов.

Метод дает возможность не только качественного, но и количественного определения уровня антител к возбудителю сифилиса, в ряде стран используется для скрининга и подтверждения сифилитической инфекции, отдельного определения трепоне-специфических антител класса IgM и IgG.

### **ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ (ИХРА)**

**Показания:** серодиагностика сифилиса путем определения трепонемоспецифических антител в сыворотке/плазме крови.

**Противопоказания:** не установлены.

**Принцип метода:** антитела к *T. pallidum*, содержащиеся в сыворотке/плазме крови больных сифилисом, взаимодействуют при нанесении на стрип с рекомбинантными антигенами *T. pallidum*, конъюгированными с коллоидными частицами селена или золота (окрашенными в красный цвет), образуя иммунные комплексы. Эти специфические иммунные комплексы за счет взаимодействия свободных валентностей антитрепонемных антител связываются на участке, где иммобилизован аналогичный антиген возбудителя, что приводит к окрашиванию этой зоны в розово-красный цвет (интенсивность окраски пропорциональна содержанию специфических антител в исследуемых образцах). При отсутствии противотрепонемных антител в исследуемых образцах в зоне учета результатов образования комплексов и появления окрашенных полос не происходит.

### **Ход исследования в ИХрА**

Дополнительная подготовка не требуется; исследованию подлежат: цельная кровь, полученная при проколе кожи пальца, или сыворотка/плазма крови, полученные при венепункции.

Исследование в ИХрА проводится на специальной узкой тест-полоске из пористого инертного полимера (может быть заключена в пластиковую кассету), в соответствии с разметкой на нее наносят исследуемый образец цельной крови или сыворотки/плазмы крови, при необходимости подавляют сольвент и оставляют в неподвижном состоянии на 8–15 минут. Результат оценивают визуально по системе условных единиц «+, ++, +++ или ++++» или с применением сканирующих устройств с оцифрованным значением интенсивности цвета.

### **Интерпретация результатов исследования в ИХрА**

Результат теста подлежит учету и интерпретации только при формировании окрашенного участка в зоне внутреннего контроля теста; если в зоне контроля окрашивание отсутствует, то результат не учитывают исследование, повторяют с использованием другой серии набора реагентов.

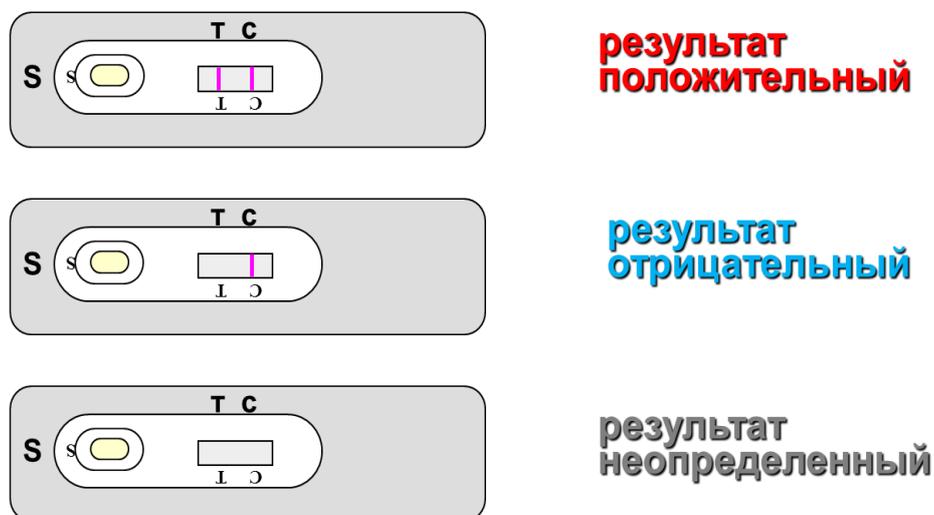


Рис. 8. Чтение результатов иммунохроматографического теста

Результат считается положительным (выявление в исследуемых образцах специфических антител к нанесенным на стрип рекомбинантным антигенам *T. pallidum*) при окрашивании индикаторных линий в зонах учета и внутреннего контроля в розовый или красный цвет.

Результат считается отрицательным (свидетельствующим об отсутствии в исследуемых образцах специфических антител к нанесенным на стрип рекомбинантным антигенам *T. pallidum*) при отсутствии окрашива-

ния индикаторной линии в зоне учета и формирования окрашенной в розовый или красный цвет линии в зоне внутреннего контроля.

### **Оценка диагностической значимости простых быстрых тестов**

ИХрА обеспечивают простоту, удобство, быстроту и экономичность проведения скринингового обследования без использования специального лабораторного оборудования и навыков (в том числе по эпидемиологическим показаниям в полевых условиях); это сравнительно молодой метод анализа (в литературе также именуется как метод сухой иммунохимии, стрип-тест или экспресс-анализ).

В разработанных наборах реагентов применяется тот же качественный состав рекомбинантных антигенов бледной трепонемы, что и в наборах реагентов для ИФА. Положительный результат ИХрА свидетельствует об имевшем место контакте пациента с возбудителем сифилиса (в том числе о когда-либо перенесенной инфекции и после окончания полноценного лечения); они могут давать ложноположительный результат.

В настоящее время развитие ИХрА направлено на создание «двойных» тестов, позволяющих, наряду со специфическими противотрепонемными антителами также определять антитела к кардиолипиновому антигену.

### **ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ТТ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ РАЗВИТИЯ**

В ТТ применяют антигены трепонемного происхождения (живая или убитая *T. pallidum*, рекомбинантные или биосинтетические белки, являющиеся полными аналогами антигенов патогенной *T. pallidum*, что обеспечивает высокую специфичность выявления у обследуемых лиц гуморальных антител при заболевании сифилисом.

Применяемые диагностические лабораторные технологии обладают разной клинической и аналитической чувствительностью (так, РИФ, ИФА, ЛИБ, ИХлА, ИХрА становятся положительными с 3-й недели после заражения и ранее, РПГА и РИБТ — с 7–8-й недели). Результаты исследования зависят от типа иммуноглобулинов, определяемых соответствующим методом.

Показаниями к применению ТТ являются: проведение скрининга на сифилис отдельных декретированных категорий населения (при госпитализации в ЛПУ, доноры крови, тканей и органов, беременные, больные офтальмологических, психоневрологических, кардиологических стационаров, ВИЧ-инфицированные — используются ИФА, РПГА, ИХлА, ИХрА), подтверждения результатов других ТТ и НТТ (особенно в случаях

расхождения данных лабораторных исследований и результатов клинических осмотров), при длительном клинико-серологическом контроле за состоянием показателей здоровья (гуморального иммунитета) у лиц, ранее получивших лечение по поводу сифилиса (количественные методики исследования в РИФ, ИФА, ИХрА, РПГА и ЛИБ).

Клиническая чувствительность ТТ в зависимости от вида теста и стадии сифилиса составляет 70–100%; специфичность — 94–100%. В таблице представлены усредненные данные диагностической эффективности ТТ на разных стадиях сифилитической инфекции, полученные с применением международных признанных стандартных панелей, а также наборов сывороток, тщательно охарактеризованных в референс-лабораториях разных стран.

Как следует из таблицы, трепонемные методы хорошо выявляют вторичный и скрытый сифилис (чувствительность около 100%). Однако чувствительность этих тестов недостаточна при первичном сифилисе (76–86%). Наилучшие показатели в этом отношении имеет РИФ<sub>АБС</sub>.

Таблица 1– Клиническая чувствительность иммунохимических тестов

Тест	Клиническая чувствительность на стадиях инфекции (в %)				Специфичность (в %)
	Первичный	Вторичный	Латентный	Поздний	
РИФ <sub>АБС</sub>	84 (70-100)	100	100	96	97 (94-100)
РПГА	76 (69-100)	100	97 (97-100)	94	99 (98-100)
ИФА <sub>IgG</sub>	81 (63-100)	100	100	-	99
ИФА <sub>IgM +IgG</sub>	88	100	97	-	99
ЛИБ <sub>IgG</sub>	90 (74-100)	99 (98-100)	96 (92-100)	100	99
ИХлА	98	100	100	100	95-100

К числу недостатков ТТ относят невозможность их использования для контроля эффективности лечения, так как их результаты длительно остаются положительными (в особенности — ИФА, РИБТ, РПГА) и могут давать позитивный результат при тропических и невенерических трепонематозах. Они более сложны в техническом отношении и имеют более высокую стоимость, чем НТТ.

Вектор развития ТТ направлен на поиск новых, высокоиммуногенных антигенов бледной трепонемы и создание на их основе новых диагностикумов. В настоящее время изучаются следующие кандидатные белки *T. pallidum*:

- **Тр0453** — 100% чувствительность и 100% специфичность;

- **Tr92 (Tr0326)** — 98% чувствительность и 97% специфичность;
- **Gpd (Tr0257)** — 91% чувствительность и 93% специфичность;
- протеин наружной мембраны **rTr0663** — чувствительность 98,83%;
- **Tr0965** — гипотетический мембранный протеин;
- **TrF1** — чувствительность для первичного, вторичного, скрытого и врожденного сифилиса — по 93,3; 100; 100 и 100% соответственно и специфичность — 100%;
- белки-флагеллины, обеспечивающие подвижность бледных трепонем (**FlaB1, FlaB2, FlaB3**), а также **Tr1038** — для идентификации IgG/IgM при диагностике первичного и врожденного сифилиса;
- **Tr0821** — чувствительность в ИФА<sub>IgM</sub> и ИФА<sub>IgG</sub> — 91,0 и 98,3%; специфичность — 94,3 и 100%, соответственно.

В настоящее время стандартным способом проведения серологической диагностики сифилиса является комплексное использование *разнообразных* серологических (иммунохимических) технологий, позволяющих выявить присутствие в организме обследуемых лиц специфических антител разных классов к различным антигенным детерминантам *T. pallidum*.

### 2.2.2 ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИТЕЛ К КАРДИОЛИПИНОВОМУ АНТИГЕНУ. НЕТРЕПОНЕМНЫЕ ТЕСТЫ (НТТ)

Для исследования применяется водная эмульсия кардиолипинового антигена (КлАг), приготавливаемая из смеси высокоочищенных липидов животного происхождения (кардиолипина — 0,03%, холестерина 0,98%, и лецитина — 0,27% в абсолютизированном этиловом спирте) и 30% раствора холина-хлорида.

Все современные НТТ по технике выполнения относятся к флокуляционным (осадочным) реакциям. При смешивании исследуемых образцов сыворотки/плазмы крови или ликвора с эмульсией КлдАг образуются иммунные комплексы, которые выпадают из водной фракции в виде объемного более или менее плотного осадка белого цвета. Для более яркой визуализации осадка к КлАг добавляют мелкодисперсные частицы сажи, графита или красителей.

Нетрепонемные тесты выявляют IgM и IgG, реагирующие с липидными антигенами, выделяющимися из клеточной стенки трепонем при их гибели и/или образующимися при разрушении инфицированных клеток хозяина.

В России при диагностике сифилиса наиболее часто применяют НТТ:

- реакцию микропреципитации с кардиолипидным антигеном (РМП);
- тест быстрых плазменных реагинов РПР (или RPR — Rapid plasma reagin);
- тест ВДРЛ (VDRL, Venereal Diseases Research Laboratory);
- TRUST (Toluidine red unheated serum test) или его модификации.

**Показания к применению НТТ:** для скрининга сифилиса при массовых обследованиях населения, в качестве дополнительного лабораторного теста, характеризующего активность инфекционного процесса с разрушением клеточных структур возбудителя и организма хозяина, при установлении клинического анализа при манифестных, скрытых и поздних форм сифилиса, при клинико-серологическом наблюдении больных, получивших антибактериальную терапию, для оценки эффективности проведенной терапии (в соответствии с международными стандартами после лечения больных ранними формами сифилиса титр антител в НТТ должен понизиться не менее чем в 4 раза или результат должен стать отрицательным — негативироваться).

#### **Диагностическое значение НТТ**

Ограничениями применения НТТ являются ранние стадии сифилиса (инкубация, начало первичного периода), так как реактивные антитела в крови начинают регулярно определяться только спустя 1–3 недели после появления твердого шанкра, и поздние стадии (поздний скрытый и третичный сифилис), так как лабильные преципитины первыми элиминируются из организма при длительном течении сифилитической инфекции.

К числу недостатков НТТ следует отнести также субъективный характер визуального учета, хотя в настоящее время разработаны программы для видеодигитальной регистрации изображения и оцифровкой результатов реакции, но они не нашли широкого применения в практике здравоохранения.

Антитела, определяемые в НТТ на сифилис, регистрируются также при других острых и хронических заболеваниях, которые сопровождаются гибелью клеток и разрушением тканей макроорганизма. Этим объясняют получение ложноположительных реакций в НТТ, которые встречаются при первичном скрининге населения на сифилис в 1–3% случаев, а при обследовании отдельных контингентов (беременные, люди старческого возраста) — до 30%. Реактивные антитела к кардиолипину нередко обна-

руживают в крови людей при системных поражениях паренхиматозных органов (печени, почек, легких), при инфаркте миокарда, пневмонии, сотрясении мозга, атеросклерозе, коллагенозах, онкологических заболеваниях, ряде инфекций (туберкулезе, ревматизме, сыпном тифе, малярии, лепре), некоторых патологических и физиологических состояниях (тиреотоксикозе, беременности, менструации).

Ложноположительные результаты НТТ наблюдают также после злоупотребления алкоголем, приема жирной пищи, на фоне медикаментозной терапии.

### ***РЕАКЦИЯ МИКРОПРЕЦИПИТАЦИИ С КАРДИОЛИПИНОВЫМ АНТИГЕНОМ И ПЛАЗМОЙ ИЛИ ИНАКТИВИРОВАННОЙ СЫВОРОТКОЙ КРОВИ (РМП)***

***Показания:*** серодиагностика сифилиса (определение антител к КлАг в инактивированной сыворотке/ плазме крови) и нейросифилиса (определение антител к КлАг в ликворе).

***Противопоказания:*** не установлены.

***Принцип метода.*** При добавлении в лунки иммунологического макропланшета плазмы/сыворотки крови или ликвора больных сифилисом и рабочей эмульсии КлАг и их смешивании образуются комплексы антиген-антитело, выпадающие в осадок в виде рыхлых хлопьев белого цвета, при одновременном просветлении реакционной среды.

***Подготовительный этап.*** Постановке реакции предшествует этап приготовления *ex tempore* в лаборатории рабочей эмульсии КлАг из спиртового раствора КлАг (в ампулах по 1,0 мл) и концентрированного 70% раствора холина-хлорида (в ампулах по 5,0 мл). Диагностические свойства приготовленной эмульсии испытывают с контрольными материалами, содержащими (К+) и не содержащими (К-) антитела к КлАг.

В последние годы разработана технология промышленного получения стабилизированной рабочей эмульсии КлАг, готовой к применению в течение длительного времени (по 2,0 мл, во флаконах из темного стекла).

Сыворотки крови перед исследованием прогревают 30 минут в инактиваторе при температуре +56° С.

#### ***Ход исследования в РМП***

Реакцию ставят в полистироловых прозрачных макропланшетах для иммунологических исследований (на 72 полусферические лунки) или в ячейках специальных пластиковых форм одноразового применения (на 40 лунок круглой формы с уплощенным дном).

В отдельные лунки планшетов вносят исследуемые образцы и контроли (К+ и К-), к ним добавляют рабочую суспензию КлАг в соотношении 3:1.

Реакция происходит в течение 8 минут при постоянном перемешивании реакционной среды, что обеспечивается помещением планшета на горизонтальную платформу орбитального шейкера или ротатора.

### ***Учет и интерпретация результатов исследования в РМП***

При отсутствии антител в исследуемых образцах и в контроле К- внешний вид реакционной среды не меняется: она остается опалесцирующей, окрашенной в цвет сыворотки или плазмы крови — результат **отрицательный**.

При наличии в исследуемом образце антител к кардиолипину, а также с контролем К+ в лунках при РМП происходит образование хлопьев рыхлого белого осадка при просветлении фона реакционной среды. Величина и количество образующихся частиц осадка — флоккулята (преципитата) является мерой количественной оценки содержания антител и может быть учтено в системе условных единиц — «плюсов» (от + до ++++).

При получении максимального ответа «++++» дальнейшую количественную оценку содержания антител к кардиолипину проводят путем дополнительного исследования в РМП последовательных 2-кратных разведений соответствующего образца (проводят титрование антител).

Результат исследования выдают в лечебную сеть в виде указания количества плюсов, оцененных в реакции, титра антител и заключения по исследованию — **положительный результат**.

### ***Источники ошибок при постановке РМП:***

- нарушение сроков и условий хранения плазмы/сыворотки крови, рабочей эмульсии КлАг или физиологического раствора, используемого для разведения образцов при титровании антител;
- использование для постановки реакций загрязненных иммунологических планшетов.

### ***Оценка диагностической значимости результатов РМП***

Результаты исследования в РМП свидетельствуют об активности инфекционного процесса при сифилисе. Метод обладает высокими показателями клинической чувствительности, особенно при ранних формах инфекции.

Чувствительность РМП колеблется в зависимости от стадии заболевания: при первичном сифилисе — 81%, при вторичном — 91%, при скрытых формах — 94%. По данным ГУ «ЦНИКВИ Росздрава» чувстви-

тельность РМП при диагностике сифилиса составила 95,8% [Приказ № 87 МЗ РФ]. Большинство исследователей отмечают клиническую специфичность РМП на уровне 98%.

К недостаткам РМП следует отнести возможность получения ложноположительных результатов, количество которых в зависимости от особенностей обследуемых контингентов может варьировать от 3 до 30%. Ложные положительные результаты наблюдают у лиц с острыми и хроническими инфекционными состояниями, сопровождающимися длительной и выраженной деструкцией тканей макроорганизма, при хроническом алкоголизме, онкологических заболеваниях, а также у беременных.

Ложная негативность может иметь место в случае высокого содержания антител к кардиолипину в исследуемых пробах (феномен «зоны или прозоны»). При разведении таких образцов физиологическим раствором наблюдается положительная реакция в РМП.

#### ***РЕАКЦИЯ ПЛАЗМЕННЫХ РЕАГИНОВ (РПР) (от RPR – RAPED PLASMA REAGIN)***

***Показания:*** серодиагностика сифилиса (определение антител к КлАг в инактивированной сыворотке/плазме крови) и нейросифилиса (определение антител к КлАг в ликворе).

***Противопоказания:*** не установлены.

***Принцип метода.*** При добавлении в лунки пластиковой карточки плазмы/сыворотки крови или ликвора больных сифилисом и взвеси КлАг с частицами сажи или графита и их перемешивании образуются комплексы антиген-антитело, выпадающие в осадок в виде окрашенных в черный цвет комочков при одновременном просветлении реакционной среды.

***Подготовительный этап*** отсутствует.

***Ход исследования в РПР.***

Реакцию ставят на покрытых пластиком картонных карточках одноразового использования с цветной разметкой лунок и слегка выдавленным их углублением (10–12 лунок).

В соответствии с маркировкой в лунки планшета вносят по 50 мкл исследуемых образцов и контролей (К+ и К-), к ним добавляют хорошо перемешанную суспензию КлАг в количестве 16 мкл.

Реакция происходит в течение 8 минут при постоянном перемешивании реакционной среды, что обеспечивается размещением карточек на платформе горизонтального орбитального шейкера или ротатора.

### ***Учет и интерпретация результатов исследования в РПР***

При отсутствии антител в исследуемых образцах и в контроле К-внешний вид реакционной среды не меняется: она остается окрашенной в зависимости от исходного цвета сыворотки или плазмы крови; частицы сажи или графита могут собираться в центральную часть лунки в виде нечеткого пятна — результат **отрицательный**.

При наличии в исследуемом образце антител к кардиолипину, а также с контролем К+ (содержащем эти антитела) в РПР происходит образование комочков черного осадка различной величины при общем просветлении фона реакционной среды. Величина образующихся флоккулятов пропорциональна содержанию антител к КлАг, что может быть учтено в системе условных единиц — «**плюсов**» (от + до ++++).

При получении максимального ответа «++++» дальнейшую количественную оценку содержания антител к кардиолипину проводят путем дополнительного исследования в РПР последовательных 2-кратных разведений соответствующего образца (проводят титрование антител).

Результат исследования выдают в лечебную сеть в виде записи количества плюсов, учтенных в реакции, титра антител и заключения по исследованию — **положительный результат**.

#### ***Источники ошибок при постановке РПР:***

- нарушение времени инкубации на платформе горизонтального ротатора;
- слияние капель разных образцов при неаккуратном перемещении карточки для исследования в РПР;
- подсыхание реакционной среды с образованием ложной позитивности в краевой зоне капли.

#### ***Оценка диагностической значимости результатов РПР***

Результаты исследования в РПР свидетельствуют об активности инфекционного процесса при сифилисе. Метод обладает высокими показателями клинической чувствительности, особенно при ранних формах инфекции. По данным научных публикаций клиническая чувствительность РПР в зависимости от стадии заболевания: при первичном сифилисе — 86 (77–100)%, при вторичном — 100%, при скрытых ранних — 98 (95–100)%, при скрытых поздних формах — 73%; при всех формах клиническая специфичность — на уровне 98(93–99)%.

К недостаткам РПР следует отнести возможность получения ложноположительных результатов, количество которых в зависимости от особенностей обследуемых контингентов варьирует от 3 до 30%. Ложные по-

ложительные результаты наблюдают у лиц с острыми и хроническими инфекционными состояниями, сопровождающимися деструкцией тканей макроорганизма, при хроническом алкоголизме, циррозе печени, онкологических заболеваниях, а также у беременных.

Ложная негативность может иметь место в случаях высокого содержания антител к кардиолипину в исследуемых пробах (феномен «зоны или прозоны»). При разведении таких образцов физиологическим раствором наблюдается положительная реакция в РПР.

### **ВДРЛ ИССЛЕДОВАНИЕ** (*VDRL - VENEREAL DISEASE RESEARCH LABORATORY*)

**Показания:** серодиагностика сифилиса и особенно — нейросифилиса (определение антител к кардиолипину антигену в инактивированной сыворотке/плазме крови при диагностике сифилиса и в ликворе — при диагностике нейросифилиса).

**Противопоказания:** не установлены.

**Принцип метода.** При добавлении на предметные стекла или специальные пластиковые пластины сыворотки крови или ликвора больных сифилисом и рабочей эмульсии ВДРЛ антигена и их перемешивании образуются комплексы антиген-антитело в виде очень мелких сцепленных между собою частиц овоидной формы, выявляемых с использованием светового микроскопа при увеличении в 100 раз.

**Подготовительный этап.** Постановке реакции предшествует этап приготовления *ex tempore* в лаборатории рабочей эмульсии ВДРЛ антигена из спиртового его концентрата (в ампулах по 2,0 мл). Диагностические свойства приготовленной эмульсии испытывают с контрольными материалами, содержащими (К+) и не содержащими (К-) соответствующие антигена.

#### **Ход исследования с ВДРЛ антигеном**

На предметное стекло наносят каплю инактивированной сыворотки крови и добавляют (согласно инструкции) к набору реагентов определенное количество ВДРЛ антигена, смешивают и распределяют равномерно по поверхности. В течение нескольких минут реакционную смесь перемешивают механическим путем (вручную или на механическом шуттель-аппарате), добиваясь ее распределения по всей поверхности предметного стекла.

При исследовании образцов, содержащих антитела к кардиолипину, наблюдается образование комплексов ВДРЛ антиген-антитело, которые

при микроскопии стекла при увеличении в 100 раз выглядят как склеенные между собою овоидные полупрозрачные светло-желтые частицы.

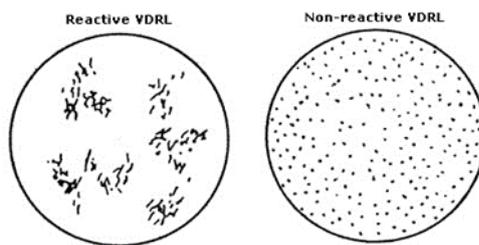


Рис. 9. Чтение результатов VDRL под микроскопом

Количественная постановка реакции с серией двукратных разведений биологического образца физиологическим раствором позволяет получить данные об истинной реактивности (определить титр антител). Титром антител в образце считается последнее разведение, в котором отмечен положительный результат. Значение титра используется для контроля эффективности проводимой специфической терапии сифилиса.

#### ***Источники ошибок при постановке VDRL***

При постановке VDRL необходимо соблюдать ряд условий, небрежное выполнение которых может приводить к возникновению ошибок:

- допускается использование только свежеприготовленного ВДРЛ антигена и свежих разведений биопроб;
- необходимо иметь в виду возможность проявления феномена «прозоны» (отрицательный результат качественного теста у некоторых больных с очень высокой концентрацией антител к кардиолипину, так как происходит образование простых иммунных комплексов 1 антиген + 1 антитело);
- учет результатов теста без использования светового микроскопа с требуемым увеличением;
- субъективный фактор при интерпретации результатов исследования.

#### ***Оценка диагностической значимости метода***

Антитела, определяемые данным методом, появляются в крови больных сифилисом через 3–5 недель после инфицирования; при вторичном сифилисе их содержание достигает максимума, затем их количество начинается постепенно снижаться, и при позднем сифилисе они могут не определяться.

ВДРЛ — достаточно чувствительный тест, что достигается как особой прописью кардиолипинового антигена, так и учетом реакции с приме-

нением техники микроскопии. Это обусловило рекомендацию применять именно этот тест при исследовании ликвора с целью определения специфического процесса в тканях центральной нервной системы — нейросифилиса и при обследовании образцов, полученных от новорожденных для диагностики врожденного сифилиса.

Во многих странах за рубежом (в особенности в США, Англии) ВДРЛ широко применяется в комплексе лабораторных исследований для скрининга на сифилис. По данным отдельных научных публикаций клиническая чувствительность ВДРЛ при первичном сифилисе составляет 78 (59–87)%, при вторичном — 100%, при скрытых ранних — 95 (88–100)%, при скрытых поздних формах — 71 (37–94)%; при всех формах клиническая специфичность — на уровне 98 (96–99)%.

ВДРЛ-тест может быть использован как критерий эффективности проведенного антибактериального лечения у больных ранними формами инфекции (по снижению титров антител более чем в 4 раза в течение 1-го года наблюдения), однако у 2–5% лиц, перенесших сифилис, особенно поздние его формы, и после успешного лечения антитела к ВДРЛ антигену могут сохраняться.

Данный тест может быть положительным при других заболеваниях, при которых возможно разрушение тканей, так как кардиолипин является фосфолипидом, присутствующим в клеточных мембранах организма человека.

### ***ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ НТТ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ РАЗВИТИЯ***

Обобщая раздел о применении НТТ при обследовании на сифилис необходимо отметить, что во всех модификациях этих реакций используется стандартизованный КЛАГ, отличающийся некоторыми особенностями его производственного приготовления. Методики исследования в НТТ отличаются между собой, они просты в исполнении, сравнительно недороги, не занимают длительного времени и, как правило, не требуют приобретения дополнительно сложного специального оборудования.

Мобильность антител к кардиолипину в крови и ликворе определяет основные показания к применению НТТ. Прежде всего, это определение активности течения сифилитической инфекции (по высоте титров антител), динамический контроль в процессе проведения антибактериальной терапии и после ее завершения (по динамике снижения титров антител по отношению к исходному уровню), а также оценка эффективности терапии

(по кратности снижения титров антител и негативации результатов в случае эффективного лечения или повышения титров — в случае нового рецидива или реинфекции). Кроме того, НТТ при недостаточном материальном обеспечении клинических лабораторий могут служить для первичного скрининга населения на сифилис, так как их использование более экономично для лаборатории.

Клиническая чувствительность и специфичность НТТ, применяемых при серологической диагностике сифилиса, варьирует (связи с особенностями в прописи приготовления КлАг и проведении лабораторного исследования).

Таблица 2 – Клиническая чувствительность нетрепонемных тестов

Тип реакции	Чувствительность при разных стадиях заболевания (в %)				Специфичность (в %)
	Первичный сифилис	Вторичный сифилис	Ранний скрытый сифилис	Поздний сифилис	
РМП	81	91	94	нет данных	98
ВДРЛ	78 (59-87)	100	95 (88-100)	71 (37-94)	98 (96-99)
РПР	86 (77-100)	100	98 (95-100)	73	98 (93-99)
TRUST	85 (77-86)	100	98 (95-100)	нет данных	99 (98-99)

### 2.2.3 СОВРЕМЕННЫЙ АЛГОРИТМ ОБСЛЕДОВАНИЯ НАСЕЛЕНИЯ ПРИ СКРИНИНГЕ И ДИАГНОСТИКЕ СИФИЛИСА

С учетом современных условий организации профилактических обследований населения и проведения при этом для ряда контингентов скрининга на сифилитическую инфекцию в Российской Федерации наиболее рациональным следует считать алгоритм обследования, начинающийся с применения одного из трепонемных тестов.

Наиболее подходящими для проведения массовых исследований являются технологии ИФА и ИХЛА, особенно при оснащении лаборатории необходимыми автоматизированными анализаторами или станциями.

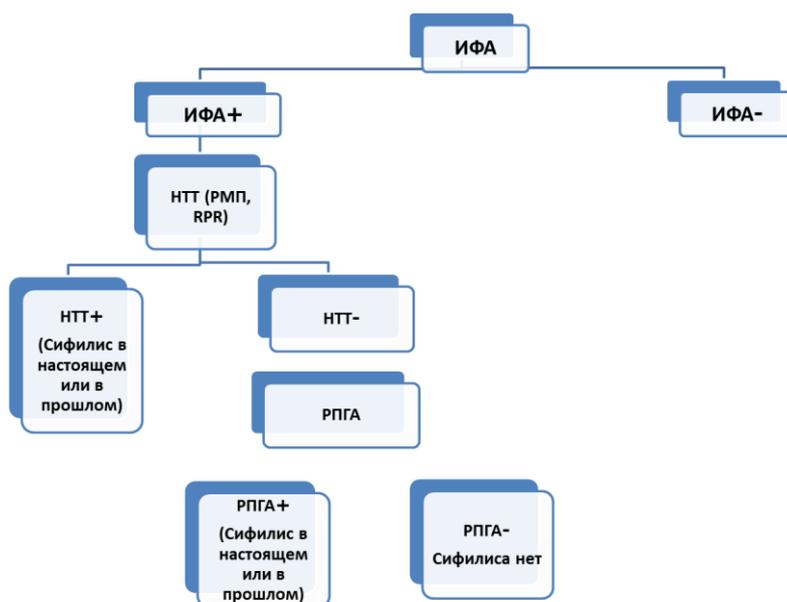


Рис. 10. Реверсионный алгоритм скрининга на сифилис

При получении отрицательных результатов в ТТ скрининг в отношении сифилиса завершается, так как у обследуемых лиц не определяется признаков инфицирования бледными трепонемами. В указанных случаях повторное исследование с использованием ТТ может быть назначено при следующем профилактическом обследовании или по эпидемиологическим показаниям при подозрении на возможность заражения сифилисом (в зависимости от клинической ситуации могут быть назначены ТТ с другой методикой выявления трепонемных антител или методы исследования более высокой аналитической чувствительностью).

При положительных результатах ТТ в скрининге предполагается возможность выявления как активного инфекционного процесса, так и ранее пролеченного сифилиса. Полученный положительный результат необходимо дополнить исследованием антител к КлАг в одном из НТТ, а также по показаниям верифицировать его с применением другого ТТ (с равной или превышающей аналитической или клинической чувствительностью). Получение положительного результата в другом ТТ подтверждает специфический характер выявленной в первичном скрининге иммунологической реактивности, а результат исследования в НТТ указывает на активность инфекционного процесса.

Комплекс лабораторных показателей представленного алгоритма обследования позволяет клиническому специалисту выявлять все возможные клинические формы сифилиса, более оперативно принимать клиниче-

ское решение при осмотре выявленных пациентов, а также по показаниям назначать повторное или дополнительное лабораторное обследование.

Однако не во всех лечебно-профилактических учреждениях здравоохранения Российской Федерации материальная обеспеченность клиничко-диагностических лабораторий позволяет реализовывать подобный подход. При недостатке финансирования может быть применен традиционный более экономичный алгоритм обследования крови, начинающийся с НТТ.

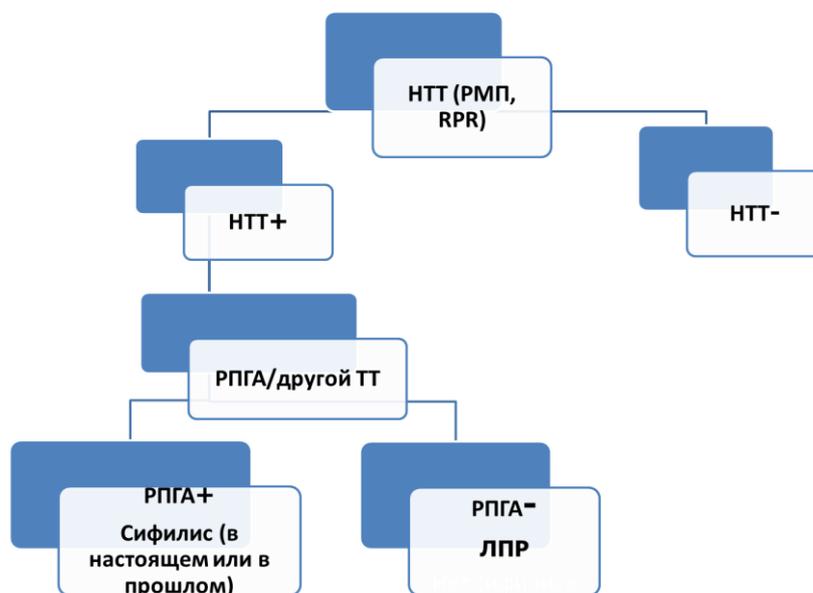


Рис. 11. Традиционный алгоритм скрининга на сифилис

В этом варианте обследования получение отрицательных результатов в НТТ позволяет завершить обследование. Однако необходимо иметь в виду, что среди неинфицированных сифилисом лиц вне поля внимания специалистов остается небольшая часть больных поздним сифилисом. При получении в рамках скрининга положительных результатов в НТТ их специфичность в отношении сифилиса верифицируют исследованием в одном из ТТ.

Результаты скрининга с использованием любого из описанных алгоритмов клиническому специалисту следует интерпретировать с учетом наблюдаемой клинической картины заболевания и анамнестических данных пациентов (в частности, сопутствующих заболеваний и патологических состояний, способных приводить к ложной позитивности ТТ и НТТ).

При практической реализации выбора ТТ или НТТ для первичного скрининга на сифилис необходимо помнить о возможности получения ложных результатов в любом современном иммунохимическом тесте (это может быть следствием некачественного лабораторного исследования,

применения диагностических наборов реагентов с низкими показателями аналитической или клинической чувствительности и специфичности, возможности ошибок на постаналитическом этапе и выдачи ошибочного результата, а также индивидуальными особенностями иммунологической реактивности обследуемых лиц). Правильному диагностическому решению поможет внимательный клинический осмотр, анализ анамнестических данных, повторное обследование и/или назначение дополнительных лабораторных исследований с отдельным определением антител разных классов (IgM и/или IgG) и разной специфичности (к разным антигенам бледной трепонемы).

При диагностике раннего сифилиса у пациентов, обратившихся за специализированной помощью к дерматовенерологу, необходимо в первую очередь оценить возможность прямого выявления возбудителя сифилиса в биоматериале из клинических проявлений. И, независимо от этого, пациентам с подозрением на ранний сифилис, а также при скрытых формах этой инфекции назначить исследование крови в комплексе иммунохимических тестов с достаточной информативностью (как правило, это одновременно не менее 2 ТТ с разным способом выявления антител и одного НТТ). Такой подход реализован для оперативного принятия диагностического решения при обследовании иностранных лиц, претендующих на получения вида на жительство и разрешения на работу в РФ (исследование крови одновременно в ИФА<sub>IgG</sub>, РПГА и РМП).

После постановки клинического диагноза, в процессе терапии и при последующем клинико-серологическом наблюдении периодически пациентам назначают лабораторное обследование для оценки динамики показателей гуморального специфического иммунитета. Этим целям соответствуют исследования содержания антител к КлАг в НТТ (1 раз в 1–3 месяца). С существенно более редкой частотой (1 раз в 6–12 мес.) назначают повторные исследования в ТТ, так как достоверное снижение продукции антитрепонемных антител наступает через многие месяцы или годы после адекватной терапии.

Контрольные исследования после лечения в НТТ выполняют в количественном варианте, снижение титров антител позволяет судить об эффективности терапии и излеченности. При длительном наблюдении наблюдается понижение уровня антител и в ТТ (титра антител в РПГА, показателя КП в ИФА, позитивности в РИФ).

Заключительное обследование пациента для принятия решения о прекращении клинико-серологического наблюдения по поводу сифилиса

проводят с использованием комплекса НТТ и ТТ (обязательно с применением тестов, использованных при постановке клинического диагноза и в процессе последующего наблюдения); решение об окончании специального клинико-серологического контроля принимается комиссией специалистов.

### **2.3. ИССЛЕДОВАНИЕ ЦЕРЕБРОСПИНАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ НЕЙРОСИФИЛИСА**

Ликвор для лабораторного исследования получают путем пункции спинномозгового канала на уровне 4–5 поясничных позвонков, данная операция выполняется врачами со специальным уровнем подготовки (неврологом или хирургом-реаниматологом). При диагностической пункции у взрослых обычно получают 5–7 мл цереброспинальной жидкости, у детей — 3–4 мл.

Для диагностики НС взятие ликвора производят в 2 пробирки (сухие, чистые, без добавок), закрывающиеся пластиковыми крышками (№ 1 — для микроскопического и биохимического исследований и № 2 — для иммунологических исследований).

#### ***Транспортировка и хранение материала***

Обе пробирки с цереброспинальной жидкостью (ЦСЖ, ликвор) сразу же после получения доставляют в соответствующие отделения лаборатории в специальном закрытом контейнере.

Обследование ликвора на цитоз и белок проводится немедленно. Исследования ЦСЖ в иммунологических реакциях может быть отсроченным при условии правильного хранения образца (в холодильнике: в замороженном виде в морозильной камере при  $t$  минус 12–18 °С — длительное хранение; в охлаждающей камере холодильника 4–8 °С — в течение 3–5 суток). Оттаивание ликвора проводят однократно при комнатной температуре. Повторное замораживание ликвора недопустимо!

#### ***Цитологическое исследование цереброспинальной жидкости***

Большое значение имеет изучение состава клеточных элементов ликвора — цитоза; подсчет лейкоцитов производят в свежей, только что полученной ЦСЖ (до оседания клеточных элементов на дно пробирки), используют световой микроскоп и камеру Фукса-Розенталя.

Количество клеток 0–5 в  $1 \text{ мм}^3$  ликвора считается нормальным, физиологическим. Определение 5–10 клеток в  $1 \text{ мм}^3$  указывает на функциональные сдвиги в реактивных элементах нервной системы, но не обяза-

тельно связанные с патологией. *Плеоцитоз* — повышенное количество клеток в ЦСЖ — свыше 10 клеток в  $1 \text{ мм}^3$  всегда свидетельствует о патологии нервной системы.

В детском возрасте показатели цитоза в  $1 \text{ мм}^3$  в норме несколько выше:

- в возрасте от 7 дней до 3 мес. — в пределах 20–25 клеток;
- от 3 месяцев до 1 года — 14–15 клеток;
- от 1 до 5 лет — 10–15 клеток;
- от 5 до 7 лет — 8–10 клеток;
- от 7 до 10 лет — 6–7 клеток;
- старше 10 лет — 4–6 клеток в  $1 \text{ мм}^3$  (как и у взрослого человека).

В нормальной ЦСЖ обнаруживаются преимущественно лимфоциты, при патологии в ней помимо лимфоцитов могут появляться и другие типы клеток (включая: плазмоциты, макрофаги, фибробласты, палочко-ядерные и редкие полиморфно-ядерные лейкоциты). Уровень плеоцитоза при разных формах НС может составлять 25–75 клеток или достигать 100–2 000 клеток в  $1 \text{ мм}^3$ . Иногда ликвор больных паренхиматозным нейросифилисом может содержать менее 10 клеток в  $1 \text{ мм}^3$  (в последней, «выгоревшей» стадии сифилитической миелопатии).

### ***Биохимическое и иммунохимическое исследование ЦСЖ***

Патология в ликворе характеризуется *повышением уровня общего белка*, что обусловлено нарушениями обменных процессов и воспалительными изменениями в ЦНС, деструкцией нервной ткани, а также вследствие нарушения циркуляции ликвора.

Нормальное содержание белка в ЦСЖ соответствует 0,16–0,33‰; отношение глобулинов к альбуминам (*белковый коэффициент*) — 1:5 (или 0,2). При патологии изменяется и содержание общего белка и соотношение его основных фракций. Показатели *нормальной цереброспинальной жидкости*:

- прозрачная, бесцветная;
- относительная плотность 1006–1008;
- рН 7,4–7,6;
- содержит не более 5–8 клеток в  $1 \text{ мм}^3$  (лимфоциты);
- содержит не более 0,33–0,46 г/л белка;
- белковый коэффициент — 1:5 (или 0,2);
- иммунологические реакции на сифилис отрицательные.

Определение цитоза и общего белка в ЦСЖ в настоящее время входит в число регламентированных методов при диагностике НС и в России, и за рубежом. Однако эти методы исследования не позволяют уточнить этиологию заболевания и доказать наличие сифилитического поражения нервной системы.

**Прямое определение возбудителя сифилиса** до настоящего времени не нашли широкого применения в диагностике НС в связи с крайне редким присутствием *T. pallidum* в ликворе. В настоящее время наиболее часто для исследования ЦСЖ применяют **иммунохимические методы исследования** — трепонемные (ИФА, РИФ<sub>Ц</sub>, РИБТ, РПГА и ЛИБ) и нетрепонемные тесты (ВДРЛ и РМП).

С учетом современных диагностических возможностей и специфики получения ликвора для исследования при диагностике НС применяют расширенный алгоритм обследования, включающий последовательное применение нескольких лабораторных методов:

ИФА / ЛИБ + ВДРЛ / РМП / РПР + РПГА / РИФ<sub>Ц</sub>.

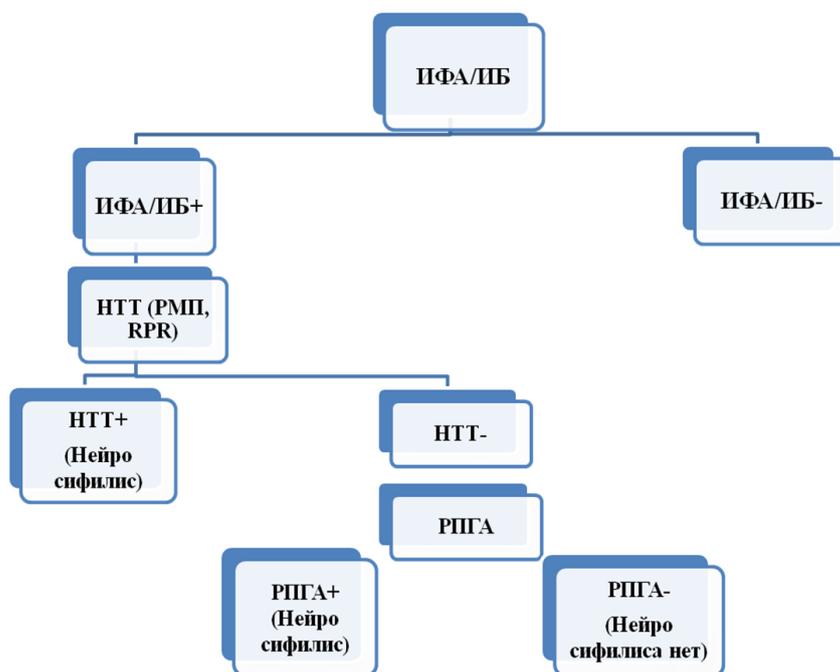


Рис. 12. Современный алгоритм диагностики нейросифилиса

Обследованию с помощью данного алгоритма подлежат лица с подозрением на наличие НС (в первую очередь больные скрытым сифилисом и лица, ранее перенесшие сифилис, при сохранении положительных НТТ в крови).

При отрицательных результатах исследований ликвора в ИФА / ЛИБ может быть сделан вывод об отсутствии НС у пациента; при положительных — исследование продолжается в ВДРЛ / РМП / РПР. Положительные результаты в ИФА / ЛИБ и ВДРЛ / РМП / РПР дают возможность установить диагноз НС. Если ВДРЛ / РМП / РПР с ликвором дают отрицательные результаты, то назначается дополнительное исследование во втором высокочувствительном ТТ — РПГА / РИФ<sub>ц</sub>: положительные результаты склоняют клиническое решение в пользу НС, отрицательные в РПГА / РИФ<sub>ц</sub> — к отсутствию у пациента НС и ложноположительном результате первого ТТ (ИФА / ЛИБ).

Высокая ответственность клинического специалиста при принятии решения о наличии НС и оценки проникновения специфических антитрепонемных иммуноглобулинов в ЦНС из сыворотки крови от синтезируемых интратекально способствовала разработке дополнительных диагностических подходов — разработке методики расчета и интерпретации сывороточно-ликворного соотношения (ИТРА-индекс):

$$\text{Индекс ИТРА} = \frac{\text{титр РПГА в ЦСЖ} / \text{общие IgG в ЦСЖ (мг/л)}}{\text{титр РПГА в сыворотке крови} / \text{общие IgG в сыворотке крови (мг/л)}}$$

Нормальные показатели индекса ИТРА составляют 0,5–2,0; результаты ИТРА-индекс свыше 2,0 указывает на НС.

### ***Критерии установления диагноза нейросифилиса***

В соответствии с Федеральными клиническими рекомендациями по ведению больных сифилисом (М., 2015 г.), диагноз НС считается **подтвержденным** при наличии у пациента серологически доказанного сифилиса (независимо от стадии) и положительном результате РМП / РПР с ЦСЖ. Диагноз НС считается **вероятным** при:

- наличию у пациента серологически доказанного сифилиса (независимо от стадии);
- наличию неврологической / психической / офтальмологической / отоларингологической симптоматики, которая не может быть объяснена иными причинами;
- отрицательном результате РМП / РПР с ликвором;
- определении в ликворе плеоцитоза (более 5 клеток в 1 мм<sup>3</sup>) и/или повышении уровня белка (более 0,5 г/л), которые не могут быть обусловлены другими заболеваниями.

Таким образом, по современным представлениям принятие клинического решения о наличии специфического поражения ЦНС у больных сифилисом — нейросифилисе — обоснуется результатами всестороннего обследования больного с участием смежных специалистов и с учетом комплекса клинических, параклинических и лабораторных методов обследования крови и ликвора.

Эффективность оказания специализированной медицинской помощи больным с НС оценивается в процессе последующего клинко-серологического наблюдения и оценки показателей исследования ликвора в динамике (плеоцитоз, протеинархия, иммунохимические тесты на сифилис).

## ГЛАВА 3. ТЕСТ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ ПО ТЕМЕ

### 3.1 ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Для каждого вопроса верными являются **один** или **несколько** ответов, выберите их:

А	В	С	Д	Е
если верно	если верно	если верно	если верно	если верно
только 1, 2, 3	только 1 и 3	только 2 и 4	только 4	все

1. Укажите возбудителя сифилиса:
  - 1) *Leptospira*
  - 2) *Treponema reuteri*
  - 3) *Borrelia burgdorferi*
  - 4) *Treponema pallidum*
2. Перечислите формы существования бледных трепонем:
  - 1) спиралевидная
  - 2) L-форма
  - 3) зерна и гранулы
  - 4) цисты
3. Укажите характерные виды активных движений возбудителей сифилиса:
  - 1) сгибательные под острым углом
  - 2) ротаторные
  - 3) поступательные
  - 4) контрактильные (волнообразное вдоль всего тела)
4. Назовите механизмы уклонения бледных трепонем от иммунной системы макроорганизма:
  - 1) наличие мукополисахаридного чехла на поверхности клетки
  - 2) разрушение собственной клеточной стенки и переход в L-форму
  - 3) переживание неблагоприятных условий в полимембранных фагосомах внутри макрофагов
  - 4) активное пожирание макрофагов

5. Какие исследования применяют для поиска и идентификации возбудителя сифилиса у обследуемых пациентов при диагностике сифилиса:
  - 1) приготовление микропрепарата крови, его окраска и микроскопия
  - 2) приготовление микропрепарата с поверхности эрозивно-язвенных сифилидов и поиск подвижного возбудителя
  - 3) приготовление микропрепарата с поверхности эрозивно-язвенных сифилидов, его окраска и микроскопия с целью выявления спиралевидной формы возбудителя
  - 4) ПЦР для определения ДНК бледной трепонемы в биоматериале, полученном с поверхности эрозивно-язвенных сифилидов
6. Какие исследования применяют для поиска и идентификации возбудителя сифилиса у обследуемых пациентов при диагностике сифилиса:
  - 1) определение ДНК бледной трепонемы в отделяемом, полученном с поверхности эрозивно-язвенных сифилидов
  - 2) исследование слюны или кала с целью выявления спиралевидной подвижной формы возбудителя
  - 3) исследование в темном поле — поиск и идентификация возбудителя по морфологическим признакам и видам движений в отделяемом с поверхности эрозивно-язвенных сифилидов
  - 4) приготовление микропрепарата капиллярной крови с целью выявления спиралевидной подвижной формы возбудителя
7. Какие технологии относят к нетрепонемным тестам (НТТ) для диагностики сифилиса:
  - 1) реакция микропреципитации (РМП)
  - 2) реакция плазменных реагинов (РПР)
  - 3) исследование с ВДРЛ антигеном
  - 4) иммунохроматографические исследования (ИХрА)
8. Какие технологии относят к трепонемоспецифическим (ТТ) для диагностики сифилиса:
  - 1) иммуноферментный анализ (ИФА)
  - 2) реакция пассивной гемагглютинации (РПГА)
  - 3) иммунохемилюминесцентный анализ (ИХЛА)
  - 4) реакция микропреципитации (РМП)

9. Какие технологии относят к трепонемоспецифическим для диагностики сифилиса (ТТ):
- 1) линейный иммуноблоттинг (ЛИБ)
  - 2) иммунохроматографический анализ (ИХрА)
  - 3) реакция непрямой иммунофлюоресценции (РИФ)
  - 4) исследование с ВДРЛ антигеном
10. В каких единицах оцениваются результаты исследований в ИФА:
- 1) в условных единицах — «плюсах»
  - 2) в величине оптической плотности (ОП)
  - 3) в процентах (%)
  - 4) в коэффициенте позитивности (КП)
11. В каких единицах учитываются результаты иммунофлюоресцентных исследований (РИФ):
- 1) в условных единицах — «плюсах»
  - 2) в процентах (%)
  - 3) в титре антител
  - 4) в коэффициенте позитивности (КП)
12. В каких единицах выдаются результаты исследований в РПГА:
- 1) в условных единицах — «плюсах»
  - 2) в процентах (%)
  - 3) в титре антител
  - 4) в коэффициенте позитивности (КП)
13. В каких единицах оцениваются результаты исследований в ЛИБ:
- 1) в условных единицах — «плюсах»
  - 2) в титре антител
  - 3) в виде обобщающего заключения врача лабораторной медицины
  - 4) в коэффициенте позитивности (КП)
14. В каких единицах оценивают результаты иммунохроматографических исследований (ИХрА):
- 1) в индексе иммунохемилюминесценции ( $I_{ИХЛ}$ )
  - 2) в единицах оптической плотности (ОП)
  - 3) в титре антител
  - 4) в условных единицах — «плюсах»

15. В каких единицах учитываются результаты иммунохемилюминесцентных исследований (ИХЛА):
- 1) в процентах (%)
  - 2) в коэффициенте позитивности (КП)
  - 3) в титре антител
  - 4) в индексе иммунохемилюминесценции ( $I_{ИХЛ}$ )
16. В каких единицах выдаются результаты исследований в РМП и РПР:
- 1) в условных единицах «плюсах»
  - 2) в коэффициенте позитивности (КП)
  - 3) в титре антител
  - 4) в процентах (%)
17. В каких единицах оценивают результаты исследований с ВДРЛ антигеном:
- 1) в процентах (%)
  - 2) в условных единицах «плюсах»
  - 3) в значениях оптической плотности (ОП)
  - 4) в титре антител
18. Показания к назначению исследований в трепонемных тестах (ТТ):
- 1) скрининг сифилиса при обследовании населения
  - 2) диагностика клинических форм сифилиса
  - 3) верификация положительных результатов в других ТТ
  - 4) оценка излеченности от сифилиса
19. Показания к назначению исследований в нетрепонемных тестах (НТТ):
- 1) скрининг сифилиса при обследовании населения
  - 2) диагностика клинических форм сифилиса
  - 3) оценка активности инфекционного процесса
  - 4) оценка излеченности от сифилиса
20. Какие тесты используют для скрининга сифилиса при обследовании населения:
- 1) иммуноферментный анализ (ИФА)
  - 2) реакция пассивной гемагглютинации (РПГА)
  - 3) иммунохемилюминесцентный анализ (ИХЛА)
  - 4) реакция микропреципитации (РМП)

21. При диагностике нейросифилиса учитывают результаты исследования ликвора по показателям:

- 1) содержание белка
- 2) содержание морфологических элементов (лимфоцитов)
- 3) подсчитывают альбуминовый или глобулиновый индексы
- 4) оценивают содержание глюкозы

22. Для диагностики нейросифилиса назначают исследования ликвора в:

- 1) иммуноферментном анализе (ИФА)
- 2) реакции пассивной гемагглютинации (РПГА)
- 3) с ВДРЛ антигеном
- 4) иммунохроматографическом анализе (ИХрА)

23. Патологические показатели исследования ликвора, указывающие на нейросифилис:

- 1) у взрослых содержание белка более 0,33–0,46 г/л белка
- 2) у взрослых содержание белка менее 0,33–0,46 г/л белка
- 3) у взрослых содержание более 5–8 клеток в  $1 \text{ мм}^3$
- 4) у взрослых содержание менее 5–8 клеток в  $1 \text{ мм}^3$

24. Укажите патологические значения Индекса ИТРА, свидетельствующие о специфическом поражении ЦНС (нейросифилисе) у больных сифилисом:

- 1) менее 0,5
- 2) в интервале 0,5–1,0
- 3) в интервале 1,0–2,0
- 2) выше 2,0

### 3.2. ЭТАЛОНЫ ОТВЕТОВ К ТЕСТОВЫМ ЗАДАНИЯМ

Номер задания	Правильный ответ	Номер задания	Правильный ответ	Номер задания	Правильный ответ
1	Д	11	В	21	А
2	Е	12	В	22	А
3	Е	13	В	23	В
4	А	14	Д	24	Д
5	С	15	Д	25	
6	В	16	В	26	
7	А	17	С	27	
8	А	18	А	28	
9	А	19	Е	29	
10	Д	20	Е	30	

## УКАЗАТЕЛЬ ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- БЛПР – биологически ложноположительные реакции на сифилис
- ВДРЛ – аббревиатура названия лаборатории, в которой был разработан этот тест (VDRL - Venereal Disease Research Laboratory)
- ИФА – иммуноферментный анализ
- ИХЛА – иммунохемилюминесцентный анализ
- ИХРА – иммунохроматографический анализ
- КлАг – кардиолипидный антиген
- КСК – клинико-серологический контроль
- ЛИБ – линейный иммунный блоттинг, иммуноблоттинг
- ЛПР – ложноположительные реакции на сифилис
- МАНК – методы амплификации нуклеиновых кислот
- НС – нейросифилис
- НТТ – нетрепонемные тесты
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- РИФ – реакция иммунофлюоресценции
- РИБТ – реакция иммобилизации бледных трепонем
- РМП – реакция микропреципитации с КлАг
- РПА – реакция пассивной гемагглютинации
- РПР – реакция плазменных реагинов, аналог RPR (raped plasma regain)
- ТТ – трепонемные, трепонемоспецифические тесты
- ФИТЦ – флюоресцеина изотиоционат (маркер антивидовых антител в РИФ)
- ЦСЖ – цереброспинальная жидкость, ликвор
- ЦНС – центральная нервная система
- IgG – иммуноглобулины класса G
- IgM – иммуноглобулины класса M
- T. pallidum* – бледная трепонема, возбудитель сифилиса
- TRUST – Tolidin Red Unheated Test — тест с толуидиновым красным и непрогретой сывороткой

## СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аковбян В.А., Прохоренкова В.И., Соколовский Е.В. Инфекции, передаваемые половым путем. М: Медиа Сфера, 2007. С. 324-337.
2. Арсеньева В.А., Амелина Е.А., Марданлы С.Г., Ротанов С.В. Технология линейного иммунного блоттинга для диагностики сифилиса // Медицинский алфавит. 2017. Т.2 (№18 Эпидемиология и гигиена). С. 34-37.
3. Бохонович Д.В., Лосева О.К., Залевская О.В. Анализ качества клинико-серологического контроля после лечения больных сифилисом // Клиническая дерматология и венерология. 2016. № 2. С. 33-38.
4. Бутов Ю.С., Потекаев Н.Н. Доля О.В. Дерматовенерология: Руководство для врачей. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2017. 640 с.
5. Дмитриев Г.А. Клинико-лабораторное и параклиническое обследование пациентов с нейросифилисом // Consilium Medicum. Дерматология. 2014. №2. С.17-21.
6. Дмитриев Г.А. Нейросифилис: проблемы и решения. М: БИНОМ, 2016. 376 с.
7. Дмитриев Г.А., Доля О.В. Диагностика сифилитической инфекции // Клиническая дерматология и венерология. 2011. № 5. С. 4-11.
8. Дмитриев Г.А., Доля О.В., Василенко Т.И. Сифилис: феномен, эволюция, новации. М.: БИНОМ, 2010. 256 с.
9. Дмитриев Г.А., Потекаев Н.Н., Негашева Е.С., Фриго Н.В. ИТРА-индекс в клинико-лабораторной диагностике нейросифилиса // Клиническая дерматология и венерология. 2017. № 6. С. 38-43.
10. Дмитриев Г.А., Фриго Н. В. Сифилис. Дифференциальный клинико-лабораторный диагноз. М.: Медкнига, 2004. 363 с.
11. Доля О.В., Маркова М.Н. О некоторых проблемах практической сифилидологии // Клиническая дерматология и венерология. 2018. Том 17, № 4. С. 120-123.
12. Иванова М.А, Лосева О.К., Малыгина Н.С., Поршина О.В., Меркулова С.А. Заболеваемость сифилисом в Российской Федерации за период с 2000 по 2008 гг.: основные тенденции //Вестник дерматологии и венерологии. 2009. №6. С. 26-30.
13. Красносельских Т.В., Соколовский Е.В. Достижения и перспективы совершенствования серологической диагностика сифилиса и оценки излеченности // Современные проблемы дерматовенерологии,

- иммунологии и врачебной косметологии. 2010. Том 4 (№ 4). С. 69-75.
14. Красносельских Т.В., Соколовский Е.В. Современные стандарты диагностики сифилиса: сравнение российских и зарубежных клинических рекомендаций (сообщение I) // Вестник дерматологии и венерологии. 2015. № 2. С. 11-22.
  15. Красносельских Т.В., Соколовский Е.В. Современные стандарты терапии сифилиса: сравнение российских и зарубежных клинических рекомендаций (сообщение II) // Вестник дерматологии и венерологии. 2015. № 2. С. 23-40.
  16. Куляш Г.Ю., Сабаев М.И., Ерко Л.В., Марданлы С.Г., Бахилина Н.В. Об эффективности и перспективе применения теста исследовательской лаборатории венерических заболеваний (VDRL) для диагностики нейросифилиса в Российской Федерации // Клиническая лабораторная диагностика. 2013. № 3. С. 30-33.
  17. Лосева О.К. Нейросифилис: клиника, диагностика, лечение и тактика ведения больных. Инструкция. Департамент здравоохранения г. Москвы. М., 2012. 12с.
  18. Марданлы С.Г., Шершнева Н.Н., Амелина, Ротанов С.В. Значение реакции иммунофлюоресценции в алгоритме современной диагностики сифилиса // Медицинский алфавит. 2018. Т.1. (№8 Эпидемиология и гигиена). С. 62-65.
  19. Марданлы С.Г., Дмитриев Г.А. Лабораторная диагностика сифилиса. Электрогорск: ЗАО «ЭКОлаб», 2011. 24 с.
  20. Марданлы С.Г., Куляш Г.Ю. Реакция пассивной гемагглютинации в серологической диагностике сифилиса. Электрогорск: ЗАО «ЭКОлаб», 2011. 40 с.
  21. Марданлы С.Г., Арсеньева В.А., Фриго Н.В., Ротанов С.В., Амелина Е.А., Захаров М.В. Применение тест-системы «Лайн-Блот сифилис» в диагностике сифилиса методом линейного иммуноблоттинга // Вестник дерматологии и венерологии. 2011. №3. С. 80-87.
  22. Марданлы С.Г., Бахилина Н.В., Ермолаева И.А., Туголуков А.Е., Сороколетов С.М., Сторовойтова Т.А., Венгеров Ю.Ю. Видеоцифровая регистрация результатов реакции микропреципитации при диагностике сифилиса // Вестник современной клинической медицины. 2013. Т.6, №5. С. 80-83.
  23. Марданлы С.Г., Туголуков А.Е., Старовойтова Т.А., Авдоница В.С., Кирдановская О.И., Венгеров Ю.Ю. Видеоцифровая система на ос-

- нове комплекса «Эксперт-Лаб» для автоматической регистрации результатов иммунного блоттинга при диагностике сифилиса // Вестник современной клинической медицины. 2013. Т. 6, №4. С. 62-67.
24. Марданлы С.Г., Арсеньева В.А. Новая тест-система «Лайн-Блот Сифилис-IgM» для определения IgM-антител к *Treponema pallidum* методом линейного иммуноблоттинга // Вестник службы крови. 2014. №1. С. 44-47.
  25. Ротанов С.В., Марданлы С.Г., Амелина Е.А., Бахилина Н.В., Ермолаева И.А. Модификация выпуска кардиолипинового антигена для диагностики сифилиса // Медицинский алфавит. 2016. Т.1, №19. С. 46-47.
  26. Марданлы С.Г. К вопросу о стандартизации условий производства компонентов и постановки реакции иммунофлюоресценции на примере лабораторной диагностики сифилиса // Клиническая лабораторная диагностика. 2019. №7. С. 409-412.
  27. Негашева Е.С., Ротанов С.В. Клинико-серологическое наблюдение пациентов, получивших лечение по поводу ранних форм сифилиса // Клиническая дерматология и венерология. 2015. №4. С. 42-49.
  28. Потекаев Н.Н. и соавт. Использование многомерного дискриминантного анализа в диагностике нейросифилиса // Клиническая дерматология и венерология. 2019. Том 18 (№1). С. 18-26.
  29. Потекаев Н.Н., Фриго Н.В. Алмазова А.А., Лебедева Г.А. Эпидемиология сифилиса в современных условиях // Клиническая дерматология и венерология. 2015. Том 14 (№ 1). С. 22-34.
  30. Потекаев Н.Н., Фриго Н.В., Ротанов С.В. Диагностика сифилиса: от Вассермана до наших дней. Транзит-ИКС, 2018. 256 с.
  31. Приказ МЗ РФ от 26 марта 2001 г. № 87 «О совершенствовании серологической диагностики сифилиса».
  32. Ресурсы и деятельность медицинских организаций дерматовенерологического профиля. Заболеваемость инфекциями, передаваемыми половым путем, заразными кожными болезнями и заболеваниями кожи за 2017–2018 годы (статистические материалы). М., 2019. 208 с.
  33. Ротанов С.В., Чупров-Неточин Р.Н., Эрматова Ф.А. Методы выявления антител класса М к антигенам *T. pallidum* для ранней диагностики сифилиса // Вестник дерматологии и венерологии. 2013. № 1. С. 14-20.

34. Ротанов С.В., Эрматова Ф.А. Применение IgM-методик при диагностике сифилиса // Вестник дерматологии и венерологии. 2015. №4. С. 83-89.
35. Статистические материалы. Ресурсы и деятельность медицинских организаций дерматовенерологического профиля. Заболеваемость инфекциями, передаваемыми половым путем, заразными кожными болезнями и заболеваниями кожи, 2014–2015.
36. Федеральные клинические рекомендации по ведению больных сифилисом. М., 2015. 44 с.
37. Фриго Н.В. Современные аспекты дифференциальной диагностики истинной и ложной серопозитивности серологических тестов на сифилис // Вестник дерматологии и венерологии. 2004. №2. С. 51-54.
38. Фриго Н.В., Ротанов С.В., Манукьян Т.Е., Катунин Л.Г., Суворова А.А., Волков И.А., Китаева Н.В. Лабораторная диагностика сифилиса: вчера, сегодня, завтра // Вестник дерматологии и венерологии. 2012. №4. С. 16-23.
39. Фриго Н.В., Манукьян Т.Е., Ротанов С.В., Катунин Л.Г. Диагностика ранних форм сифилиса методом иммунохемилюминесценции // Вестник дерматологии и венерологии. 2013. №6. С. 66-72.
40. Ahn SS, Jung SM, Yoo J, Lee SW, Song JJ, Park YB. Clinical characteristics of patients with systemic lupus erythematosus showing a false-positive result of syphilis screening. // Rheumatol Int – 2019. - Vol. 39 (N 11). - P. 1859-1866.
41. Ballard R, Ison C, Lewis D, Ndowa F, Peeling R, eds. Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus. // World Health Organization (WHO), Geneva, Switzerland. – 2013. - P. 107–129.
42. Buffet M, Grange PA, Gerhardt P et al. Diagnosing *Treponema pallidum* in secondary syphilis by PCR and immunohistochemistry. // J Invest Dermatol – 2007. Vol. 127 (N 10). - P. 2345–2350.
43. Carlson JA, Dabiri G, Cribier B, Sell S. The immunopathobiology of syphilis: the manifestations and course of syphilis are determined by the level of delayed-type hypersensitivity. // Am J Dermatopath – 2011. – Vol. 33 (N 5). - P. 433-60.
44. Centers for Disease Control and Prevention. Syphilis (*Treponema pallidum*) 2018 Case Definition - 2018. – URL: <https://wwwn.cdc.gov/nndss/conditions/syphilis/case-definition/2018/>.

45. Egglestone SI., Turner AJ. Serological diagnosis of syphilis. PHLIS Syphilis Serology Working Group. // *Commun Dis Public Health* – 2000. - Vol. 3 (N 3). - P. 158–162.
46. Forrestel AK, Kovarik CL, Katz KA. Sexually Acquired Syphilis. Part 2: Laboratory diagnosis, management, and prevention. // *J Am Acad Dermatol* – 2019. - pii: S0190-9622(19)30598-5. doi: 10.1016/j.jaad.2019.02.074.]
47. Gayet-Ageron A, Ninet B, Toutous-Trellu L et al. Assessment of a real time PCR to diagnose syphilis from diverse biological samples. // *Sex Transm Infect* – 2009. – Vol. 85 (N 4). - P. 264–269.
48. Gayet-Ageron A., Lautenschlager S., Ninet B., Perneger TV., Combescure C. Sensitivity, specificity and likelihood ratios of PCR in the diagnosis of syphilis: a systematic review and meta-analysis. // *Sex Transm Infect* – 2013. – Vol. 89 (N 3). - P. 251-256.
49. Hook EW 3rd. Syphilis. // *Lancet* – 2017. - Vol. 389 (N 10078). - P. 1550-1557.
50. Janier M., Hegyi V., Dupin N. et al. European guideline on the management of syphilis, 2014. // *J Eur Acad Dermatol Venereol* – 2014. – Vol. 28 (N 12). – P. 1581-1593.
51. Liu H., Rodes B., Chen CY., Steiner B. New tests for syphilis: rational design of PCR method for detection of *Treponema pallidum* in clinical specimens using unique regions of the DNA polymerase I gene // *J Clin Microbiol* – 2001. – Vol. 39, N 5. P. 1941–1946.
52. Nah EH, Cho S, Kim S, Cho HI, Chai JY. Comparison of Traditional and Reverse Syphilis Screening Algorithms in Medical Health Check-ups. // *Ann Lab Med* – 2017. - Vol. 37 (N 6). - P. 511-515.
53. Peng J, Lu Y, Yu H, Wu S, Li T, Li H, Deng L, Sun Z. Analysis of 2 Reverse Syphilis Testing Algorithms in Diagnosis of Syphilis: A Large-Cohort Prospective Study. // *Clin Infect Dis* – 2018 Vol. 67 (N 6). - P. 947-953.
54. Rawstron SA., Mehta S., Bromberg K. Evaluation of a *Treponema pallidum*-specific IgM enzyme immunoassay and *Treponema pallidum* western blot antibody detection in the diagnosis of maternal and congenital syphilis. // *Sex Transm Dis* - 2004. - Vol. 31 (N 3). - P. 123–126.
55. Zhuang YH., Tian Y., Chen Y., Tang J., Wang JQ., Li P., Li Q., Jiang YQ. Evaluation of the Determine Syphilis TP assay for the detection of antibodies against *Treponema pallidum* for the serodiagnosis of syphilis. // *Eur. J. Clin. Microbiol Infect Dis* - 2012. – Vol. 31, N 6. P. 929–935.

*Учебное издание*

**Николай Николаевич Потекаев  
Сергей Владимирович Ротанов  
Наталья Владиславовна Фриго  
Георгий Александрович Дмитриев  
Ольга Валентиновна Доля  
Наталья Владимировна Китаева  
Лариса Сергеевна Круглова  
Сейфаддин Гашимович Марданлы**

**ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ  
СИФИЛИСА**

Пособие для врачей