

РУКОВОДСТВО ПО ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ СИФИЛИСА В СТРАНАХ ВОСТОЧНОЙ ЕВРОПЫ

ЕВГЕНИЙ СОКОЛОВСКИЙ¹, НАТАЛИЯ ФРИГО², СЕРГЕЙ РОТАНОВ², АЛЕВТИНА САВИЧЕВА³, ОЛЬГА ДОЛЯ², НАТАЛИЯ КИТАЕВА², АНДЕРС ХАЛЛЕН⁴, МАГНУС УНЕМО⁵, МАРИУС ДОМЕЙКА⁶, РОН БАЛЛАРД⁷ И ВОСТОЧНО-ЕВРОПЕЙСКАЯ СИСТЕМА СЕКСУАЛЬНОГО И РЕПРОДУКТИВНОГО ЗДОРОВЬЯ*

Guidelines for the laboratory diagnosis of syphilis in East-European countries

EVGENYJ SOKOLOVSKIY¹, NATALYA FRIGO², SERGEI ROTANOV², ALEVINA SAVICHEVA³, OLGA DOLYA², NATALYA KITAJEVA², ANDERS HALLÉN⁴, MAGNUS UNEMO⁵, MARIUS DOMEIKA⁶, RON BALLARD⁷ AND EE SRH NETWORK*

¹ Отдел дерматологии и венерологии, Государственный медицинский университет им. Павлова, СПб, Россия

² Отдел лабораторной диагностики ИППП, ФГУ «Государственный научный центр дерматовенерологии», Москва, Россия

³ Лаборатория микробиологии, Институт акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта, РАМН, СПб, Россия

⁴ Отделение дерматологии и венерологии, госпиталь университета Упсалы, Упсала, Швеция

⁵ Отделение клинической микробиологии, госпиталь университета Эребро, Эребро, Швеция

⁶ Факультет медицинских наук, Университет Упсалы, Упсала, Швеция

⁷ Национальный центр по предупреждению СПИДа, ИППП и ТБ, Центры по контролю и предупреждению болезней (CDC), Атланта, США

Настоящее руководство имеет целью предоставить исчерпывающую и точную информацию относительно лабораторной диагностики сифилиса — инфекции, передаваемой половым путем (ИППП), в странах Восточной Европы. Эти рекомендации содержат важную информацию для сотрудников лабораторий, работающих с ИППП и/или материалами, относящимися к ИППП. Для отдельных стран Восточной Европы, возможно, потребуется ввести в эти руководства небольшие поправки в связи с национальными особенностями из-за недоступности некоторых реагентов или оборудования, или из-за законов данной страны (1).

Ключевые слова: сифилис, лабораторная диагностика, руководство, Восточная Европа.

The present guidelines aim to provide comprehensive and precise information regarding the laboratory diagnosis of the sexually transmitted infection (STI) syphilis in East-European countries. These recommendations contain important information for laboratory staff working with STIs and/or STI-related issues. Individual East-European countries may be required to make minor national adjustments to these guidelines as a result of lack of accessibility to some reagents or equipment, or laws in a specific country (1).

Key words: syphilis, laboratory diagnosis, guidelines, Eastern Europe.

Общепринятые критерии лабораторной диагностики сифилиса представлены в табл. 1.

Таблица 1

Лабораторные критерии диагностики сифилиса [2, 3]

Диагноз	Используемые методы*
Окончательный	Обнаружение <i>Treponema pallidum</i> в клинических образцах путем микроскопии в темном поле зрения (DFA-TP) или с помощью тестов амплификации нуклеиновых кислот (NAAT), разрешенных к медицинскому применению, или эквивалентных методов
Предварительный	Установление диагноза возможно при получении положительных результатов одновременно двух видов серологических тестов: <ul style="list-style-type: none"> нетрепонемного теста (например, RPR, RMP, VDRL) подтверждающего трепонемного теста (например, РРГА, РМГА, ИФА, РИФ-_{abc}).

* DFA-TP — прямой тест с флюоресцентными антителами к *Treponema pallidum*; NAAT — тест амплификации нуклеиновых кислот; RPR — ускоренный плазмареагиновый тест; RMP — реакция микропреципитации; VDRL — тест Исследовательской лаборатории венерических заболеваний; РРГА — реакция пассивной геагглютинации; РМГА — реакция микроагглютинации, ИФА — иммуноферментный анализ, РИФ-_{abc} — реакция иммунофлюоресценции с абсорбцией.

* Карен Бабаян и Марин Азнаурян (Армения), Рашид Исмаилов (Азербайджан), Александр Навроцкий, Валентин Панкратов, Наталья Сиарейчик, Лариса Журавская (Беларусь), Кразимира Худомирова (Болгария), Татьяна Брильене (Эстония), Георгий Галдава, Олег Квливидзе (Грузия), Андрис Рубинс, Илзе Якобсоне, Юдит Пирско (Латвия), Веста Куцинскиене, Альгирдас Грискевичус (Литва), Сергей Сидоренко (Россия), Аббос Казимов, Олим Казимов (Таджикистан), Геннадий Мавров, Наталья Кочетова (Украина), Юдит Дек (Венгрия).

* Karen Babayan and Marine Aznauryan (Armenia), Rashid Ismailov (Azerbaijan), Alexander Navrotski, Valentin Pancratov, Natalya Siarheichyk, Larisa Zhuruskaya (Belarus), Krasimira Chudomirova (Bulgaria), Tatjana Briljene (Estonia), George Galdava, Oleg Kvlivdze (Georgia), Andris Rubins, Ilze Jacobson, Judite Pirsko (Latvia), Vesta Kucinskiene, Algirdas Griskevicius (Lithuania), Sergey Sidorenko (Russia), Abbas Kasimov, Olim Kasimov (Tajikistan), Gennadij Mavrov, Natalya Kochetova (Ukraine), Judith Deak (Hungary).

Методы, используемые для постановки окончательного диагноза

Прямое выявление возбудителя *Treponema pallidum* — абсолютный критерий для окончательной диагностики сифилиса [4, 5, 6, 7]. *T. pallidum* может быть обнаружена в пробах, полученных из пораженных участков или инфицированных лимфатических узлов в случаях раннего сифилиса, путем использования следующих методов: микроскопии в темном поле зрения; прямой иммунофлюоресценции (DFA) [4]; тестов на амплификацию нуклеиновых кислот (NAAT), например полимеразной цепной реакции (ПЦР) [8, 9].

Микроскопия в темном поле. Микроскопию в темном поле можно применять для диагностики первичных и вторичных поражений кожи при сифилисе в результате заражения половым путем, а также поражений при раннем врожденном сифилисе, в редких случаях — при третичном сифилисе (в последнем случае — если материал взят из глубины инфильтрата или со дна язвы). Кроме того, образцы для микроскопии в темном поле могут быть получены путем пункции региональных лимфатических узлов, а также спинномозговой жидкости (СМЖ) и амниотической жидкости. Наличие непатогенных трепонем (*T. refringens*, *T. phagedenis (reiteri)* в урогенитальном тракте и *T. denticola* в полости рта) затрудняет исследования материала из поражений в полости рта или прямой кишке, поскольку морфология этих трепонем сходна с таковой *T. pallidum* [10, 11]. Если необходимо провести тестирование материала, полученного из одного из указанных выше мест, то предпочтительнее выполнить DFA или NAAT.

Прямая иммунофлюоресценция (DFA). Этот метод не очень широко применяется в Восточной Европе из-за отсутствия коммерчески доступных реагентов, в частности ФИТЦ-меченых моноклональных антител к *T. pallidum*.

Тесты на нуклеиновые кислоты. В настоящее время в большинстве стран Восточной Европы нет коммерчески доступных, разрешенных к медицинскому применению NAAT-тестов, выявляющих последовательности ДНК, специфичные для *T. pallidum*. Поэтому все тесты собственного производства перед использованием должны быть апробированы путем тестирования не менее десяти образцов, полученных от пациентов с сифилитическими поражениями, дающими положительный результат при микроскопии в темном поле и при этом сероположительными на сифилис, и не менее десяти образцов, у которых при микроскопии в темном поле и серологическом исследовании на сифилис был получен отрицательный результат.

Методы, применяемые для постановки предварительного диагноза

Нетрепонемные тесты. В основном такие тесты являются реакциями флоккуляции (продуктом реакции являются преципитат или хлопья). В этих тестах определяются гетерофильные антитела классов IgG и IgM к антигенам, образующимся при поражении тканей, или в результате образования антител к липидам клеточной стенки *T. pallidum*. Эти антитела появляются в крови примерно через неделю после образования первичного шанкра.

Преимуществами нетрепонемных тестов являются их относительно низкая стоимость, техническая простота и быстрое получение результатов. Полуколичественный анализ с определением титра антител позволяет использовать их при дифференциации рецидива от реинфекции и при оценке эффективности лечения.

Ограничения для применения этих тестов связаны с относительно низкой чувствительностью и развитием ложноположительных результатов при скрининге на сифилис популяций с невысоким уровнем заболеваемости.

Технические характеристики наиболее часто применяемых нетрепонемных тестов (RMP, VDRL и RPR) представлены в табл. 2. Кроме того, разработаны и используются другие нетрепонемные тесты, такие как тест с толудиновым красным и непрогретой сывороткой (TRUST) [2].

Реакция микропреципитации (RMP)

Качественный RMP-тест. Для тестирования с помощью RMP можно использовать плазму крови или инактивированную сыворотку [15, 16]. При добавлении к плазме, сыворотке или СМЖ большого сифилисом эмульсии антигена Pangborn (комплекс холестерол-кардиолипид-лецитин) происходит агглютинация, и комплекс антиген-антитело преципитирует в виде белых хлопьев. Коммерческие наборы для RMP включают спиртовой раствор антигена Pangborn (холестерол 0,98%; кардиолипид 0,03%; лецитин 0,27% в абсолютном спирте). Постановка RMP проводится в неглубоких лунках планшета для макротитрования или в углублениях шириной 0,8–1 см в планшетах, сделанных из органического стекла (плексигласа) с плоскодонными полированными лунками. Сыворотка или плазма крови и суспензия антигена помещаются в промаркированные углубления планшета. Реакция происходит при круговом перемешивании смеси сыворотки и антигена либо вручную, либо на орбитальной роторной платформе. Если в тестируемом образце нет антител, то внешний вид реакционной смеси сохраняется неизменным, например остается опалесцирующим.

Полуколичественный RMP-тест. Все образцы, давшие положительные результаты при скринин-

Таблица 2

Чувствительность и специфичность (в %) нетрепонемных тестов, применяемых при серологической диагностике сифилиса

Нетрепонемный тест	Чувствительность на разных стадиях заболевания				Специфичность
	первичный сифилис	вторичный сифилис	ранний скрытый сифилис	поздний сифилис	
RMP*	81 (70-90)	91	94 (88-100)	70 (57-80)	98 (93-99)
RPR	86 (77-100)	100	98 (95-100)	73 (57-85)	98 (93-99)
VDRL	78 (59-87)	100	95 (88-100)	71 (37-94)	98 (96-99)
TRUST	85 (77-86)	100	98 (95-100)	—	99 (98-99)

Примечание. RMP — реакция микропреципитации; RPR — ускоренный плазмареагиновый тест; VDRL — тест Исследовательской лаборатории венерических заболеваний; TRUST — тест с толуидиновым красным и непрогретой сывороткой.

* Используется главным образом в странах СНГ [12–14].

ге, должны быть повторно протестированы с помощью полуколичественного RMP-теста.

Рекомендуется также, чтобы проводилось титрование сыворотки, дающей сомнительные или даже отрицательные результаты, в особенности, если результаты RMP-теста отличаются от результатов, полученных в других серологических тестах на сифилис, или имеются непосредственные указания врача. Полуколичественные нетрепонемные тесты необходимо применять для оценки динамики течения заболевания и определения эффективности лечения.

При серологическом тестировании пациент должен быть обследован с помощью одного и того же метода до и после лечения, желательно в одной и той же лаборатории, поскольку полуколичественные результаты двух разных тестов сравнивать нельзя, например, титры в RPR-тесте часто несколько выше, чем титры в VDRL-тесте.

Ускоренный плазмареагиновый тест (RPR)

Качественный RPR-тест

В отличие от RMP-теста, RPR-тест выполняется с использованием специальных картонных или пластиковых одноразовых кассет с круглыми тестовыми зонами размером 18 мм в диаметре. При добавлении суспензии стабилизированного антигена Pangborn, абсорбированного на мелких частицах угля, к плазме или сыворотке больного сифилисом формируются комплексы антиген–антитело, которые склеивают частицы угля в большие агрегаты. Реакцию можно оценить визуально.

Полуколичественный RPR-тест. Постановку полуколичественного RPR-теста (путем титрования) необходимо проводить в следующих случаях:

- если при скрининге получены положительные результаты RPR;
- если положительные результаты были получены при использовании других тестов, но при постановке RPR они оказались отрицательными;

- по прямому указанию лечащего врача.

Разные производители наборов для постановки RPR в Восточной Европе используют разные критерии оценки результатов. Для получения корректных результатов очень важно следовать инструкциям производителя.

Другие нетрепонемные тесты

Наиболее широко используемые нетрепонемные тесты (кроме RMP и RPR):

- *тест Исследовательской лаборатории венерических заболеваний (VDRL).* Антиген и инактивированную сыворотку смешивают на предметном стекле, а стекло потом механически вращают. Комплексы антиген–антитело в форме коротких брусков выявляются при микроскопическом исследовании;
- *тест с толуидиновым красным и непрогретой сывороткой (TRUST).* В этом тесте применяется непрогретая сыворотка и толуидиновый красный как индикатор. Принцип теста состоит в том, что стандартные частицы азокрасителя толуидинового красного добавляются к основному стабилизированному антигену вместо части угля. Реагенты теста не нуждаются в охлаждении;
- *тест на скрининг реакина (RST).* В этом тесте жировой краситель судан черный добавляется к стабилизированному антигену;
- *тест на реакины с непрогретой сывороткой (USR).* Антиген стабилизируется добавлением холина хлорида и ЭДТА. В этом тесте нет необходимости ежедневно готовить свежий антиген. Используется непрогретая сыворотка. Результат учитывается под микроскопом.

Определение диагностической значимости нетрепонемных тестов. Поскольку все нетрепонемные тесты выявляют антитела к кардиолипиновому антигену, они не специфичны для сифилиса.

Реагиновые антитела могут временно выявляться в сыворотке людей с системными заболеваниями паренхиматозных органов (печень, почки, легкие), при инфаркте миокарда, атеросклерозе, острых вирусных инфекциях, включая гепатит, ветряную оспу и корь, при малярии, после иммунизации и во время беременности. Хронические ложноположительные результаты нетрепонемных реакций (длительностью 6 мес.) были обнаружены у больных с заболеваниями соединительной ткани, проказой, онкологической патологией у лиц, употребляющих наркотики внутривенно, и пожилых людей.

Как правило, у этих пациентов реакции регистрируются в низком титре (<1:8). В связи с изложенным, положительный результат, полученный в нетрепонемном тесте в низком титре, необходимо подтверждать с помощью специфичного трепонемного теста, такого как РИФ_{abc}, иммуноферментный анализ (ИФА), реакция пассивной гемагглютинации с *T.pallidum* (РПГА), реакция пассивной микроагглютинации с *T.pallidum* (РМГА) или реакция иммобилизации *T.pallidum* (РИБТ).

Нетрепонемные тесты, используемые в качестве скрининговых, дают положительные результаты примерно через 6 нед. после заражения, а, следовательно, у части больных первичным сифилисом (до 40%), с положительными результатами микроскопии в темном поле, серологические реакции могут быть отрицательными.

Полуколичественные реагиновые тесты можно также применять для оценки эффективности лечения. После успешно проведенного лечения раннего сифилиса титр антител в нетрепонемных тестах должен снизиться, не менее чем в 4 раза в течение года после проведенного лечения; в большинстве случаев результаты нетрепонемных тестов становятся отрицательными. Однако успешное лечение более поздних стадий заболевания может привести к сохранению положительных результатов определения антител, при этом титры могут снижаться или оставаться неизменными, но никогда не будут возрастать.

Трепонемные тесты. В трепонемных тестах используются цельноклеточные фиксированные *T.pallidum* (в РИФ_{abc}), разрушенные ультразвуком фиксированные *T.pallidum* штамма Николса; (в РМГА-тесте), живые трепонемы (в РИБТ-тесте) либо созданные с помощью генной инженерии рекомбинантные белки или синтетические пептиды *T.pallidum* (в ИФА, РПГА, модифицированном иммуноблоттинге и хроматографических тестах).

Трепонемные тесты применяются для подтверждения результатов, полученных в нетрепонемных тестах. Однако в популяциях с низкой распространенностью заболевания они могут быть использованы как скрининговые тесты.

Трепонемные тесты включают в себя ИФА, РПГА или ее варианты — реакцию микрогеммаг-

глютинации с *T.pallidum* (МНА-ТР или РМГА), а также реакцию иммобилизации бледных трепонем (РИБТ), реакцию иммунофлюоресценции с трепонемными антителами (РИФ) и ее варианты, модифицированный иммуноблоттинг и ускоренные хроматографические тесты на стрипах.

Преимущества трепонемных тестов заключаются в их высокой чувствительности и в особенности специфичности (табл. 3). Быстрые иммунохроматографические тесты могут применяться в качестве тестов «у постели больного» (РОС) [17]. Однако эти тесты нельзя использовать для контроля над течением болезни и определения эффективности лечения, поскольку после успешной терапии они могут оставаться положительными всю дальнейшую жизнь.

И трепонемные, и нетрепонемные тесты могут дать положительный результат при тестировании сывороток от пациентов с невенерическими трепонематозами, такими как фрамбезия (вызывается *T.pertenue*) и пинта (вызывается *T.carateum*).

В некоторых странах Восточной Европы проводятся полуколичественные исследования для установления титров противотрепонемных антител. В западных руководствах результаты трепонемных тестов либо учитываются как «реактивные, нереактивные или слабореактивные» или, в случае с тестами РПГА и РМГА, проводится тестирование единственного конечного разведения сыворотки 1:80. Поскольку противотрепонемные антитела обнаруживаются в сыворотке крови в течение многих лет после проведения успешного лечения сифилиса, нет большого смысла в том, чтобы определять титр специфических антител. Повышение или снижение титра может наблюдаться в течение многих месяцев/лет и не отражает характера течения заболевания. Общепринято, что РПГА считается положительной, если агглютинация сенсibilизированных эритроцитов фиксируется при конечном разведении сыворотки 1:80. Если агглютинация наблюдается только при меньшем разведении сыворотки, то тест считается отрицательным. Хотя результаты трепонемного ИФА-теста могут регистрироваться в виде числовых значений оптической плотности, изменения последней также не являются показателями успешности лечения и не могут отражать характер течения болезни. Считается, что определение титров антител в трепонемных тестах не придает ценности исследованию и дорого, и поэтому не рекомендуется для повседневного применения. Метод титрования сыворотки может быть применен как часть лабораторных процедур контроля качества.

Реакция иммунофлюоресценции с трепонемными антителами (РИФ) и ее модификации. Тест РИФ_{abc} [18] в целом считается наиболее чувствительным тестом на сифилис и принят в качестве

Таблица 3

Чувствительность и специфичность (в %) некоторых трепонемных тестов на сифилис

Трепонемные тесты*	Чувствительность на разных стадиях заболевания				Специфичность
	первичный сифилис	вторичный сифилис	ранний скрытый сифилис	поздний сифилис	
РИФ _{abc}	84 (70-100)	100	100	96 (93-100)	97 (94-100)
РПГА/РМГА	76 (64-90)	100	97 (94-100)	97 (94-100)	99 (98-100)

* РИФ_{abc} — реакция иммунофлюоресценции с абсорбцией;РПГА/РМГА — реакция пассивной/микрореагглютинации с *T. pallidum*.

«золотого стандарта» для трепонемных тестов. Тест РИФ_ц применяется для выявления специфических антител в спинномозговой жидкости (СМЖ). Вариантом РИФ_{abc} является также РИФ_{abc} с двойным окрашиванием. В этом тесте к растворителю добавляется контрастная краска, обычно родамин, чтобы обеспечить высококонтрастный фон для ярко-зеленых спиралевидных трепонем.

Тесты с флюоресцентными антителами, предназначенные для выявления специфичных к трепонеме антител IgM, были использованы для диагностики ранней стадии болезни и врожденного сифилиса. Крупные молекулы IgM не способны проникать сквозь плаценту и могут быть выявлены в крови эмбриона, только при нарушении плацентарного барьера, или при их активном образовании у ребенка в случае заражения. Таким образом, выявление специфических антител IgM в сыворотке, полученной от новорожденного, считается доказательством наличия врожденного сифилиса. К сожалению, данный тест имеет низкую специфичность ввиду возможности неспецифического связывания IgM-конъюгата.

Для выявления антител IgM разработан ряд тестов, основывающихся на технике РИФ:

- РИФ_{abc}-IgM: антитела к человеческому IgM, меченные флюоресцеином, используются на втором этапе теста;
- 19S-IgM-РИФ_{abc}: антитела в сыворотке фракционируются на миниколонке и иммунофлюоресцентный тест ставится с использованием фракции 19S (IgM).

Метод РИФ_{abc}. Согласно данным ВОЗ, чувствительность теста РИФ_{abc} составляет 70–100% при первичном сифилисе и 96–100% при вторичном и позднем сифилисе, а специфичность равна 94–100%. Тест РИФ_{abc} широко применяется как подтверждающий тест. Поскольку он является относительно дорогим, трудоемким и для него необходим флюоресцентный микроскоп, он не может быть использован для ежедневного скрининга.

В опытных руках тест РИФ_{abc} является одним из самых чувствительных тестов на сифилис, долгое время он считался «золотым стандартом» для

трепонемных серологических тестов.

Чтобы проводить тест РИФ_{abc}, лаборатория должна иметь доступ к источнику живых *T. pallidum* или суспензиям этого организма.

К сожалению, тест РИФ_{abc} по своей природе является субъективным тестом и может давать ложноположительные результаты, в особенности в неопытных руках. Ложноположительные результаты могут также быть зафиксированы у больных с аутоиммунными заболеваниями и проказой.

Реакция пассивной гемагглютинации (РПГА) *Treponema pallidum*. Методика РПГА проста для постановки, не требует специального оборудования и не занимает много времени. Реакция высокочувствительна и специфична.

В зависимости от стадии болезни чувствительность РПГА варьирует от 76% (при первичном) до 100% (при вторичном) и до 94–97% при скрытом сифилисе.

Агглютинирующие антитела выявляются у людей, зараженных сифилисом, в течение длительного периода после перенесенной инфекции. Как и в случае с другими трепонемными тестами, РПГА нельзя использовать для подтверждения реинфекции, для оценки тяжести болезни или для контроля над эффективностью лечения.

Преимущества РПГА по сравнению с другими трепонемными тестами (РИБТ, РИФ_{abc}) заключаются в использовании стандартизованных реагентов в коммерческих наборах, отсутствии необходимости в живых трепонемах или микроорганизмах и возможном применении автоматизации.

Абсорбция сыворотки в случае выявления антител к эритроцитам. Некоторые образцы сыворотки крови могут содержать антитела к эритроцитам. В этом случае происходит агглютинация как сенсibilизированных, так и контрольных эритроцитов. Чтобы удалить антитела к эритроцитам из сыворотки, производители наборов рекомендуют предварительную абсорбцию сыворотки контрольными эритроцитами.

Реакция микроагглютинации (РМГА) *T. pallidum*, являющаяся вариантом РПГА, в

которой вместо эритроцитов используются не-сенсibilизированные и сенсibilизированные латексные частицы, широко применяется в странах Западной Европы и США [4,7]. Она выполняется так же, как и РПГА, но учитывать ее легче, чем РПГА, реагенты в наборе являются более стабильными.

Твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) или иммуноферментный анализ (ИФА). Специфические трепонемные антигены, сорбированные на лунках планшетов для микротитрования, используются для выявления специфических антител в сыворотке крови пациента. Специфические антигены, используемые в ИФА, могут иметь различное происхождение:

- лизаты цельных клеток создаются в результате разрушения цельных клеток *T. pallidum*, с помощью ультразвука;
- рекомбинантные антигены синтезируются методами генной инженерии путем введения гена, ответственного за синтез специфического антигена *T. pallidum*, в бактериальную клетку с последующей продукцией антигена реципиентными бактериальными клетками. Такой антиген необходимо экстрагировать и очищать;
- синтетические пептиды образуются в результате последовательного химического синтеза антигенных эпитопов известных белков *T. pallidum*.

Трепонемные ИФА-тесты в основном коммерчески доступны [19]. Несколько чаще в ИФА-тестах используются специфические антигены *T. pallidum* — белки с молекулярной массой 15кД (TrN15), 17кД (TrN17) и 47кД (TrN47). Разработаны следующие форматы ИФА-теста.

Классический (непрямой) анализ

Анализ методом иммунного захвата: применяется в основном для выявления антител различных классов.

Анализ модифицированным двухфазным методом. Применяется для выявления суммарных антител, специфичных к определенному антигену, независимо от класса антител.

Тестирование с помощью ИФА. Поскольку у коммерческих ИФА-тестов существуют некоторые различия в методах, используемых для выявления антитрепонемных антител, важно строго придерживаться инструкций производителя.

Примечание. Трепонемные ИФА-тесты должны быть интерпретированы только как качественные тесты.

Тесты с применением иммуноблоттинга. Тесты на основе иммуноблоттинга можно либо приобрести, либо сделать самим. Наборы для иммуноблоттинга представляют собой полоски с помещенными на них специфическими компонентами

грубого экстракта цельных клеток *T. pallidum*, разделенные с помощью электрофореза [2].

Результаты титрования сыворотки с помощью таких истинных иммуноблоттингов трудно интерпретировать, поскольку с помощью этого метода можно выявить целый набор разнообразных антител, многие из которых неспецифичны. Использование этого теста должно быть ограничено референс-лабораториями и только в исследовательских целях. Коммерческие модифицированные иммуноблоттинги (например, тест InnoLia) легче интерпретировать; они могут быть использованы как подтверждающие тесты в случаях, когда другие трепонемные тесты дают сомнительный результат. Этот метод легко воспроизводим и относительно несложен в постановке. Однако он достаточно дорогой, требует времени для постановки и наличия квалифицированного лабораторного персонала. Этот метод дает возможность одновременно выявить спектр антител к различным антигенам *T. pallidum* и оценить вклад разных антител в общую реакцию.

Использование высокоочищенных рекомбинантных и пептидных антигенов снижает уровень неспецифической реактивности сыворотки. Использование этого метода позволяет отказаться от трудоемких и субъективных методов, которые могут быть связаны с действиями, потенциально опасными для исследователя (пассирование штаммов *T. pallidum*, работа с патогенными *T. pallidum* при постановке теста), что может произойти при постановке тестов РИФ и РИБТ.

В настоящее время существует возможность измерять интенсивность окрашивания линий антигенов на тест-полосках (сканирование) с автоматизацией процесса исследования. Однако применение этого теста пока ограничено референс-лабораториями, где он может применяться в качестве альтернативы тестам РИБТ и РИФ как теста, подтверждающего заболевание.

Тесты на хроматографических полосках «у постели больного» (РОС). Недавно стали разрабатываться РОС-тесты для диагностики сифилиса, в которых используется цельная кровь, полученная из пальца [17]. Эти недорогие тесты, которые по существу являются ИФА-тестами, выполненными на твердом нитроцеллюлозном матриксе, дают надежный результат в течение 5 мин, указывая на положительный результат образованием красной линии или точки на кассете. Эти тесты рассматриваются как большое достижение в диагностике, так как установление диагноза и назначение лечения больному могут быть осуществлены за один визит больного в клинику [20]. Формат тестов позволяет проводить тестирование в учреждениях, где нет электричества [20, 21]. К сожалению, доступные в настоящее время РОС-тесты основаны на определении специфич-

ческих антитрепонемных антител, и таким образом положительный тест указывает на то, что пациент в какое-то время своей жизни подвергался воздействию трепонемной инфекции, а не на текущую инфекцию. РОС-тесты, выявляющие как трепонемные, так и нетрепонемные антитела, в настоящее время разрабатываются и поступят в продажу через 2 года [22].

Реакция иммобилизации T. pallidum (тест РИБТ). Тест на иммобилизацию *T. pallidum* (РИБТ) считается одним из классических тестов для выявления специфических трепонемных антител. Антитела, находящиеся в сыворотке пациента, воздействуют на живые трепонемы и ингибируют характерные движения трепонем. Однако это — сложный тест, требующий значительных средств для содержания кроликов и проведения тестирования. РИБТ является недостаточно чувствительным, особенно на ранних стадиях заболевания. Кроме того, его нельзя проводить, если в тестируемой сыворотке присутствуют трепонемоцидные антибиотики. Следовательно, этот тест больше не может быть рекомендован для использования в обычных диагностических лабораториях. Однако важно, чтобы возможность поставить этот тест сохранялась в референс-лабораториях.

Ложноположительные результаты трепонемных серологических тестов. Причины биологических ложноположительных реакций в нетрепонемных тестах были указаны ранее в этом документе.

В трепонемных тестах биологические ложноположительные реакции возникают значительно реже, но могут наблюдаться в случаях аутоиммунных заболеваний, ВИЧ-инфекции и при беременности (в тесте РИФ_{abc} чаще, чем в РПГА) [11].

Основные причины биологических ложноположительных реакций. Наиболее вероятной причиной ложноположительных тестов на сифилис являются технические ошибки при учете теста и неудачи, сопровождающие сбор, доставку и хранение образцов сывороток. В число других причин входят неправильное хранение реагентов, несоблюдение инструкций производителя и правил работы с необходимым оборудованием.

Положительные серологические реакции выявляются при эндемических трепонематозах, таких как эндемический сифилис (*T. pallidum var endemicum*), фрамбезия (*T. pertenue*) и пинта (*T. carateum*). Пациент с положительными серологическими реакциями на сифилис, прибывший из страны, где распространен эндемический трепонематоз, должен быть обследован на сифилис и проити адекватное лечение по поводу сифилиса в качестве профилактических мер, если он/она не получали ранее адекватную терапию.

Положительные результаты на сифилис в тестах ИФА и РПГА также могут наблюдаться у паци-

ентов с инфекционным мононуклеозом, в особенности на фоне высокого уровня гетерофильных антител.

Отмечена связь между ложноположительной реакцией в тесте РИФ_{abc} и подтвержденным диагнозом системной, дискоидной и лекарственной красной волчанки. В таких случаях может наблюдаться нетипичная «чётко видимая» флюоресценция. Чтобы исключить эти виды ложноположительных реакций, для удаления антител к ДНК проводится абсорбция сыворотки с использованием ДНК тимуса теленка.

Ложноположительные реакции в тесте РИФ_{abc} могут также возникать из-за ошибок в выборе сорбента, используемого в этом тесте для удаления перекрестно реагирующих групповых, видовых или родовых антител (если он не прилагается к тест-набору). Для снижения уровня ложноположительных результатов необходимо проводить абсорбцию сыворотки трепонемой Рейтера.

Ложноотрицательные результаты серологических тестов. Основными причинами возникновения ложноотрицательных серологических реакций на сифилис являются: а) эффект прозоны. Нетрепонемные агглютинационные тесты, в особенности при вторичном сифилисе, могут давать слабые положительные или отрицательные реакции, вызываемые избытком антител, тогда как нормальная реакция антиген-антитело либо не завершается, либо блокируется; б) отрицательные серореакции на сифилис могут регистрироваться у ВИЧ-положительных пациентов или пациентов с иммунодефицитом, вызванным другой причиной; в) тестирование в период серологического «окна». Ложноотрицательные результаты могут быть зафиксированы у пациентов с первичным сифилисом, у которых еще не прошла сероконверсия.

Серологические исследования СМЖ. Серологические тесты для исследования СМЖ позволяют тестировать цельную СМЖ. Тесты RMP-СМЖ и VDRL-СМЖ высокоспецифичны, но могут быть относительно нечувствительны при некоторых формах нейросифилиса. Как исключаяющий тест на нейросифилис можно использовать тест РИФ_ц.

Некоторые лаборатории для выявления специфических антител в СМЖ используют трепонемные ИФА-тесты. Однако к настоящему времени нет опубликованных данных, оценивающих пользу этого теста для диагностики нейросифилиса. Результаты, полученные с помощью таких тестов, надо рассматривать с осторожностью.

Показания к применению серологических реакций/тестов. Рекомендуется выполнять серологический скрининг сифилиса, используя один из следующих тестов: RMP, RPR, ИФА, РПГА или РМГА, в зависимости от эпидемиологической

ситуации и возможностей инфраструктуры лабораторий.

В популяциях с низкой распространенностью инфекции (в стационарах, центрах медицинской помощи, кабинетах для медосмотров) лучше проводить скрининговые исследования, используя трепонемные тесты, поскольку в таких случаях можно немедленно выделить группу пациентов, которые в течение жизни имели контакт с инфекцией. После такого скрининга необходимо провести «подтверждение» результатов нетрепонемным тестом, чтобы получить более точный показатель активности инфекции.

Напротив, скрининговые исследования на сифилис в группе лиц с высокой распространенностью инфекции (лица, занимающиеся проституцией, заключенные и т. д.) должны проводиться с использованием нетрепонемных тестов, т. к. у большого числа этих пациентов трепонемные тесты могут дать положительный результат вследствие ранее перенесенной инфекции. В каждом конкретном случае положительные результаты, выявленные в скрининговых нетрепонемных тестах, должны быть подтверждены постановкой трепонемного теста.

Поскольку поздние формы сифилиса можно выявить у пациентов, находящихся в офтальмологических, психоневрологических, кардиологических стационарах, нетрепонемные тесты у таких пациентов необходимо применять в сочетании с тестами ИФА, РПГА, РИФ или иммуноблоттингом, в зависимости от возможностей лаборатории.

Ввиду важности выявления сифилиса у беременных женщин и доноров необходимо применять скрининг нетрепонемными методами в сочетании с ИФА, РПГА, РИФ, иммуноблоттингом или РИБТ (в зависимости от возможностей лаборатории).

В странах, где уровень сифилиса высок, беременных женщин необходимо серологически обследовать 3 раза — при начальном обращении, на 18–20-й и 32-й неделях беременности.

Лиц с клинической картиной первичного сифилиса необходимо тестировать с помощью нетрепонемного теста, и все положительные случаи подтверждать с помощью РИФ, РПГА или модифицированного иммуноблоттинга, или, если это возможно, используя ИФА (если такая тест-система разрешена к медицинскому применению).

Лица с клинической картиной, соответствующей вторичному сифилису, должны быть обследованы с помощью нетрепонемного теста в сочетании с тестом ИФА, РПГА или РИФ.

Лица с клиническими симптомами и/или признаками, соответствующими позднему сифилису (третичному, висцеральному, в особенности с поражениями сердечно-сосудистой, костно-мышечной системы и т. д.), должны быть обследованы

с помощью как нетрепонемного, так и двух трепонемных тестов: ИФА или РИФ и РПГА или РИБТ.

Лиц с отсутствием клинических признаков болезни, имевших половые или бытовые контакты с больными, страдающими контагиозными формами сифилиса, необходимо обследовать как пациентов с подозрением на первичный сифилис.

Лица без признаков заболевания, но с подозрением на скрытый сифилис должны тестироваться с помощью нетрепонемного теста, а также двух трепонемных тестов. Возможна следующая комбинация: ИФА или РИФ + РИБТ; ИФА или РИФ + РПГА.

Младенцы, рожденные у серопозитивных матерей, не получивших адекватную терапию или не прошедших лечение по поводу сифилиса во время беременности, должны быть протестированы с использованием как нетрепонемного теста, так и тестов для выявления ранней инфекции — РИФ или, если возможно, 19S-IgM-РИФ_{abc} или ИФА-IgM (если такой тест доступен).

Младенцы, рожденные у серопозитивных матерей, прошедших адекватное лечение, должны обследоваться с использованием теста RMP (или RPR). В случае положительного результата необходимо провести тестирование методом ИФА для выявления суммарных антител или ИФА-IgG, РИФ и, если возможно, 19S-IgM-РИФ_{abs} или ИФА-IgM.

Детей с подозрением на поздний врожденный сифилис необходимо тестировать с помощью теста RMP и двух трепонемных тестов: ИФА/РИФ и РПГА/РИБТ.

Алгоритмы и критерии диагностики сифилиса. Важно помнить, что единственным достоверным лабораторным критерием диагноза активного сифилиса является обнаружение патогенных *T. pallidum* при помощи прямой микроскопии, прямой иммунофлюоресценции или ПЦР в материале, полученном из специфических высыпаний, характерных для ранних стадий заболевания.

Положительные результаты серологических методов при наличии клинических симптомов сифилиса могут с высокой степенью достоверности подтвердить диагноз.

Результаты серологического обследования пациента в отсутствие клинических признаков или симптомов заболевания необходимо интерпретировать с осторожностью.

При тестировании пациента, которому диагноз сифилиса может быть установлен впервые (на основании жалоб или клинических признаков заболевания), или пациента, бывшего в контакте с больным сифилисом, предлагается следующий алгоритм.

Если у пациента имеются клинические признаки, соответствующие ранней стадии заболевания, надо провести исследования для прямого

выявления *T. pallidum*, используя микроскопию в темном поле, прямую иммунофлюоресценцию или ПЦР. Если получен положительный результат, устанавливается диагноз сифилиса. Если результат отрицательный, исследование надо повторить. Пациента необходимо протестировать серологически с использованием одной из указанных выше схем. Если метод скрининга (нетрепонемный или трепонемный тест) дает положительный результат, необходимо выполнить подтверждающие исследования, нетрепонемными или трепонемными методами, и пациента следует отправить к дерматовенерологу.

Если у пациента скрытый сифилис, заболевание может быть выявлено только в результате серологического исследования. Необходимо поставить нетрепонемный тест в полуколичественном варианте и направить пациента к специалисту для лечения и наблюдения. Повторно определение титра антител нужно провести через 3, 6 и 12 месяцев.

У пациентов с ранним сифилисом (первичный, вторичный или ранний скрытый), успешно прошедших лечение, трепонемный тест будет положительным, а нетрепонемный — отрицательным.

Если у пациента имеется скрытый сифилис, выявленный при серологическом скрининге с помощью трепонемного или нетрепонемного теста, необходимо поставить полуколичественный нетрепонемный тест, титр записать в карту пациента и провести лечение.

Рецидив заболевания может выражаться появлением сыпи (обычно в области заднего прохода), а также возрастанием титров в нетрепонемных тестах.

В случае повторного заражения в нетрепонемном тесте может проявиться значительное увеличение титра (в 4 раза или больше). Повторное тестирование с помощью трепонемного теста не имеет диагностического значения, поскольку у пациента трепонемный тест будет положительным в результате первоначального заражения.

Если у новорожденного подозревается ранний врожденный сифилис, тестировать необходимо и мать, и ребенка. Критерий, используемый для подтверждения раннего врожденного сифилиса, — выявление *T. pallidum* с помощью микроскопии в темном поле, прямой иммунофлюоресценции или ПЦР в образцах, взятых у ребенка (из кожных высыпаний, поражений слизистых рта, носа, из пуповины), а также из плаценты.

Если с помощью прямых методов исследования были получены отрицательные результаты, предположительный диагноз врожденного сифилиса можно поставить на основании положительных результатов 19S-IgM-РИФ_{абс.}, ИФА-IgM либо относительно повышенного (в 4 раза или больше) титра

нетрепонемных антител в сыворотке крови ребенка по сравнению с сывороткой крови матери.

После завершения лечения пациента по поводу сифилиса проводится серологический мониторинг (обычно через 3, 6, 9 и 12 мес.) с использованием полуколичественного нетрепонемного теста. Критерием успешного проведенного лечения является негативация нетрепонемного теста или четырехкратное снижение титра по сравнению с его уровнем до начала лечения. Необходимо отметить, что у пациентов с поздним сифилисом, получивших адекватное лечение, могут наблюдаться стабильные титры нетрепонемных антител и спустя 12 мес. Дополнительное лечение следует проводить только в том случае, если титр нетрепонемных антител в течение этого периода будет расти.

После окончания лечения пациентов необходимо обследовать с использованием полуколичественного нетрепонемного теста. Показателем успешного лечения сифилиса является четырехкратное или более снижение титра антител в течение года после завершения лечения. При клинико-серологическом контроле необходимо использовать тот же тест, который был использован вначале.

Благодарность

Настоящее руководство было написано по поручению Восточно-Европейской системы сексуального и репродуктивного здоровья (SRH), группы диагностики ИППП, которые поддержаны грантами Восточно-Европейского комитета Шведской организации здравоохранения, Шведского агентства международного сотрудничества для развития (SIDA). Координатор проекта Мариус Домейка.

Литература

1. Domeika M., Savicheva A., Sokolovskiy E., Ballard R., Unemo M. Guidelines for laboratory diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae* infections in Eastern European countries — results of an international collaboration. *Euro Surveill.* 2007 Dec 6;12(12): E071206.3.
2. Larsen SA, Pope V., Johnson R.E., Kennedy E.J. Jr. *A Manual of Tests for Syphilis.* Washington DC: American Health Association, 1998.
3. Norris SJ, Pope V., Johnson R.E., Larsen S.A. *Treponema and other human host-associated spirochetes.* In Murray P.R., Baron E.J., Tenover J.C., Tenover F.C., eds. *Manual of Clinical Microbiology.* Washington DC: American Society for Microbiology, 2003: 995–71.
4. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2006. *MMWR*, 2006, Vol 55, 94 p.
5. Van Dyck E., Meheus A.Z., Piot P. Syphilis. In. *Laboratory diagnosis of sexually transmitted diseases.* WHO, Geneva, year, pp. 36–49.
6. Goh B.T., Van Voorst Vader P.C. European guideline for the management of syphilis. Ed.: K. Radcliffe. *European STD guidelines.* *Int J STD AIDS*, 2001, 12 (Suppl 3): 14–22.
7. Lewis D.A., Young H. Syphilis. *Sex Transm Infect*, 2006, 82 (Suppl IV): 13–15.

8. Palmer H.M., Higgins S.P., Herring A.J., Kingston M.A. Use of PCR in the diagnosis of early syphilis in the United Kingdom. *Sex Transm Infect*, 2003, 79: 479–483.
9. Koek A.G., Bruisten S.M., Dierdorp M., van Dam A.P., Templeton K. Specific and sensitive diagnosis of syphilis using real-time PCR for *Treponema pallidum*. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2006, 12: 1221–40.
10. Young A., Mc Millan A. Syphilis and the endemic treponematoses. In: McMillan A., Young H., Ogilvie M.M., Scott G.R. *Clinical Practice In: Sexually Transmissible Infections*. Elsevier Science Limited, London, 2002, p. 395–459
11. Ratnam S. The laboratory diagnosis of syphilis. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2005 Jan; 16(1): 45–51.
12. Frigo N., Rotanov S.I., Domeika M. Laboratory diagnosis of *Treponema pallidum* infection in the Russian Federation. Abstract book of 23rd IUSTI-Europe Conference on Sexually Transmitted Infections, 19-21 October 2006, Dubrovnik, Croatia, 2007, 71 p.
13. Pancratov O. Laboratory Diagnosis of STIs. In.: *Syphilis in Pregnant women and Children*, "IPATI", Minsk, Belarus, 2007, pp.: 231–51 (Rus).
14. Domeika M., Litvinenko I., Smirnova T., Gaivaronskaya O., Savicheva A., Sokolovskiy E., Ballard R.C., Unemo M. Laboratory Diagnostics for Non-Viral Sexually Transmitted Infections in St. Petersburg, Russia: Current Situation and Hallmarks for IRMPovements. 2007, JEADV (in press).
15. Dmitrijev G., Frigo N. Syphilis. Differential clinico-laboratory diagnosis // Г.А. Дмитриев, Н.В. Фриго. Сифилис. Дифференциальный клинко-лабораторный диагноз. (Rus.). Moscow: Medical book 2004; 363.
16. Nikulin N., Frigo N., Glavinskaya T., Komarova V., Novikova S. Evaluation results of diagnostic efficacy of current treponemal and non-treponemal tests. Н.К. Никулин, Н.В. Фриго, Т.А. Главинская, В.Д. Комарова, С.И. Новикова. Результаты сравнительного изучения диагностической эффективности ряда современных нетрепонемных и трепонемных тестов. *Вестник дерматологии и венерологии (Rus.)*. *Vestnik Dermatologii i Venereologii* 1999; 3: 15–8.
17. Herring A., Ballard R., Mabey D., Peeling R.W.; WHO/TDR Sexually Transmitted Diseases Diagnostics Initiative. Evaluation of rapid diagnostic tests: syphilis. *Nat Rev Microbiol*. 2006, 4 (12 Suppl): S 33–40.
18. Hunter E.F., Deacon W.E., Meyer P.E. An iRMPoved FTA test for syphilis, the absorption procedure (FTA-ABS). *Public Health Report* 1964, 79, 410-2.
19. Schmidt B.L., Edjlalipour M., Luger A. Comparative evaluation of nine different enzyme-linked immunosorbent assays for determination of antibodies against *Treponema pallidum* in patients with primary syphilis. *J Clin Microbiol*. 2000 Mar; 38(3): 1279–82.
20. Pang T., Peeling R.W. Diagnostic tests for infectious diseases in the developing world: two sides of the coin. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007, 101: 856-7.
21. Mabey D., Peeling R.W., Ballard R., Benzaken A.S., Galbèn E., Chantalucha J., Everett D., Balira R., Fitzgerald D., Joseph P., Nerette S., Li J., Zheng H. Prospective, multi-centre clinic-based evaluation of four rapid diagnostic tests for syphilis. *Sex Transm Infect*, 2006, 82 (Suppl 5): 13-6.
22. Ballard R. (personal communication)