

Значение реакции иммунофлюоресценции в алгоритме современной диагностики сифилиса

С. Г. Марданлы, д.м.н., акад. АМН, проф. кафедры фармакологии и фармацевтических дисциплин¹, президент и директор по науке², заслуженный работник здравоохранения РФ

Н. Н. Шершнева, нач. НПО ТОРЧ, РИФ²

Е. А. Амелина, рук. отдела научно-технических разработок²

С. В. Ротанов, д.м.н., доцент, в.н.с.³, зав. клинико-диагностической лабораторией⁴

¹ГОУ ВО МО «Государственный гуманитарно-технологический университет» Минобробразования Московской области, г. Орехово-Зуево, Московская область

²ЗАО «ЭКОлаб», г. Электрогорск, Московская область

³ГБУЗ «Московский научно-практический центр дерматовенерологии и косметологии» Департамента здравоохранения г. Москвы

⁴ГБУЗ МО «Люберецкий кожно-венерологический диспансер», г. Дзержинский, Московская область

Value of immunofluorescence reaction in algorithm of modern diagnosis of syphilis

S. G. Mardanly, N. N. Shershneva, E. A. Amelina, S. V. Rotanov

State University of Humanities and Technology, Orekhovo-Zuevo, Moscow Region; ECOlab Co., Elektrogorsk, Moscow Region; Moscow Scientific and Practical Centre for Dermatovenereology and Cosmetology, Moscow; Lubertskiy Dermatovenereologic Dispensary, Dzerzhinsky, Moscow Region; Russia

Резюме

Целью работы явилось изучение показателей диагностической эффективности применения реакции непрямой иммунофлюоресценции (РИФ) для выявления трепонемоспецифических иммуноглобулинов классов G и M (IgG и IgM) у больных сифилисом. Среди инфекций, передаваемых половым путем (ИППП), сифилис характеризуется наиболее тяжелыми клиническими проявлениями с поражением практически всех систем органов человека, что существенно снижает качество жизни больного и нередко представляет опасность для его жизни. Реакция иммунофлюоресценции в настоящее время является одним из наиболее чувствительных и востребованных исследований для диагностики сифилиса. РИФ высокочувствительна на всех стадиях активно развивающейся инфекции, начиная с периода инкубации (варианты РИФ-IgM) и заканчивая поздним сифилисом. Исследование в РИФ с наборами «Антипаллидум-Флюороген-IgM/IgG» могут применяться в качестве подтверждающих тестов при скрытом сифилисе, в качестве экспертного метода.

Ключевые слова: **трепонема, иммунофлюоресценция, иммуноферментный анализ, ИППП.**

Summary

The aim of the work was to study the indices of the diagnostic effectiveness of the indirect immunofluorescence (RIF) reaction for the detection of treponemospesific immunoglobulins of class G and M (IgG and IgM) in syphilis patients. Among sexually transmitted infections (STIs), syphilis is characterized by the most severe clinical manifestations with the defeat of almost all systems of human organs, which significantly reduces the quality of life of the patient and often pose a danger to his life. The immunofluorescence reaction is currently one of the most sensitive and demanded studies for diagnosing syphilis. The RIF is highly sensitive at all stages of an actively developing infection, beginning with the incubation period (RIF-IgM variants) and ending with late syphilis. The study in the RIF with the 'Antipallidum-Fluorogen-IgM/IgG' kits can be used as confirmatory tests for latent syphilis, as an expert method.

Key words: **treponema, immunofluorescence, enzyme immunoassay, STI.**

Среди инфекций, передаваемых половым путем (ИППП), сифилис характеризуется наиболее тяжелыми клиническими проявлениями с поражением практически всех систем органов человека, что существенно снижает качество жизни больного и нередко представляет опасность для его жизни.

В конце XX века эта инфекция по ряду объективных причин получила широкое эпидемическое распространение среди населения Российской Федерации, последствия этой эпидемии проявляются до настоящего времени [1–3]. По данным официальной статистической отчетности, заболеваемость сифилисом в России в 2013–2015 годах значительно снизилась и характеризовалась следующими количественными показателями на 100 тысяч человек: 2013 год — 28,9 новых случаев, 2014-й — 25,0 и 2015-й — 23,5,

что, однако, в 3–6 раз превышало соответствующие уровни в развитых странах Европейского региона [3]. Одновременно наблюдалось существенное изменение удельного веса различных клинических форм сифилиса в структуре общей заболеваемости: на фоне снижения частоты выявления ранних форм с клиническими проявлениями был отмечен устойчивый рост регистрации поздних форм этой инфекции (в 2013 году — 3,3; в 2014-м — 3,7; в 2015-м — 3,9; в 2016-м — 4,3 на 100 тысяч человек), в том числе висцерального сифилиса и нейросифилиса. Наблюдаемые закономерности указывают на существующие недостатки в системе своевременного скрининга этой инфекции среди населения и проблемы с оказанием больным сифилисом адекватной специализированной медицинской помощи, направленной

на своевременную и правильную клиническую диагностику, предупреждение развития поздних форм заболевания или перехода инфекционного процесса в скрытое состояние. Нередко встречаются случаи со стертой клинической картиной заболевания и увеличивается доля бессимптомных форм сифилиса. В связи с этим возрастают роль и значение лабораторных методов обследования, используемых при диагностике сифилиса.

Прямое обнаружение возбудителя заболевания *T. pallidum* применяется в основном при появлении эрозивных и язвенных элементов сыпи на коже и видимых слизистых оболочках пациента, так как в них содержится большое количество возбудителя заболевания. Однако во всех случаях приоритетную роль в настоящее время играют иммунохимические

исследования с определением специфических антител к антигенам бледной трепонемы: при обследовании населения с целью скрининга сифилиса, установлении клинического диагноза и клинико-серологическом контроле эффективности антибактериальной терапии [4–8]. Наиболее распространены иммунохимическими методами при обследовании на сифилис являются: иммуноферментный анализ (ИФА), реакция пассивной гемагглютинации (РПГА) и линейный иммунный блоттинг (ЛИБ); это обусловлено уровнем оснащённости клинических лабораторий медицинских учреждений необходимым измерительным и исследовательским оборудованием, достигнутым при проведении мероприятий в рамках федеральных целевых программ «Профилактика и борьба с социально значимыми инфекциями» (2002–2013 годы) и программы «Здоровье», что было впоследствии закреплено в стандарте оснащения иммунохимических лабораторий дерматовенерологических учреждений в РФ [9]. За последние годы снизилась частота применения при обследовании на сифилис реакции иммунофлюоресценции (РИФ) и реакции иммобилизации бледных трепонем (РИБТ); это обусловлено организационными трудностями и увеличившимися материальными затратами на содержания вивариев при клинических диагностических лабораториях медицинских организаций [10–11].

Необходимо отметить, что до настоящего времени РИФ оценивается как один из самых ранних методов лабораторной диагностики сифилиса, так как позволяет выявлять специфические антитела к бледной трепонеме в крови больного уже через 2–3 недели после инфицирования, то есть в начальный период развития первичного специфического воспаления в месте инокуляции патогенна в макроорганизм (до появления твердого шанкра). Научные основы современного алгоритма применения лабораторных методов обследования для диагностики сифилиса были разработаны с учетом динамики образования специфических антител разных классов при различных стадиях развития сифилитической инфекции [8, 12]. Реакция иммунофлюоресценции в модификации РИФ_{-abc} как самостоятельное исследование или

в сочетании с вариантом РИФ₋₂₀₀ до сих пор является одним из самых чувствительных методов серодиагностики сифилиса и не утратила своего значения («золотой стандарт») [13, 14].

Возрождение интереса и возможности применения РИФ в дерматовенерологических учреждениях было обеспечено отечественными исследователями, разработавшими технологии получения стабильного высушенного иммуносorbента на предметных стеклах и эффективные диагностические наборы реагентов для РИФ [15], а также проводившими их клиническое изучение [16].

Целью представленной работы явилось изучение показателей диагностической эффективности применения реакции непрямой иммунофлюоресценции (РИФ) для выявления трепонемоспецифических иммуноглобулинов классов G и M (IgG и IgM) у больных сифилисом в сопоставлении с двумя другими регламентированными методами исследований на сифилис: ИФА (ИФА_{-IgG} и ИФА_{-IgM}) и РПГА.

Материалы и методы

При планировании работы по сопоставлению характеристик клинической эффективности разных лабораторных методов исследования были использованы диагностические наборы реагентов одного производителя (ЗАО «ЭКОлаб», г. Электрогорск Московской области). Такой подход позволял сравнить между собой именно методы лабораторных исследований и минимизировать влияние на результаты исследований особенностей нативных и рекомбинантных антигенов возбудителя сифилиса (TrpN 15, TrpN 17, TmpA и TrpN 47) в разных комбинациях их сочетанного использования в структуре иммуносorbентов различного производства. Исследования были проведены с наборами «Антипаллидум-Флюороген-IgM/IgG» (РУ № РЗН 2013/247 от 28.02.2013), «ИФА-антипаллидум-IgM» (№ ФСР 2010/06926 от 01.10.2010), «ИФА-антипаллидум-IgG» (№ ФСР 2008/03526 от 29.10.2008) и «Сифилис РПГА-тест» (№ ФСР 2010/08228 от 07.07.2010).

Клиническим материалом исследования служили 353 образца сыворотки крови, предоставленные от пациентов, наблюдавшихся

в кожно-венерологических диспансерах в г. Орехово-Зуево и г. Люберцы. Основную группу составили 253 сыворотки крови, полученные от больных сифилисом на разных стадиях заболевания: первичный — 23, вторичный свежий — 29, вторичный рецидивный — 38, скрытый ранний — 30, скрытый неуточненный — 20 и скрытый поздний сифилис — 26 образцов, а также от 87 пациентов, состоявших на клинико-серологическом контроле после завершения антибактериального лечения по поводу сифилиса. Группа контроля (n = 100) была сформирована из образцов крови, полученных от 50 больных дерматозами и 50 здоровых лиц, проходивших медицинское обследование



Рисунок 1. Комплекция набора реагентов для РИФ «Антипаллидум-Флюороген-IgM/IgG» (РЗН 2013/247 от 28.02.2013).

доказание (не имевших сифилис в анамнезе и с отрицательными результатами нетрепонемных и трепонемных тестов).

Набор реагентов «Антипаллидум-Флюороген IgM/IgG» включает все необходимые компоненты для проведения исследования, кроме исследовательского оборудования (люминесцентного микроскопа) (рис. 1): антиген *Treponema pallidum* на стекле предметном — инактивированные патогенные бледные трепонемы, штамм *Nichols*, полученные из 5–7-дневного специфического орхита, развивающегося в результате экспериментального заражения в яичках лабораторных кроликов. Антиген нанесен в лунки на предметном стекле, высушен и фиксирован ацетоном. Предметное стекло покрыто краской со свободными участками округлой формы — лунками для



Рисунок 2. Предметное стекло с лунками для исследования в РИФ.

нанесения антигена и проведения в них лабораторного исследования, каждая лунка пронумерована, на стекле выделено маркировочное поле для нанесения меток в соответствии с протоколом исследования (рис. 2).

В комплекте представлены 10 предметных стекол, герметично упакованных в металлизированные цефленовые пакетики с силикагелем, что позволяет проводить до 100 исследований, включая необходимые лабораторные контроли:

РФ-сорбент (реагент содержится только в комплектах для определения трепонемоспецифических IgM) — козы антигена к IgG человека (позволяют на подготовительном этапе удалить из исследуемого образца иммуноглобулины класса G и проводить определение специфических антител класса M;

- ФИТЦ-конъюгат-IgG (или IgM) — антивидовые козы антигена к иммуноглобулинам человека (анти-IgM или анти-IgG), меченые флюоресцеин-5-изотиоцианатом (ФИТЦ);
- контрольные сыворотки, содержащие (в высоком и более низком титре) и не содержащие антигена к *Treponema pallidum* (K+, K+_{слаб} и K-), инактивированные;
- ультрасорбент — лиофилизированный солевой экстракт из культуральных бледных трепонем (штаммы V, VII, VIII, IX и Рейтера), дезинтегрированных ультразвуком, и разводящий буферный раствор (РБР) для его восстановления в жидком виде;
- концентрат отмывающего раствора (ОР)к для промывания предметных стекол между этапами лабораторного исследования;
- монтирующую жидкость для микроскопического исследования.

Исследование основано на *принципе непрямого метода*: антиген (АГ), фиксированный на предметном стекле, обрабатывается исследуемой сывороткой крови (цереброспинальной жидкостью), потенциально содержащей антитела к возбудителю заболевания (АТ). Инкубация осуществляется в течение 30 минут в условиях влажной камеры при температуре +37 °С. Не вступившие в реакцию белки исследуемого образца удаляются из лунок при

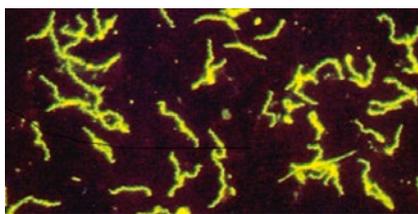


Рисунок 3. Положительный результат исследования в РИФ с определением антител к *T. pallidum* и интенсивностью свечения на 3+ и 4+.

последующем промывании предметного стекла. Образующийся комплекс АГ-АТ взаимодействует с конъюгатом (иммунной антивидовой сывороткой к Ig человека, меченой флюорохромом). После промывания готовят препарат и микроскопируют его с использованием люминесцентного микроскопа.

Оценку результатов исследования в РИФ проводят по интенсивности свечения антигена (рис. 3), выражаемой в условных единицах — «плюсах»: 4+ (блестящее зелено-желтое свечение), 3+ (яркое свечение) и 2+ (слабое свечение) — положительные результаты, свидетельствующие об определении в исследуемом образце специфических антител; 1+ (тени бледных трепонем или уровень фона) и отсутствие свечения — отрицательные результаты, свидетельствующие об определении антитела в образце не определены.

С целью повышения специфичности результата исследования в РИФ разработаны модификации этой методики: из исследуемого образца сыворотки крови неспецифические антитела к групповым антигенам непатогенных трепонем-комменсалов удаляют с помощью предварительной абсорбции с разрушенными ультразвуком культуральными трепонемами (модификация РИФ_{абс}), или влияние неспецифических антител уменьшают путем разведения исследуемого нативного образца в 200 раз (модификация РИФ₂₀₀). Применение РИФ_{абс} актуально для ранней серодиагностики сифилиса, так как результаты исследования больных становятся положительными уже на третьей неделе после заражения, что совпадает по времени с появлением первых клинических признаков инфекции на коже и видимых слизистых оболочках.

Цереброспинальную жидкость (ликвор) при диагностике специфического поражения сифилисом центральной нервной системы (нейросифилис) исследуют в РИФ только в нативном

цельном виде (методика РИФ_ц) ввиду низкого содержания белка и специфических антител в исследуемом образце.

В последнее время актуальны лабораторные методы диагностики сифилиса, позволяющие выявлять специфические антитела класса M, так как они являются наиболее ранними маркерами инфицирования по отношению к соответствующим антителам класса G. Помимо этого, определение специфических IgM имеет важное значение в диагностике врожденного сифилиса, так как известно, что крупные молекулы IgM через плаценту не проходят. Они активно вырабатываются организмом ребенка при сифилисе, и их обнаружение у ребенка является свидетельством его инфицирования.

Результаты исследования и обсуждение

Исследование 253 образцов сыворотки крови опытной группы

В ИФА_{-IgG} с кровью 166 больных сифилисом, полученной до начала и в процессе лечения, положительные результаты были получены в 165 случаях (99,4%) и отрицательный результат — в одном случае (0,6%) (у этого пациента диагноз первичного сифилиса был установлен на основании обнаружения ДНК *T. pallidum* в отделяемом твердого шанкра). При анализе результатов исследования в ИФА_{-IgG} всех 253 образцов опытной группы положительные результаты составили 252 случая (99,6%) и отрицательный результат в одном случае (0,4%).

В ИФА_{-IgM} положительные результаты исследования выявлены в основном с образцами сыворотки крови, полученными от больных до начала терапии и в период лечения: 22 — при первичном, 67 — при вторичном, 20 — при скрытом раннем, 10 — при скрытом неуточненном и 2 — при скрытом позднем сифилисе; кроме этого, у 12 пациентов, наблюдавшихся после окончания антибактериальной терапии; всего в 133 (52,6%) случаях. Отрицательные результаты в ИФА_{-IgM} с сыворотками основной группы получены в 120 (47,4%) случаях.

Определение антител к возбудителю сифилиса в опытной группе с применением РПГА показало 251 (99,2%) положительный и 2 (0,8%) отрицательных результата.

Показатели диагностической эффективности методов лабораторного иммунохимического исследования при сифилисе

| Показатель | Величина показателя для соответствующего метода, % | | | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|---------|------|---------|---------|
| | ИФА-IgG | ИФА-IgM | РПГА | РИФ-IgG | РИФ-IgM |
| Клиническая чувствительность у больных сифилисом до начала и в процессе терапии | 99,4 | 72,9 | 99,2 | 99,4 | 74,1 |
| Клиническая чувствительность у больных и лиц, состоящих под наблюдением после окончания терапии | 99,6 | 52,6 | 99,2 | 99,6 | 53,7 |
| Клиническая специфичность | 100 | 99,0 | 100 | 100 | 100 |

Исследование в РИФ_{(абс/200)-IgG} выявило циркуляцию антитрепонемных антител в крови в 252 случаях и не выявило в крови у одного больного первичным сифилисом (у которого были отрицательными результаты исследования в ИФА_{-IgG}).

В РИФ_{(абс/200)-IgM} положительные результаты исследования также получены с образцами, взятыми до начала и в период лечения: 22 — при первичном, 67 — при вторичном, 22 — при скрытом раннем, 11 — при скрытом неуточненном и 1 — при скрытом позднем сифилисе; кроме этого, у 13 пациентов, наблюдавшихся после окончания антибактериальной терапии; всего в 136 (53,7%) случаях, что весьма объяснимо, так как с развитием инфекционного процесса продукция антител класса М понижается и замещается на синтез иммуноглобулинов класса. Отрицательные результаты в ИФА_{-IgM} с сыворотками основной группы получены в 117 (46,3%) случаях.

Исследование 100 образцов сыворотки крови группы контроля

В ИФА_{-IgG} отрицательные результаты были получены в 100 (100%) случаях, в ИФА_{-IgM} получен один положительный результат исследования с оптической плотностью в «серой зоне» и 99 (99%) отрицательных результатов.

В РПГА с образцами сыворотки крови лиц без установленного диагноза «сифилис» показано 100 (100%) отрицательных результатов.

Исследование сывороток крови контрольной группы в РИФ_{(абс/200)-IgG} и РИФ_{(абс/200)-IgM} показало по 100 (по 100%) отрицательных результатов исследования.

Таким образом, рассчитанные показатели диагностической эффективности методов лабораторного иммунохимического исследования при сифилисе представлены в табл.

Заключение

Реакция иммунофлюоресценции в настоящее время является одним из наиболее чувствительных и востребованных исследований для диагностики сифилиса. РИФ высокочувствительна на всех стадиях активно развивающейся инфекции, начиная с периода инкубации (варианты

РИФ_{-IgM}) и заканчивая поздним сифилисом. Специалисты практического здравоохранения назначают исследование одновременно в модификациях РИФ_{-абс} и РИФ₋₂₀₀, что повышает надежность полученного результата; при обследовании цереброспинальной жидкости применяется модификация РИФ_{-цп}.

Исследование в РИФ с наборами «Антипаллидум-Флюороген-IgM/IgG» могут применяться в качестве подтверждающих тестов при скрытом сифилисе, в качестве экспертного метода при установлении ретроспективного диагноза и дифференциации сифилиса и ложноположительных результатов в других иммунохимических трепонемных исследованиях. Показатели диагностической эффективности РИФ, ИФА и РПГА превышают 99%, колебания величины этих показателей, приводимые в научных публикациях, зависят от обследованных контингент, а не от особенностей проведения методики исследования или интерпретации результата.

Список литературы

- Кубанова А. А., Кубанов А. А., Мелехина Л. Е. Заболеваемость сифилисом в Российской Федерации за период 2006–2016 гг. // Вестник дерматологии и венерологии 2017; 5: 16–25. [http://www.vestnikdv.ru/jour/article/view/338/337].
- Потекаев Н. Н., Пташинский Р. И., Фриго Н. В., Лебедева Г. А., Негашева Е. С. Эпидемиологическая ситуация по заболеваемости сифилисом в г. Москве // Всероссийский междисциплинарный медицинский журнал Terra Medica 2015; 1–2 (79–80): 25–29.
- Потекаев Н. Н., Фриго Н. В., Ротанов С. В. Диагностика сифилиса: от Вассермана до наших дней. // Владимир: Изд. «Транзит-ИКС», 2018. — 256 с.
- Приказ Минздрава России № 87 от 26.03.2001 г. «О совершенствовании серологической диагностики сифилиса»: Приложение 1. Методические рекомендации «Постановка отборочных и диагностических тестов на сифилис».
- Федеральные клинические рекомендации по ведению больных сифилисом // М.: РОДКВ, 2015. — 44 с. [http://www.cnikvi.ru/docs/clinic_recs/infektsii-peredavaemye-polovym-putem/].

- Сифилис (клиника, диагностика, лечение, профилактика): Методические рекомендации Департамента здравоохранения г. Москвы № 34 / Дмитриев Г. А., Лосева О. К., Доля О. В. // Москва, 2013. — 25 с. [https://yadi.sk/d/29PCy_LGhrcNK].
- Приказ Минздрава Московской области № 1443 от 21.11.2013 «Об использовании иммуноферментного анализа с определением суммарных антител к бледной трепонеме при проведении профилактических обследований на сифилис».
- A manual of tests for syphilis. / Larsen S. A., Pope V., Johnson R. E., Kennedy E. J. Jr. [Editors] // Washington: Am. Public Health Ass., 1998. — 361 p.
- Приказ Минздрава России № 924н от 15.11.2012 г. «Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи по профилю «дерматовенерология» (Приложение № 17. «Стандарт оснащения клинико-диагностической лаборатории кожно-венерологического диспансера: п. 4. Стандарт оснащения иммунохимического (серологического) подразделения»).
- Кубанова А. А., Фриго Н. В., Ротанов С. В., Соломка В. С., Плахова К. И., Рахматулина М. Р., Манукьян Т. Е. Современные направления и перспективы развития лабораторной диагностики инфекций, передаваемых половым путем. // Вестник дерматологии и венерологии 2011, 5: 54–63.
- Фриго Н. В., Лесная И. Н., Кубанов А. А., Ротанов С. В., Знаменская Л. Ф., Соломка В. С. Основные направления развития диагностических технологий в дерматовенерологии. // Вестник дерматологии и венерологии 2010; 5: 35–44.
- Овчинников Н. М., Беднова В. Н., Делекторский В. В. Лабораторная диагностика заболеваний, передающихся половым путем // М.: Медицина, 1987. — 302 с.
- Дмитриев Г. А. Состояние лабораторной диагностики сифилиса. // Consilium medicum 2004; 6 (3) [http://www.consilium-medicum.com/media/consilium/04_03/211.shtm].
- Лосева О. К., Ловенецкий А. Н. Эпидемиология, клиника, диагностика и лечение сифилиса. Руководство для врачей. // В кн.: Опыт организации борьбы с сифилисом в субъект Российской Федерации. — Екатеринбург: Чаронд, 2002: 159–248.
- Мардавы С. Г., Дмитриев Г. А. Лабораторная диагностика сифилиса: Информационно-методическое пособие. // Электротгорск: ЗАО «ЭКОЛаб», 2011. — 24 с.
- Ротанов С. В., Чупров-Нетохин Р. Н., Эрматова Эрматова Ф. А. Методы выявления антител класса М к антигену T. pallidum для ранней диагностики сифилиса. // Вестник дерматологии и венерологии. 2013; 1: 14–20.