

Нижегородская государственная медицинская академия

ДИАГНОСТИКА СИФИЛИСА

ИНФОРМАЦИОННЫЕ МАТЕРИАЛЫ

**Нижний Новгород
2007**

Обрядина А.П., зам. директора ООО «НПО "Диагностические системы", к.б.н.,
Чепурченко Н.В., ведущий сотрудник ООО «НПО "Диагностические системы",
Фриго Н.В., зав. лабораторно-экспериментальным отделом, зав. лабораторией
ГУ НИИКВИ МЗ РФ, д.м.н.,

Никулин Н.К., директор ГУ НИИКВИ МЗ РФ, зав. кафедрой кожных и венерических
болезней Нижегородской медицинской академии, д.м.н., профессор,
Комарова В.Д., старший научный сотрудник ГУ НИИКВИ МЗ РФ, к.б.н.

СОДЕРЖАНИЕ

1	ВОЗБУДИТЕЛЬ СИФИЛИСА	4
2	ЭПИДЕМИОЛОГИЯ	8
3	КЛАССИФИКАЦИЯ, ПАТОГЕНЕЗ И ОБЩАЯ ПАТОЛОГИЯ СИФИЛИСА	8
4	ИММУНИТЕТ ПРИ СИФИЛИСЕ	13
5	МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ СИФИЛИСА	16
6	СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА СИФИЛИСА	19
7	ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ (ИФА)	25
8	ДИАГНОСТИКА СИФИЛИСА	27
9	ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ СИФИЛИСА, ВЫПУСКАЕМЫЕ НПО "ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ".	30
10	ОБЩИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ, СОБЛЮДЕНИЕ КОТОРЫХ ПОВЫШАЕТ ДОСТОВЕРНОСТЬ АНАЛИЗА	37
11	ОБЩИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ СИСТЕМЫ "ЛЮИС-ТЕСТ"	39
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	40
	ПРИЛОЖЕНИЕ	41

ВВЕДЕНИЕ

Сифилис в настоящее время представляет собой одну из наиболее актуальных проблем современной дерматовенерологии. Последнее десятилетие XX века характеризовалось чрезвычайно высокой заболеваемостью этой инфекцией в России и странах Восточной Европы. По данным ВОЗ, в течение года в мире регистрируется около 330 миллионов новых случаев наиболее распространенных инфекций, передаваемых половым путем (ИППП). Из них примерно 12 миллионов случаев приходится на долю сифилиса. Ввиду неполной регистрации сифилиса реальные показатели его заболеваемости в несколько раз превышают данные официальной статистики.

В России беспрецедентный непрерывный рост заболеваемости сифилисом отмечался в период с 1990 по 1997 годы с максимумом в 1997 году (277 случаев на 100 тыс. населения), что превысило предшествующий "спокойный" уровень 1989 года более чем в 60 раз. Несмотря на наметившуюся в последние годы тенденцию к снижению заболеваемости сифилисом, к 2005 году прогнозируется ее дальнейший рост.

В последние десятилетия отмечено перераспределение в структуре скрытого сифилиса с неуклонным возрастанием числа эпидемиологически опасных ранних форм инфекции, сопряженных с поздними осложнениями, серорезистентностью, ростом врожденного сифилиса, трудностями диагностики. Все это накладывает большую ответственность на клиницистов, лабораторных работников и разработчиков тест-систем для диагно-

стики сифилиса.

Своевременное и качественное распознавание сифилитической инфекции связывается в настоящее время с широким внедрением специфических трепонемных тестов, к числу которых относится иммуноферментный анализ (ИФА). Он имеет ряд преимуществ перед другими методами, обладая такими качествами лабораторного анализа, как специфичность, надежность, воспроизводимость, простота и возможность автоматизации.

Актуальным остается и применение для диагностики сифилиса и контроля за эффективностью терапии нетрепонемных тестов, в первую очередь микрореакции преципитации и ее вариантов (Приказ № 87).

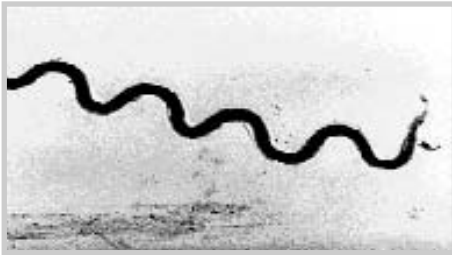
Одним из крупнейших производителей тест-систем для диагностики инфекции является НПО "Диагностические системы". Важное место в его продукции занимают препараты для диагностики сифилиса, прошедшие широкую апробацию в России и странах СНГ, получившие высокую оценку официальных контролирующих органов, имеющие сертификаты качества. Выпуск этих диагностических наборов и тест-систем основан на применении высокотехнологичных современных методов, последних достижений генной инженерии и иммунохимии.

В задачу настоящих рекомендаций входило ознакомление широкого круга практикующих дерматовенерологов и лабораторных работников с проблемами сифилиса и его диагностики путем применения трепонемных (ИФА-АНТИ-ЛЮИС) и нетрепонемных (ЛЮИС - ТЕСТ) препаратов, выпускаемых ООО «НПО «Диагностические системы».

1. ВОЗБУДИТЕЛЬ СИФИЛИСА

Бледная трепонема (БТ) - возбудитель сифилиса - была открыта в 1905 году F.Schaudinn и E.Hoffman. Она относится к порядку Spirochaetales, семейству Spirochaetaceae, роду Трепонема, виду *Treponema pallidum* и получила свое название из-за слабой способности воспринимать окраску. Это микроорганизм спиралевидной формы длиной от 6 до 20 м и шириной от 0,1 до 0,18 м.

Рис. 1. Бледная трепонема, штамм Никольса, негативное контрастирование (7-дневный орхит кролика) x 7000 [Овчинников Н.М. и соавт., "Лабораторная диагностика заболеваний, передающихся половым путем", 1998, с. 9].



Завитки спирали расположены на равном расстоянии друг от друга и имеют амплитуду 0,2-0,3 м. Визуализация микроорганизма возможна посредством темнопольной или фазово-контрастной микроскопии, а также при импрегнации серебром.

Трепонемы отличаются характерными движениями: вращательным вокруг своей продольной оси, поступательным, маятникообразным, волнообразным, контракильным. Они активно перемещаются в среде, что сопровождается сгибанием клетки под прямым углом без потери спиралевидной фор-

мы. Такого рода сгибательные движения отсутствуют у других спирохет и являются одним из классификационных признаков рода Трепонема. По аналогии с грамотрицательными микроорганизмами бактерия имеет наружную и внутреннюю цитоплазматическую мембрану, тонкий слой пептидогликана и жгутики, лежащие в периплазматическом пространстве и тянущиеся от обоих концов к центру микроорганизма.

Геном *Treponema pallidum* представлен кольцевидной хромосомой, состоящей из 1, 138, 006 пар оснований со средним содержанием гуанин-цитозина 52,8%.

Бледная трепонема имеет один из мельчайших прокариотических геномов, представленный генами с предсказанной биологической ролью и ранее не известными генами. 17% из них соответствуют белкам других видов бактерий, что может объяснить недостаточную чувствительность серологических тестов на сифилис, использующих цельноклеточный антиген.

Рис.2 Хромосома *T. pallidum* [Clair M.,Fraser C. et al. Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete.- Science.- 1998.- 281.- P. 375 - 388]

Микроорганизм включает 42 семейства генов, ответственных за основные жизнеобеспечивающие функции: механизмы репликации ДНК, транскрипции, трансляции, энергетический метаболизм, процессы клеточного деления и секреции белков. Мембранные белки *Treponema pallidum* кодируются большой семьей генов-дубликатов и могут функционировать как порины и факто-



ры адгезии. Один из этих генов, кодирующих TROMP 1, является частью оперона, кодирующего АТФ-связывающую транспортную систему.

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

Бледная трепонема является облигатным паразитом и не культивируется *in vitro*. Это объясняет наличие небольшого генома с лимитированием процессов биосинтеза и способности выживать исключительно за счет организма хозяина. Важную роль в жизнедеятельности БТ играет транс-

порт необходимых питательных веществ из окружающей среды. Это объясняет присутствие широкого репертуара транспортных белков с большим выбором субстратных специфичностей.

Treponema pallidum - микроаэрофил и растет только в условиях пониженных концентраций кислорода. Этим обеспечивается равновесие между потребностью в кислороде для выработки энергии и защитой от воздействия реактивных промежуточных кислородных радикалов. Единственным ферментом, отвечающим за утилизацию кислорода бледной трепонемой, считается NADH-оксидаза (Приложение 1).

В качестве источников энергии БТ использует сахара, преобразуемые в ходе гликолиза и пентозофосфатного пу-

ти. Ответственными за рост и размножение БТ в тканях считают глюкозу, маннозу и мальтозу. Пути использования аминокислот как источника углерода и энергии в настоящее время не известны. У БТ не идентифицированы гены, кодирующие цикл трикарбоновых кислот, отсутствует дыхательная электронотранспортная цепь, что позволяет говорить об упрощенной стратегии метаболизма возбудителя.

Одной из важнейших функций *Treponema pallidum* является движение, что обуславливает ее высокую инвазивность и возможность распространяться по жидкостям организма: внутрисуставной, глазной, экстрацеллюлярном матриксе и в коже. Двигательная активность обеспечивается 36 генами, кодирующими белки жгутиковых структур: три внутренних белка (Fla B1, Fla B2, Fla B3), белок оболочки (Fla A) и два неохарактеризованных протеина. Обнаружено также две копии белка "выключателя" (Fla G) и 13 генов, кодирующих гомологи белков хемотаксиса, в том числе Che A, Che W, Che Y.

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

1. типичная спиралевидная форма, мало устойчивая к действию лечебных препаратов и встречающаяся, как правило, при ранних стадиях инфекции;
2. цисты бледной трепонемы, являющиеся формами устойчивого выживания и размножения, возникающие в неблагоприятных условиях существования (при наличии антител, воздей-

ствии антибиотиков) и сопровождающиеся образованием дополнительной системы оболочек. Возможность существования цист покоя объясняет скрытое, длительное, вялое течение, положительные серологические реакции у больных, устойчивость к лекарственным препаратам;

3. L-формы бледной трепонемы, представленные гранулами, шарами и зернами, образующиеся под влиянием антибиотиков и устойчивые к воздействиям их больших доз, обладают сниженной патогенностью и иной, чем типичные бледные трепонемы, антигенной структурой. С существованием L-форм связывают скрытое, либо длительное бессимптомное течение инфекции.

Считается доказанной возможность реверсии неспиралевидных форм бледной трепонемы в спиралевидные, что может объяснить появление клинических и серологических рецидивов при плохо леченной сифилитической инфекции.

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

2. ЭПИДЕМИОЛОГИЯ

Сифилис - хроническое инфекционное заболевание с разнообразными клиническими проявлениями, характеризующееся периодичностью течения. Возбудитель передается через входные ворота инфекции (трещины, ссадины, царапины) при половых контактах; при этом заражение сифилисом наблюдается примерно в половине случаев. Передача инфекции может происходить также при трансфузии зараженной крови и вертикально - от

большой беременной матери - плоду, чему способствует устойчивость бледной трепонемы во внешней среде и ее высокая инвазивность.

Известны случаи передачи инфекции в бытовых условиях у близких родственников - как путем прямого контакта (при поцелуях, укусах, кормлении грудью и т.д.), так и опосредованно через предметы обихода, в особенности, соприкасавшиеся с зараженными слизистыми оболочками больного. Возможно также профессиональное заражение медицинского персонала при соприкосновении с зараженными участками тела пациента (у акушеров-гинекологов, хирургов, патологоанатомов и т.д.).

Существует две точки зрения на возможность заражения сифилисом здорового человека. Одни авторы полагают, что при соблюдении условий для инфицирования (наличие достаточного количества бледных трепонем и повреждений кожи и слизистых оболочек) заражение происходит у всех людей, на чем основаны рекомендации к проведению лечения всем лицам, контактировавшим с больным сифилисом. Согласно другой точке зрения, от 20 до 40% людей, имевших половой контакт с больными сифилисом, не заражаются. Этому способствует целостность покровов, единичные половые контакты, характер и локализация (заразительность) сифилидов, защитное действие трепонемацидных субстанций, содержащихся в крови отдельных индивидуумов.

Сифилис встречается во всех частях земного шара. Чаще всего им страдают молодые люди в возрасте наибольшей сексуальной активности (от 20 до

30 лет), хотя в последние годы в России отмечается явная тенденция к резкому "омоложению" инфекции с увеличением заболеваемости среди подростков 14-16 лет и моложе.

Факторами, способствующими росту инфекции, являются войны, снижение уровня жизни людей, алкоголизм, наркомания, широкое распространение коммерческого секса и нетрадиционной половой ориентации, ослабление семейных связей в странах с социально-экономической неустойчивостью, неразвитость системы первичной профилактики инфекций, передающихся половым путем (ИППП), лечение у некомпетентных врачей и самолечение.

3. КЛАССИФИКАЦИЯ, ПАТОГЕНЕЗ И ОБЩАЯ ПАТОЛОГИЯ СИФИЛИСА

Сифилис - хроническая системная инфекция, характеризующаяся периодами активных проявлений, чередующихся с периодами латентности.

Естественное течение сифилиса может в значительной степени варьировать. Согласно МКБ X, его стадии в настоящее время обозначаются как ранний (инфекционный) и поздний (неинфекционный), а также врожденный сифилис. Выделяют также неуточненные формы сифилиса (таблица 1).

Традиционная схема течения приобретенного сифилиса включает инкубационный период, первичный, вторичный и третичный сифилис.

Факторы патогенеза сифилиса изучены недостаточно.

Инкубационный период и первичный сифилис

После инокуляции и внедрения через слизистую оболочку или поврежденную кожу *T.pallidum* атакуют клетки хо-

Таблица 1.

Классификация сифилиса

		Время после заражения 9-90 дней
Ранний сифилис: A51		
Первичный сифилис:	* Половых органов	
	* Анальной области	6 нед. - 6 мес.
	* Других локализаций	
Вторичный сифилис:	* Кожи и слизистых оболочек	
	* Другие формы	< 2 лет
Ранний сифилис скрытый		
Ранний сифилис неуточненный		
Поздний сифилис A 52		
Поздний сифилис скрытый		> 2 лет
Кардиоваскулярный		
Нейросифилис:	с симптомами	
	асимптомный	3 - 20 лет
	неуточненный	
Другие симптомы позднего сифилиса		
Поздний неуточненный		
Врожденный сифилис A 50		
Ранний врожденный		< 2 лет с момента рождения
Поздний врожденный		> 2 лет
Другие и неуточненные формы A 53		
Сифилис скрытый неуточненный как ранний или поздний		
Сифилис неуточненный		

зияна и начинают размножаться. Трепонемы прилипают (адгезия) к различным типам клеток, взаимодействуя с фибронектином и другими клеточными рецепторами хозяина. Спустя несколько часов большинство трепонем из места внедрения переправляется в регионарные лимфоузлы. Микроорганизм диссеминирует в органы и ткани и входит в контакт с эндотелием сосудов с помощью винтообразных движений.

Спустя 2 - 6 недель после инфицирования на месте инокуляции развивается первичный аффект, или твердый шанкр. Средний инкубационный период (3 недели) обеспечивается внедрением 500 - 1000 микроорганизмов, что знаменует начало первичного периода сифилиса. Вначале первичный

аффект развивается как безболезненная уплотненная папула. Затем поверхность ее некротизируется с образованием эрозии или язвы с четкими границами, содержащей трепонемы. Гистопатологически шанкр характеризуется периваскулярной инфильтрацией плазматическими клетками, лимфоцитами, гистиоцитами, пролиферацией эндотелия капилляров с исходом в облитерирующий эндартериит. Бледная трепонема при этом находится в межэпителиальных пространствах, в инвагинациях фагосом клеток эндотелия, фибробластов, плазматических клеток и клеток эндотелия мелких капилляров, внутри лимфатических каналов и регионарных лимфоузлов. Вторым характерным симптомом этой

стадии сифилиса является регионарный лимфаденит. Серозная жидкость из очагов поражения содержит трепонемы. Диагноз может быть подтвержден путем детекции в темном поле или методом ПЦР. Гуморальные антитела (АТ) появляются не ранее чем через 1 - 4 недели после формирования шанкра.

Вторичный сифилис

Вторичный сифилис является стадией диссеминации заболевания и обусловливается размножением и распространением спирохет в организме, при этом трепонемы обнаруживаются в большинстве органов и тканей, несмотря на присутствие противотрепонемных АТ в высоких концентрациях. Неспецифические симптомы вторичного сифилиса, развивающиеся обычно в интервале от 6 недель до 6 месяцев после инфицирования или спустя 1 - 5 недель после появления первичного аффекта, включают лихорадку, головную боль, боли в горле, артралгии, анорексию, генерализованную лимфаденопатию.

Наиболее характерными проявлениями вторичного периода сифилиса являются генерализованные высыпания на коже и слизистых, в том числе в ротовой полости, широкие кондиломы, алопеция, лейкодерма. Проявления вторичного сифилиса могут спонтанно регрессировать, но могут и рецидивировать в течение года после инфицирования при отсутствии лечения пациента.

Во вторичной стадии инфекции, за редким исключением, все серологические тесты на сифилис являются положительными, и в отделяемом сифилидов обнаруживаются бледные трепонемы.

Скрытый сифилис

Переход инфекции в скрытый период может возникать между первичной и вторичной стадиями, а также после вторичной стадии. Инфекция может также с момента заражения протекать бессимптомно.

Скрытый сифилис считается ранним, если с момента заражения прошло менее двух лет и поздним, - если более двух лет (МКБ X). В американской печати этот срок ограничивается одним годом с момента заражения. Если латентный период следует за вторичной стадией, может наступить рецидив инфекции.

Поздний скрытый сифилис ассоциируется с относительным иммунитетом, возрастанием устойчивости к реинфекции по отношению к гомологичным трепонемам. Болезнь может протекать скрыто многие годы.

Серологические реакции в латентной стадии обычно положительны и указывают на присутствие микроорганизма, возможно, в лимфоузлах или селезенке.

Третичная стадия

У одной трети нелеченных пациентов спустя 10 - 20 лет и ранее (3 - 6 лет) может развиться третичная стадия сифилиса. В результате внедрения БТ в центральную нервную систему (ЦНС), сердечно-сосудистую систему, кожу, кости, суставы и внутренние органы возникают проявления позднего сифилиса. Образующиеся при этом специфические образования - гуммы - могут быть единичными и множественными и варьировать в размерах от микроскопических дефектов до крупных опухолеподобных образований, в которых обычно содержится небольшое количество трепонем.

Частым осложнением кардиоваскулярного сифилиса является аневризма аорты. В этот период может развиваться нейросифилис (хотя он иногда сопровождается и более ранние стадии сифилиса), протекающий как менингovasкулярный или паренхиматозный с исходом в деструкцию паренхимы мозга, спинную сухотку или таборез, либо бессимптомно.

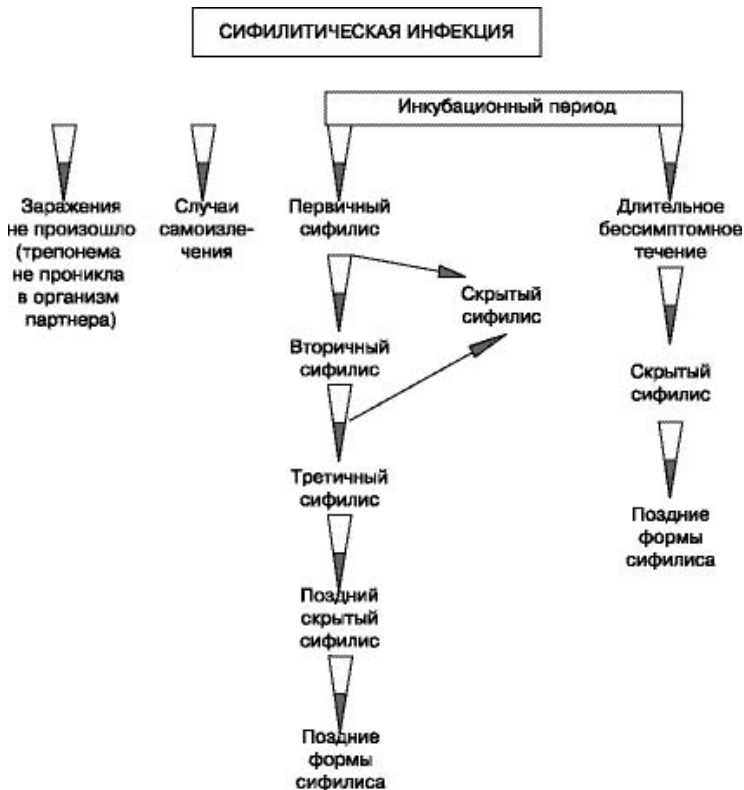
Третичный сифилис, также как и вторичный, может протекать с клиническими рецидивами и ремиссиями. Эта

стадия инфекции считается незаразной. Основой для диагноза обычно являются позитивные результаты трепонемных реакций. В гуммах или биоптатах органов при прямой микроскопии могут быть обнаружены трепонемы.

Течение приобретенного сифилиса

Традиционное стадийное течение сифилиса отмечается у значительного числа больных, однако могут наблюдаться отклонения от этой классиче-

Общая схема течения сифилитической инфекции (Милич М.В., 1987)



ской схемы в виде длительного бессимптомного течения инфекции, которая при этом диагностируется почти всегда случайно на основании положительных результатов серологических реакций крови, либо в стадии нейро- и висцеросифилиса.

У ряда пациентов заражения вообще не происходит, либо наблюдаются случаи самоизлечения, что объясняется особенностями организма больного, в частности, наличием нормальных иммуноблизингов, обладающих трепонемацидными и трепонемастатическими свойствами.

Врожденный сифилис

Врожденный сифилис возникает вследствие инфицирования плода во время беременности. Источником заражения является больная сифилисом мать. Заражение наступает, обычно начиная с 10-й недели беременности, но чаще всего - с 4- 5 месяца.

БТ проникают в организм плода через пупочную вену или лимфоузлы пуповины с развитием трепонемной септицемии и тяжелым поражением внутренних органов: печени, селезенки, легких, нервной и костной системы.

Наибольшая вероятность инфицирования плода существует у женщин, заразившихся сифилисом во время беременности или за год до ее наступления, при этом чаще всего врожденный сифилис возникает у детей, рожденных от не лечившихся или неполноценно пролеченных матерей. У 25% таких женщин отмечается внутриутробная гибель плода; 25-30% новорожденных погибают вскоре после рождения; у 40% детей симптомы врожденного сифилиса возникают в более поздние сроки.

По времени возникновения врожденный сифилис делится на ранний и поздний, и сопровождается всеми клиническими симптомами (кроме поражения сердечно-сосудистой системы), характерными для сифилиса взрослых, а также положительными серологическими реакциями в крови и СМЖ. В специфических высыпаниях, ткани пуповины и амниотической жидкости может быть обнаружена бледная трепонема. Существует возможность скрытого, а также длительного бессимптомного течения инфекции, диагностируемой лишь по положительным серологическим реакциям крови ребенка.

Сифилис и ВИЧ-инфекция

Сифилис, как и другие ИППП, является фактором риска для заражения и развития ВИЧ-инфекции. Этому способствует повреждение эпителиальных барьеров в месте развития твердого шанкра, приток в окружающую среду большого числа клеток (макрофагов, Т-лимфоцитов) с рецепторами для ВИЧ, а также усиление репликации ВИЧ цитокинами, которые продуцируются макрофагами, стимулированными трепонемными липопротеинами. Присоединение ВИЧ-инфекции приводит к более тяжелому течению сифилиса, что выражается в более частом и раннем поражении нервной системы, высокой частоте язвенных (в том числе рупиоидных) проявлений, расцениваемых как "злокачественный" сифилис. Сопутствующая ВИЧ-инфекция приводит к большей частоте таких общих симптомов, как лихорадка, слабость, а также к атипичной серологической симптоматике вплоть до отрицательных

результатов в период цветущего сифилиса, что нередко затрудняет диагностику и предъявляет высокие требования к диагностическим методам и препаратам.

4. ИММУНИТЕТ ПРИ СИФИЛИСЕ

Иммунитет при сифилисе инфекционный и существует до тех пор, пока в организме имеется возбудитель. Общеизвестно, что у людей, инфицированных сифилисом, имеется определенная невосприимчивость к экзогенной реинфекции (так называемый шанкерный иммунитет). В ряде случаев пассивная передача сыворотки, IgG или лимфоцитов от иммунных кроликов реципиентам - кроликам защищает последних от заражения в случае интрадермальной инокуляции БТ. Безуспешные пока попытки создать противосифилитическую вакцину обусловлены тем, что этот микроорганизм не культивируется на питательных средах.

Естественными барьерами, препятствующими проникновению возбу-

дителя в организм человека, являются:

- неповрежденная кожа за счет ее целостности и присутствия жирных кислот и молочной кислоты - продуктов жизнедеятельности потовых и сальных желез, создающих низкий pH, губительный для микроорганизмов;

- слизь, выделяемая клетками половых путей, - за счет вязкости создает препятствие проникновению микроорганизмов;

- бактерицидные компоненты организма - спермин и цинк мужской спермы, лизоцим (слюна, слезы), бактерицидные протеолитические ферменты;

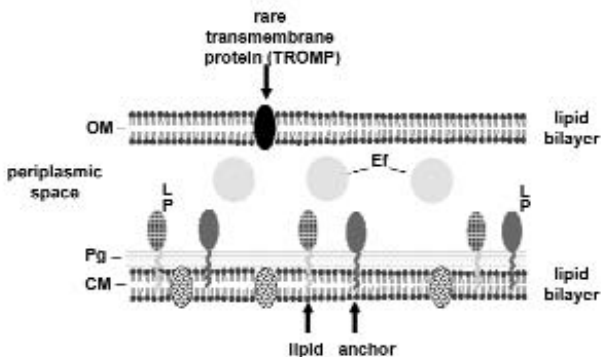
- нормальная бактерицидная флора (например, палочки Додерляйна во влагалище), действующая по принципу конкуренции с микробом;
- фагоцитоз.

Основными антигенными детерминантами трепонем являются компоненты трехслойной наружной стенки и, в некоторых случаях, капсулоподобного чехла мукополисахаридной природы. Наиболее изученными из них являются:

- протеиновые антигены БТ, имеющие

Рис.3.

Предполагаемая структура внешней и цитоплазматической мембран *Treponema pallidum* (Cox et al., 1996)



в своем составе фракцию, общую для патогенных и сапрофитных трепонем, против которой синтезируются групповые антитела. В их составе, кроме того, имеется фракция, специфичная только для патогенных трепонем. Протеино-вые АГ *T.pallidum* высокоиммуногенны, АТ против них появляются в организме в конце инкубационного периода или в течение первой недели после появления твердого шанкра;

- антигены полисахаридной природы. Они мало иммуногенны, вызывают образование АТ в низких титрах; роль этих АТ в серодиагностике сифилиса не существенна;

- липидные антигены БТ, определяющиеся в организме больного сифилисом примерно на 5-6 неделе после заражения, они усиливают иммунологическую реакцию, но могут обуславливать неспецифические реакции.

Бледная трепонема обладает замечательной способностью уклоняться от клеточного и гуморального ответа, который она вызывает в инфицированном хозяине. Это свойство связывали с наружным покровом, состоящим из сывороточных белков и/или мукополисахаридов изолятов наружной мембраны вирулентной *T. pallidum*.

Однако сейчас имеются доказательства того, что уклонение от иммунного ответа у этой спирохеты является результатом ее необычной молекулярной архитектоники. На основании комплекса молекулярных, биохимических и ультраструктурных данных высказывается предположение, что наружная мембрана *T. pallidum* содержит небольшое количество слабоиммуногенных белков ("редкие белки наружной мембраны" - TROMPS), а высокоим-

мунногенные белки (липопротеины) локализованы преимущественно в периплазматическом слое цитоплазматической мембраны.

Наружная мембрана возбудителя сифилиса содержит в 100 раз меньше связанных с мембраной белков, чем у типичных грамотрицательных бактерий, что обуславливает хроническое течение сифилитической инфекции (Blanco, 1997). Большинство антигенов бледной трепонемы представляют собой связанные с мембраной липопротеины. Многие из этих протеинов высоко иммуногенны.

ДНК *T.pallidum* subsp. *Pallidum* (Nichols) кодирует 5 мембранных липопротеинов: Trp 47, Trp 41, Trp 29-35, Trp 17 и Trp 15, предполагаемый каналобразующий белок наружной мембраны (Trp 50), флагеллярные белки fla A, flg E, белок цитоплазмы cfr A, 16S рPHK (rrnA), а также цистенил - тPHK - синтетазу (cysS). Иммунозначимыми липопротеинами по данным Gerber (1997) являются Trp 17, Trp 29 -35 (Trp D), Trp 41- 44,5 (TrpA), Trp 47 и Trp 35 (Trp C), мембранный протеин Trp 39 (BMP). Высокие титры антител в ИФА были обнаружены к рекомбинантным аналогам Trp 17, Trp 47, Trp 44,5.

По данным Blanco (1997), мембрано-связанные редкие протеины наружной мембраны *T. pallidum* - TROMP являются предполагаемыми поверхностными антигенными детерминантами. Пять белков с мол. весами 17, 28, 31, 41-45, 65 kDa ассоциированы с наружной мембраной *T. pallidum*. Протеины 17 и 45 kDa также определялись в больших количествах на внутренней мембране протоплазматического цилиндрического комплекса. Они были охаракте-

ризованы как липопроотеины и связаны с липидным бислоем мембраны. Напротив, 28, 31, 65 kDa эксклюзивно связаны с наружной мембраной.

Tr15 является липопроотеином, АТ к нему регистрируются в основном при первичном и врожденном сифилисе; Tr17 называют "величайшим мембранным белком". Максимум выработки АТ к нему наблюдается при вторичном сифилисе. Антигены 42-44 (Tmr A) и полимерный АГ 190 кД патогенспецифичны и обнаруживаются также у других трепонем (*T.phagedenis*, Reiter, *pertenue*, *carateum*).

АТ к белку 190 кД иммобилизуют БТ в присутствии инактивированной сыворотки. АГ 47 кД является иммунодоминантным пенициллинсвязывающим белком, вызывает образование АТ как в первичной, так и во вторичной стадии сифилиса. Многие авторы считают TmrA иммунодоминантным и широко используют в серодиагностике сифилиса.

Липопротеин с молекулярным весом 15 kDa обладает значительной иммуногенностью, антитела к этому белку являются протективными.

В реализации иммунного ответа организма на внедрение БТ участвуют макрофаги, Т- и В-лимфоциты. Первый контакт организма с БТ приводит к развитию неспецифической фагоцитарной реакции, в которой участвуют два типа профессиональных фагоцитов:

- полиморфноядерные лейкоциты (нейтрофилы) (доминирующие количественно короткоживущие клетки);
- мононуклеары: моноциты и тканевые макрофаги, осуществляющие функции захвата, переваривания и презентации антигена иммунокомпе-

тентным клеткам. В последние годы важная роль в презентации АГ отводится дендритным клеткам, однако их роль при сифилисе пока не изучена.

Фагоцитарная реакция при сифилисе имеет ряд существенных особенностей. Кроме макрофагов и нейтрофилов, в ней участвуют и непрофессиональные фагоциты - лимфоциты, плазматические клетки, фибробласты, перициты нервных волокон, эндотелиоциты капилляров. В них возбудитель полностью не переваривается, а продолжает паразитировать (эндоцитобиоз) и депонируется, будучи изолированным полимембранными фагосомами. Тем не менее, основную роль в процессе фагоцитоза БТ играют профессиональные фагоциты - макрофаги. В них фагоцитоз чаще носит завершённый характер.

В последние годы стало известно, что информация о захваченном АГ передается от макрофагов лимфоцитам с помощью класса соединений, называемых цитокинами, к которым относятся интерлейкины и интерфероны. При этом в результате их воздействия наблюдается активация локально действующих на АГ возбудителя Т-лимфоцитов и происходит запуск дифференцировки В-лимфоцитов в плазматические клетки, продуцирующие противотрепонемные АТ. Сначала синтезируются трепонемоспецифические Ig класса М (первичный иммунный ответ), которые у больных сифилисом обнаруживаются первыми и могут регистрироваться даже в период инкубации. Позднее происходит переключение на синтез IgG (вторичный иммунный ответ). Это, как правило, совпадает с периодом позитивации

реакции Вассермана и стадией Вассерман-положительного сифилиса (по старой классификации - первичного серопозитивного).

Реакции клеточного и гуморального иммунитета, развивающиеся в месте внедрения БТ, вызывают образование твердого шанкра. Многие авторы рассматривают его как лимфоплазмодитарную гранулему, определяющей морфологической единицей которой является плазматическая клетка. Разрешение высыпаний и их очищение от трепонем во многом зависят от клеточно-опосредованного иммунного механизма, включающего фагоцитоз трепонем активированными макрофагами. Активация последних, в свою очередь, происходит под воздействием лимфокинов (IL2, IFN γ , IL12, IL10), продуцируемых антиген-специфическими Т-клетками. Не последнюю роль в элиминации БТ с поверхности твердого шанкра играет также непосредственный локальный клеточный ответ Т_H, а также активация процессов поглощения и киллинга микроорганизма макрофагами вследствие воздействия на них опсонизированных антител. Локальные воспалительные изменения при сифилисе опосредуются путем активации моноцитов-макрофагов, В-клеток и клеток эндотелия интегральными липопротеидами мембраны *T. pallidum*.

Образующиеся в большом количестве АТ нейтрализуют АГ, вступая с ними в специфическое взаимодействие. При этом образуются комплексы АГ-АТ (или ЦИК), которые захватываются макрофагами, либо подвергаются воздействию белков системы комплемента и разрушаются. Не элиминирован-

ные ЦИК могут откладываться в тканях (коже, почках и т.д.). При этом возникают клинические проявления иммунокомплексной патологии (в частности, васкулит, гломерулонефрит), которая лежит в основе высыпаний вторичного периода сифилиса.

Персистенция спирохет и переход инфекции в хроническую форму, несмотря на наличие, казалось бы, эффективной клеточной защиты, может быть обусловлен:

- антигенной инертностью клеточной поверхности трепонем вследствие малочисленности мишеней для иммунного ответа (TROMPs);
- локализацией трепонем в труднодоступных зонах для АТ и Т-лимфоцитов внутри клеток и клеточных ядер, в головном мозге, глазах, в клетках иммунопротективной ниши;
- наличием субпопуляций трепонем, резистентных к фагоцитозу, а также (по аналогии с трипаносомами) изменением их антигенного профиля под влиянием специальных генов;
- дефектами регуляции местного иммунного ответа хозяина;
- цитотоксическим действием трепонем на Т-лимфоциты;
- иммуносупрессивным влиянием мукполисахаридов сыворотки больных сифилисом на Т-лимфоциты.

Постепенное падение активности факторов клеточного иммунитета приводит к снижению уровня АТ и исчезновению клинических проявлений заболевания. Не последнюю роль в этом играет макрофаг-обусловленное очищение макроорганизма от БТ и противотрепонемная активность комплемент-зависимых АТ, предположительно направленных против TROMPs. Макро-

и микроорганизм приспосабливаются друг к другу. При этом БТ переходит в состояние цист, L-форм, прячется в полимембранных фагосомах. Возникает скрытый период инфекции.

При неблагоприятных обстоятельствах (стресс, травмы, инфекции) происходит реверсия возбудителя в спиралевидную форму, вновь "оживает" клеточный и в особенности - гуморальный иммунитет, возникает рецидив клинических проявлений заболевания.

Длительно существующая инфекция приводит к развитию иммунной реакции в виде гиперчувствительности замедленного типа и поражению генетического аппарата клетки организма хозяина (транскитоз, эндоцитобиоз в ядре клетки), в результате начинают вырабатываться аутоантитела и развиваются аутоиммунные реакции, лежащие в основе клинических проявлений позднего сифилиса. Концентрация АТ при этом невысокая, но на всю жизнь может остаться серологических рубец в виде положительных результатов трепонемных реакций.

5. МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ СИФИЛИСА

Спектр методов лабораторной диагностики сифилиса многообразен. В связи с особенностями клинического течения сифилиса, сложной иммунологической перестройкой в организме больного по-прежнему актуальной остается комплексность диагностики, предполагающая одновременное использование нескольких методов.

Методы обнаружения *T. pallidum* традиционно подразделяют на прямые (заражение животных, микроскопия в темном поле и молекулярно-биологи-

ческие методы детекции ДНК *T. pallidum*) и непрямые серологические тесты для выявления АТ.

В свою очередь, серологические методы представлены двумя классами:

1) Нетрепонемные тесты, определяющие АТ к липоидным АГ тканей хозяина или возбудителя (RW, VDRL-Veneral Disease Research Laboratory, RPR-Rapid Plasma reagin); реактивность в этих тестах обычно указывает на повреждение тканей и не всегда специфична в отношении сифилиса. Простота выполнения и низкая стоимость позволяет использовать их как отборочные реакции при установлении предварительного диагноза сифилиса;

2) Трепонемные тесты, в которых используются специфические АГ трепонем, обязательные для подтверждения диагноза (РПГА, РИТ, РИФ и ИФА). Они являются более сложными и дорогостоящими, чем тесты 1-й группы, но и более специфичными и чувствительными. Сюда же относится выявление АТ в СМЖ, а также достаточно редко используемые гистологические исследования.

Прямые методы диагностики сифилиса

Наиболее убедительным доказательством инфицирования сифилисом является прямая визуализация БТ в темном поле зрения, основанная на феномене Тиндала: если в темное помещение пропустить через узкую щель солнечный свет, то начинают ярко светиться мелкие пылинки, невидимые при обычном освещении. Они отражают солнечные лучи в разных направлениях, часть из них попадает в наш глаз. Исследование в темном поле микроскопа позволяет изучать БТ в живом

виде, а также дифференцировать ее от других трепонем как по морфологическим признакам, так и по характерным особенностям движения и позволяет поставить диагноз даже без учета данных серологических тестов. Его можно использовать при ранних манифестных формах заболевания, третичном активном сифилисе (в глубине инфильтрата), для подтверждения врожденного сифилиса (ткань пуповины, органы плода, выжатый сок плаценты, амниотическая жидкость, отделяемое слизистой оболочки носа, содержимое пузырей, поверхность папул). При необходимости микроскопия возбудителя в темном поле может быть дополнена прямой реакцией иммунофлуоресценции (РИФ): на запарафинированные мазки или биопсийный материал накладываются меченые флуоресцирующим красителем противотрепонемные АТ. Образовавшиеся комплексы АГ-АТ смотрят под люминесцентным микроскопом.

Методы молекулярной биологии - по-

лимеразная цепная реакция (ПЦР) и гибридизация нуклеиновых кислот (ГНК) - позволяют обнаружить единственную молекулу ДНК возбудителя среди миллионов других молекул.

Метод ПЦР, предложенный в 1983 году сотрудником фирмы "Cetus" (США) Kary Mullis, заключается в амплификации в пробирке определенных участков ДНК возбудителя в процессе повторяющихся температурных циклов. На каждом этапе вновь синтезированные молекулы копируются ферментом ДНК-полимеразой, благодаря чему происходит многократное удвоение специфических фрагментов ДНК.

Метод включает этапы денатурации ДНК, отжига праймеров и элонгации, или синтеза (рис.4).

Под влиянием высокой температуры реакционной смеси от 93 до 95°C двухцепочечные молекулы ДНК расплетаются с образованием двух одноцепочечных молекул. Отжиг, или присоединение праймеров происходит при температуре 60°C. Праймерами

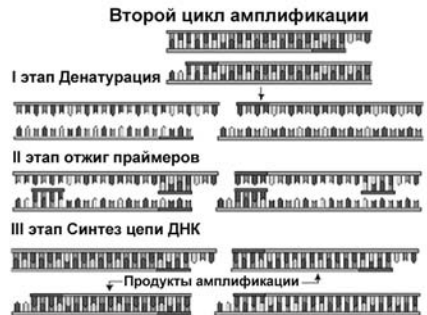
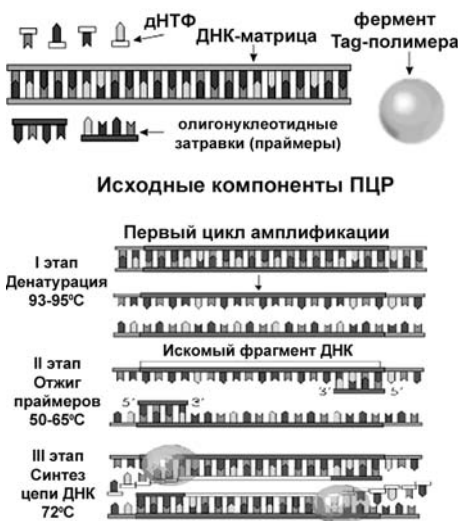


Рис.4. Этапы денатурации ДНК, отжига праймеров и элонгации

называются специфические искусственно синтезированные олигонуклеотиды (фрагменты ДНК), играющие ключевую роль в образовании продуктов амплификации. При наличии искомой ДНК-мишени праймеры отжигаются (присоединяются) к ней с двух концов в соответствии с правилом комплементарности. Ориентация праймеров обеспечивает ограничение с двух сторон (фланкирование) участка ДНК, подлежащего амплификации. Если отжиг произошел, то термостабильный фермент Таq-полимеразы, работающая при оптимуме температуры 72°C, начинает достраивание второй цепи ДНК, используя имеющиеся в реакционной смеси нуклеотиды, в результате чего количество ДНК удваивается. В дальнейшем этапы денатурации, отжига и элонгации многократно повторяются (30 и более раз); на каждом цикле количество синтезированных копий фрагмента ДНК удваивается, то есть происходит амплификация фрагментов ДНК. Наиболее распространенным способом детекции является метод электрофореза в агарозном геле, основанный на разделении молекул ДНК по молекулярному весу.

ПЦР является хорошим методом для диагностики сифилиса при небольшом количестве трепонем в исследуемом материале, хотя результаты еще можно считать предварительными. Он высоко специфичен, чувствителен, воспроизводим, универсален; при грамотном проведении и подготовке образцов - надежен. Однако, следует отметить, что метод очень чувствителен к качеству реактивов (особенно к выбору праймеров) и требует специального помещения. Следует отметить, что в

России, на данный момент нет ни одной официально зарегистрированной ПЦР тест системы и ни одного стандарта, позволяющего оценивать качество предлагаемых наборов.

Суть метода ДНК-зондирования, или гибридизации нуклеиновых кислот, близка методу ПЦР. В нем также используются искусственно синтезированные нуклеотиды, которые называют уже не праймерами, а зондами. Метод заключается в следующем: из образцов клинического материала выделяют ДНК, которую денатурируют кипячением и фиксируют на нитроцеллюлозном фильтре (вариант дот-гибридизации), после чего гибридизируют с ДНК-зондом, способным специфически связываться (гибридизоваться) с ДНК искомого возбудителя. Концы зонда метят сульфоновыми группами или биотином, против которых имеются моноклональные антитела. После окончания гибридизации фильтр проявляют иммуноферментным методом путем последовательного добавления конъюгата и субстрата. Окрашивание в соответствующих точках свидетельствует о наличии тестируемой ДНК в исследуемом материале.

6. СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА СИФИЛИСА

Нетрепонемные тесты (НТТ)

К числу наиболее известных НТТ с визуальным определением результатов реакции относятся:

- РСКк - реакция связывания компонента с кардиолипиновым АГ;
- МР, или РМП - микрореакция с плазмой и инактивированной сывороткой (или реакция микропреципитации);
- RPR - тест быстрых плазменных ре-

агинов (Rapid Plasma Reagins);

- LUES-ТЕСТ - аналог RPR (производства "Диагностические системы")

- TRUST- тест с толуидиновым красным и непрогретой сывороткой (Toluidin Red Unheated Serum Test);

- RST- тест отбора реагинов (Reagin Screen Test).

К числу НТТ с микроскопическим считыванием результатов реакции относятся:

- VDRL- Veneral Disease Research Laboratory;

- USR - тест определения активных реагинов плазмы (Unheated Serum Reagins).

Тесты с визуальным определением результатов реакции

РСКк. Первый нетрепонемный тест, опубликован в 1906 г., назван реакцией Вассермана, основан на реакции связывания комплемента Борде-Жангу.

Принцип: Образовавшийся в крови больного комплекс АГ-АТ сорбирует введенный в реакцию экзогенный комплемент. Гемолиз эритроцитов (Эр) индикаторной системы (Эр барана-гемолитическая сыворотка) при этом отсутствует. Если же в крови больного нет АТ к возбудителю, происходит гемолиз Эр барана в результате их взаимодействия с гемолитической сывороткой в присутствии свободного комплемента.

Оценка результатов: при положительном результате наблюдается задержка гемолиза различной степени, которая условно обозначается по четырех - крестовой системе:

Количественный метод Боаса позволяет установить титр АТ в сыворотках с 4 позитивностью путем ступенчатых

разведений от 1:5 до 1:320 и более. Титром считается наибольшее разведение сыворотки, в котором регистрируется положительный результат.

- 4+ полная задержка гемолиза (резко положительный результат);
- 3+ положительный;
- 2+ слабоположительный;
- + сомнительный;
- отрицательный.

Самым широко используемым в отечественной венерологии скрининговым тестом является микрореакция с плазмой и инактивированной сывороткой и реакция связывания комплемента.

Многие авторы полагают, что для массового обследования лучше всего применять 2 теста - RPR и РПГА или ИФА, так как RPR более чувствителен при первичном сифилисе, РПГА - в поздние стадии заболевания, ИФА - во все стадии заболевания.

MP (или **РМП**) с плазмой и инактивированной сывороткой.

Принцип: при добавлении к плазме или сыворотке крови больного сифилисом эмульсии кардиолипинового АГ образуется преципитат, выпадающий в виде хлопьев белого цвета. Реакция ставится в качественном и количественном варианте.

RPR проводится на пластиковых планшетах с печатанными кружочками. Сыворотка смешивается с АГ, содержащим частицы угля. Планшет вращают 8 минут; при образовании комплексов АГ-АТ частицы угля попадают в образовавшуюся сеть и коагулируют.

ЛЮИС-ТЕСТ. Действующим началом нетрепонемного флокуляционного теста является смесь 3-х высокоочищенных компонентов: кардиолипина, лецитина и холестерина, производства фирмы "Dufko" (США). АГ, используемый в этом наборе, не содержит трепонем и является модификацией классического кардиолипинового АГ, который находится во взвеси микрочастиц древесного угля, либо окрашен красителем суданом - черным для улучшения визуального учета. АГ стабилизирован добавлением холинхлорида и ЭДТА и не нуждается в ежедневном приготовлении.

Основные характеристики:

- 1) быстрота - учет реакции производится через 5-8 мин., исключена стадия предварительной подготовки АГ;
- 2) возможность количественного учета (определение титра АГ);
- 3) тест комплектуется бумажными тест - картами, что позволяет протоколировать проведенные исследования, и стандартным позитивным контролем;
- 4) продолжительный срок годности.

Набор выпускается в двух комплектах: с тест - картами и без них, последний содержит неокрашенный стабилизированный кардиолипиновый АГ в смеси с высокоочищенными лецитином и холестерином и стандартный позитивный контроль и предназначен для работы со стандартными пластиковыми планшетами для микрореакции и дозатором Флоренского.

TRUST. Стандартные частицы азокрасителя толуидинового красного добавляются к основному стабилизированному АГ. Визуализация лучше, чем в RPR.

RST. В стабилизированный АГ добав-

ляется жирорастворимый краситель судан черный.

Тесты с микроскопическим считыванием результатов

VDRL. АГ и инактивированная сыворотка смешиваются в стеклянной лунке механическим вращением. Комплексы АГ-АТ в виде коротких стержневидных структур выявляют под микроскопом.

USR. АГ стабилизирован добавлением холинхлорида и ЭДТА и не нуждается в ежедневном приготовлении. Используется непрогретая сыворотка.

Характеристики всех используемых в настоящее время нетрепонемных тестов являются сходными. Чувствительность их составляет около 70% при первичном сифилисе, 100% при вторичном, однако уровень реактивности может колебаться в зависимости от теста.

Нетрепонемные тесты часто используются в качестве отборочных. Следует учитывать, что все нетрепонемные могут давать ложноположительные реакции (ЛПР).

Благодаря простоте, стандартности и дешевизне кардиолипиновые тесты на основе микрореакции преципитации (флокуляции) во всем мире вытеснили классическую реакцию Wasserman и широко используются для скрининга сифилитической инфекции.

Трепонемные тесты

В трепонемных тестах применяется АГ трепонемного происхождения. Они используются для подтверждения результатов НТТ, распознавания ложноположительных результатов НТТ, при клиническом, эпидемиологическом и анамнестическом подозрении на сифилис, для диагностики скрытых и поздних форм заболевания, для устано-

вления ретроспективного диагноза пациента.

К числу наиболее известных ТТ относятся:

РСКт - реакция связывания комплекса с трепонемным антигеном;

РИБТ, или РИТ - реакция иммобилизации бледных трепонем, ТPI (*Treponema pallidum* immobilisation test);

РИФ - реакция иммунофлюоресценции; FTA (Flouorescent treponemal antibody) с вариантами:

РИФ-200 (FTA-200);

РИФ-абс (FTA-abs; FTA-abs double staining; FTA-abs-IgM; 19S (IgM)-FTA-abs)

РИФц

РПГА - реакция пассивной гемагглютигации; (ТРНА (*Treponema pallidum* hemagglutination assay))

ИФА - иммуноферментный анализ; EIA (Enzymeimmuno assay);

ИММУНОБЛОТИНГ; (Western Blot).

РСКт. Принцип реакции и оценка те же, что и в РСКк. Отличие: в реакции применяется ультразвученный трепонемный АГ, полученный из нескольких штаммов культуральной БТ. Реакция считается более специфичной; в России применяется в составе КСР.

РИБТ (РИТ) - предложена Нельсоном и Мейером в 1949 году. Антигеном служат живые патогенные бледные трепонемы штамма Никольс, полученные из 7 - 10 - дневного кроличьего орхита. Принцип реакции заключается в потере подвижности БТ в присутствии иммобилизинов испытуемой сыворотки и активного комплемента. Оценка результатов реакции проводится по проценту иммобилизации БТ:

до 20% - отрицательная;

21-30% - сомнительная;

31-50% - слабоположительная;

более 50% - положительная

Процент иммобилизации (%) - соотношение числа подвижных и неподвижных трепонем в опыте (активный комплемент) и контроле (неактивный комплемент) - рассчитывается так:

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

, где

А - количество подвижных трепонем в контроле;

Б - количество подвижных трепонем в опыте;

Х -% иммобилизации.

РИТ долгое время признавалась самым специфичным тестом на сифилис. Вместе с тем она не лишена недостатков: РИТ мало пригодна для диагностики ранних стадий инфекции ввиду позднего (не ранее 3-6 недель от момента заражения) появления АТ - иммобилизинов; она может давать ложноположительные результаты, в особенности у больных с аутоиммунной патологией, злокачественными заболеваниями, диабетом; по данным некоторых авторов в сыворотке крови здоровых людей есть субстанции, неспецифически иммобилизующие бледные трепонемы.

РИТ становится позитивной позднее, чем другие реакции и сохраняется дольше, нередко оставаясь положительной на всю жизнь - "серологический рубец".

РИТ - достаточно сложный, трудоемкий и дорогостоящий анализ, требующий высокой квалификации персонала и наличия вивария, в связи с чем применение данного метода в последние годы сокращается.

РИФ

РИФ предложена в 1957 году Deacon, Falcone, Harris. Антигеном в реакции служат живые патогенные БТ штамма Никольс.

Принцип непрямого метода: на предметном стекле фиксируется АГ, который обрабатывается испытуемой сывороткой. Образовавшийся комплекс АГ-АТ взаимодействует с иммунной антивидовой сывороткой, меченной флюорохромом. В случае образования комплексов АГ-АТ наблюдается свечение БТ. Оценка результатов реакции проводится по степени свечения:

- 4+ блестящее зелено-желтое свечение - резко положительный результат;
- 3+ яркое свечение - положительный результат;
- 2+ слабое свечение - слабоположительный результат;
- 1+ уровень фона - отрицательный результат;
- отсутствие свечения—отрицательный результат.

Самым чувствительным тестом на сифилис и "золотым стандартом" серодиагностики считается РИФ_{абс}. Сыворотка разводится только в 5 раз и обрабатывается сорбентом для удаления групповых АТ. Для исключения неспецифических результатов в РИФ 200 сыворотка разводится в 200 раз. При этом специфичность реакции возрастает, но чувствительность несколько падает. РИФц ставится с цельным неразведенным ликвором. Одним из зарубежных вариантов РИФ является тест с двойным окрашиванием (FTA-ABS-DS): в систему добавляется краситель, обычно - родаминовый краситель.

В последние десятилетия во всем мире активно развивалось направление серодиагностики сифилиса, назы-

ваемое IgM-серологией. Основная его задача - выявление трепонемоспецифических IgM, являющихся наиболее ранними маркерами сифилиса, что имеет огромное значение в диагностике врожденного сифилиса, так как известно, что крупные молекулы IgM через плаценту не проходят. Они проникают в организм ребенка лишь при нарушении барьерной функции плаценты или активно вырабатываются организмом ребенка при сифилисе, в связи с чем их обнаружение у ребенка является свидетельством его инфицирования. В рамках данного направления были разработаны следующие виды реакций, основанные на технологии РИФ:

-FTA-ABS-IgM - во второй фазе реакции используются меченые флюоресцеином АТ к IgM человека;

-19S (IgM) FTA-ABS - применяется фракционирование сыворотки и с фракцией 19S (IgM) ставится РИФ_{абс};

-отечественный вариант РИФ_{абс}-IgM (Санкт-Петербург, Старченко, Данилов, 1995): к сыворотке добавляется сорбент, удаляющий IgG-АТ, а с оставшимися IgM-АТ ставится РИФ_{абс}.

РИФ до сих пор считается одним из лучших тестов на сифилис. Она достаточно альтернативна и относительно (в сравнении с РИТ) проста в постановке, чувствительна на всех стадиях инфекции, начиная с периода инкубации (варианты РИФ-IgM) 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. Вместе с тем она, также как

и РИТ, имеет ряд недостатков: для ее постановки требуется живая БТ; кроме того, РИФ может давать ложноположительные результаты, в особенности у больных с аутоиммунной патологией, лепрой, трепонематозами, что требует осторожности ее трактовки у данных больных. Несмотря на высокую диагностическую ценность, использование РИФ ограничивает длительность, трудность автоматизации теста, значительная стоимость исследований, необходимость высокой квалификации персонала.

РПГА

Принцип: В реакции используются эритроциты (Эр) животных, например, барана, индюка, цыпленка, покрытые АГ из патогенных трепонем. Суспензия Эр разводится сывороткой больных. Если в сыворотке содержатся противотрепонемные АТ, то в планшете для микротитрования наблюдается агглютинация (А), то есть специфическое склеивание, Эр. В диагностике сифилиса применяется непрямая, или пассивная агглютинация. При этом АГ соединен с носителем (Эр), выполняющим исключительно индикаторную функцию в отличие от прямой агглютинации, когда АГ является структурным компонентом поверхностной мембраны частицы (бактериальной, эритроцитарной, паразитарной). При непрямой агглютинации АГ соединяется с носителем, выполняющим индикаторную функцию. Причиной А служит "сшивка" поверхностных молекул АГ молекулами Ig (теория решетки). Для реализации А имеет значение количество и расположение мембранных рецепторов. А способствует расположение рецепторов в виде скоплений. А может не произойти,

если каждый АГ-рецептор из-за избытка АТ связан с одной молекулой агглютинина (феномен прозоны). Положительная реакция может наступить при большем разведении раствора агглютинина. Феномен прозоны может наблюдаться и при других серологических реакциях.

В случае наступления А образовавшиеся комплексы АГ-АТ препятствуют оседанию Эр на дно лунки, в связи с чем Эр располагаются на ее поверхности в виде "зонтика". При отрицательном результате они свободно соскальзывают вниз в виде "пуговки".

Оценка результатов:

- 4+ положительная РПГА - Эр равномерно выстилают всю поверхность лунки (в виде зонтика);
- 3+ положительная РПГА - Эр выстилают всю поверхность лунки, но часть соскальзывает к центру;
- 2+ слабоположительная РПГА - Эр образуют пленку на небольшом участке;
- 1+ отрицательная РПГА - на дне лунки Эр образуют рыхлый осадок;
- отрицательная РПГА - Эр ровным колечком или пуговкой лежат на самом дне лунки.

Возможна также количественная оценка результатов реакции.

РПГА является ценным диагностическим тестом на всех (но в особенности - поздних) стадиях сифилиса; может быть использована как для скрининга, так и для подтверждения заболевания, а также при контроле за качеством терапии. Чувствительность реакции у больных сифилисом достигает 99%. Преимуществами РПГА в сравнении с классическими трепонемными тестами (РИТ, РИФ) являются: использование промышленных тест-систем, отсутствие надобности в живой патогенной

БТ, возможность автоматизации реакции. Многие авторы чувствительность и специфичность РПГА считают аналогичными таковым РИТ и РИФ, другие отмечают ее меньшую чувствительность по сравнению с РИФ при ранних формах сифилиса.

Тесты гемагглютинации по сравнению с РИФ менее чувствительны при первичном сифилисе, они регистрируют положительные результаты позже появления реакинов, однако они дают меньшее количество ЛПР, обладают 100% чувствительностью при вторичном и латентном сифилисе, при средней специфичности от 97 до 99%. Ложноположительные результаты могут наблюдаться при инфекционном мононуклеозе, коллагенозах, лепре. Кроме того, могут наблюдаться гетерофильные реакции с несенсибилизированными эритроцитами.

7. ИММУОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ (ИФА)

Широкое распространение в серодиагностике сифилиса ИФА получил после работ J.Veldkamp и A.Visser (1975). В России этот метод с применением отечественных материалов и ингредиентов был разработан и внедрен В.Н.Бедновой и А.В.Котровским (1982). По механизму реакции, чувствительности и специфичности ИФА близок РИФ. Отмечено участие в указанных реакциях одних и тех же АТ, близкий уровень титров, высокая частота совпадений результатов.

В сифилидологической практике используется в основном не прямой вариант ИФА. Принцип реакции состоит в следующем: на твердофазный носитель с присоединенным к нему АГ по-

мещается сыворотка больного. При наличии в ней АТ на поверхности носителя образуется комплекс АГ-АТ. Для "проявления" результатов реакции используются антивидовые АТ к Ig человека, конъюгированные с ферментными маркерами. В случае положительной реакции присоединившийся к комплексу АГ-АТ фермент разлагает добавленный в систему субстрат, в результате чего развивается цветное окрашивание разной интенсивности.

Помимо классического непрямого ИФА, в современных тест-системах наиболее часто используются принципы "ловушки" для АТ и определения суммарных АТ. В первом случае выявляются АТ определенного класса: М, G, А; лунки планшетов сенсибилизируются аффинно очищенными АТ определенного класса против Ig человека. При этом из сыворотки вылавливаются АТ этого класса, а выявление трепонемоспецифических АТ осуществляется путем их соединения с конъюгатом, представляющим соединение трепонемного АГ с ферментом. Во втором случае из сыворотки вылавливаются все трепонемоспецифические АТ за счет их одновременного связывания с трепонемным АГ, сенсибилизирующим плашку, и с трепонемным АГ, входящим в состав конъюгата.

Помимо вышеперечисленных, существуют также другие варианты ИФА, в том числе допускающие прямое выявление возбудителя в крови (прямой ИФА), дот-ИФА с постановкой реакции на полосках нитроцеллюлозы, ИФА с капиллярной кровью, а также ИММУНОБЛОТИНГ, или Western Blot, с одновременным выявлением АТ к различ-

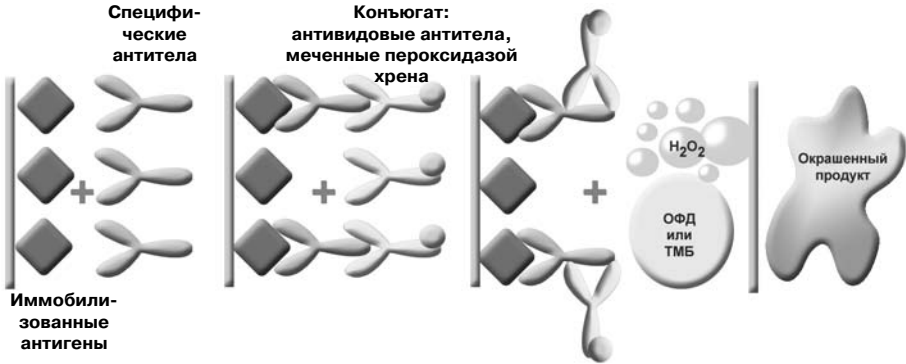


Рис.5. Схема ИФА

ным компонентам возбудителя.

Помимо визуальной, возможна инструментальная оценка результатов - в величине цифровых показателей оптической плотности, получаемых на специальных ридерах (типа Мультискан) при определенной длине волны (для диагностики сифилиса это, как правило, 492 нм и 620 нм, как референс).

Результат, дающий основание судить о наличии (+), либо отсутствии (-) АТ к возбудителю сифилиса, называется качественным. Ответ, позволяющий получить информацию об относительном количестве АТ, определяемых методом ИФА, называется полуколичественным и определяется путем определения титра АТ, либо путем определения оптической плотности (ОП) образцов с расчетом коэффициента позитивности. Оба метода являются приблизительными, так как не учитываются факторы различной аффинности антител и различного антигенного спектра в индивидуальном образце, однако они намного точнее способов определения титров антител в реакциях с визуальным учетом (РСК, РПГА).

Для определения титров противотрепонемных АТ производят последовательные двукратные разведения испытуемой сыворотки крови, давшей положительный результат. За титр принимают наибольшее разведение сыворотки, дающее позитивный ответ. Повторное исследование сыворотки крови должно осуществляться в той же тест-системе, что и первоначальное. Достоверным является 4-х кратное изменение титра.

Коэффициент позитивности (КП) рассчитывается путем деления ОП испытуемого образца на ОП критическую. Приблизительное значение титра определяется по таблице в инструкции предприятия - изготовителя. Метод менее точен, чем непосредственное определение титра и дает адекватные результаты только в определенном интервале оптических плотностей.

"Серая зона" - это интервал, лежащий в пределах ОП критическая 10%-20% (величина определяется предприятием-производителем), а в единицах ОП - это интервал от 0,8-0,9 до 1,1-1,2 от значения ОП критической. Значения ОП, расположенные выше

Таблица 2
Чувствительность и специфичность различных методов диагностики сифилиса (данные ЦКВИ, 2000)

№	Метод	Чувствительность	Специфичность
1.	Темнопрлыная микроскопия	70%	100%
2.	ПЦР	70-90%	99%
3.	МР (РМП) и ее варианты	70%	80%
4.	РСК	80%	98%
5.	РИФ	84-99%	97-99%
6.	РИТ	79-94%	99%
7.	ИФА	98-100%	96-100%
8.	РПГА	93-98%	98%

этой зоны, расцениваются как положительные; ниже - как отрицательные. Если сомнительный результат получен при диагностическом обследовании пациента, анализ повторяется через 3 - 7 дней с новой порцией крови.

ИФА относится к числу наиболее современных и перспективных методов серодиагностики сифилиса. Это определяется как его высокой чувствительностью (95 - 99%) и специфичностью (98 - 100%) при сифилисе, так и простотой, доступностью, воспроизводимостью, возможностью использования как диагностического (трепонемный тест), так и отборочного метода, а также в качестве критерия излеченности заболевания и референс- теста при снятии больных с учета.

Преимуществами ИФА перед другими диагностическими тестами, применяемыми в серодиагностике сифилиса, являются: возможность автоматизации, меньшая трудоемкость, сокращение времени постановки реакции, возможность использования вместо

патогенных и культуральных БТ рекомбинантные антигены - аналоги бактериальных, что облегчает получение АГ и снижает стоимость реакции. Немаловажным является возможность определения специфических IgG и IgM, что позволяет провести более точную диагностику стадии заболевания.

8. ДИАГНОСТИКА СИФИЛИСА

Заболевание может быть диагностировано начиная со 2-й - 4-й недели после заражения путем обнаружения наиболее ранних маркеров трепонемной инфекции - трепонемоспецифических IgM -АТ, выявляемых одним из методов IgM- серологии (IgM-РИФаbc, IgM-ИФА, 19S-IgM-FTAabs, IgM-Western blot). Данные о результатах использования ПЦР на этой стадии заболевания недостаточны.

При первых клинических признаках сифилиса и появлении твердого шанкра диагноз может быть подтвержден позитивными результатами темнопольной микроскопии и ПЦР из райц-серума сифилидов и пунктатов регионарных лимфоузлов, а также РИФаbc - наиболее ранней и чувствительной трепонемной реакции, и методом ИФА, выявляющим суммарные (IgM - IgG) АТ, иногда - РПГА и РСК с трепонемным АГ.

Спустя 2 - 3 недели после появления твердого шанкра или 5 - 6 недель от момента инфицирования, то есть на стадии первичного (серопозитивного по старой классификации) сифилиса у 60 - 87% больных наступает позитивация так называемых нетрепонемных тестов, выявляющих АТ к нетрепонемному АГ, в качестве которого выступает, как правило, кардиолипин-лецитин-холестериновый комплекс. Это - РСК с

кардиолипиновым АГ, или собственно реакция Вассермана, микрореакция преципитации и ее отечественные (LU-ES-тест) и зарубежные аналоги (RPR, VDRL, TRUST и другие). На этой же стадии инфекции, как правило, положительны РИФ, ИФА, РПГА (в 80 - 88% случаев), у меньшего числа пациентов - РИТ (30 - 50%). Диагноз может быть подтвержден положительными результатами темнопольной микроскопии и ПЦР при взятии материала из твердого шанкра и регионарных лимфоузлов.

В период разгара инфекции, во вторичной стадии заболевания почти у всех больных позитивными являются как нетрепонеменные, так и трепонеменные тесты, в том числе одна из наиболее "поздних" реакций, регистрирующая появление АТ - иммубилизинов - РИТ, а также РПГА. Высокая степень позитивности этих реакций в скрытом и далее - в третичном периоде инфекции, как правило, сохраняется, что нередко слу-

жит основанием для ретроспективного диагноза при бессимптомном течении сифилитической инфекции. Число же позитивных результатов НТТ, напротив, падает с прогрессированием латентности и переходом в поздний сифилис (до 50 - 70%). При этом первыми спонтанно, либо под влиянием лечения элиминируются наиболее лабильные АТ, определяемые в МР (РМП) и РСКк, затем - в РСКт, а также IgM-АТ, служащие индикатором активности инфекционного процесса. Длительная серопозитивность, в особенности в отношении трепонемоспецифических IgM - АТ, с высокой вероятностью указывает на сохранение очагов персистентной инфекции. Положительные же результаты таких тестов, как РИТ, РИФ, ИФА (IgG, либо суммарные АТ), РПГА могут сохраняться длительно, иногда всю оставшуюся жизнь, свидетельствуя о перенесенном в прошлом сифилисе.

Подтверждению диагноза во вторич-

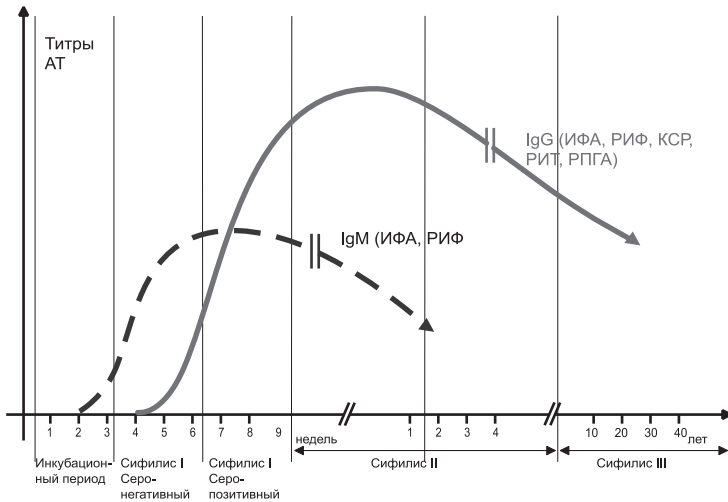


Рис.6. Динамика трепонемных тестов на сифилис

ной стадии инфекции способствуют положительные результаты темнопольной микроскопии и ПЦР отделяемого сифилидов, а также ПЦР в цельной крови, пунктатах лимфоузлов, спинномозговой жидкости и клетках фагоцитарной системы.

На поздних стадиях сифилиса вероятность обнаружения БТ и продуктов ее распада методом ПЦР падает, тем не менее, источником ее обнаружения могут служить биоптаты внутренних органов (печень, желудок), содержащее гуммозных инфильтратов и СМЖ.

При диагностировании раннего врожденного сифилиса решающее значение имеют результаты обнаружения у ребенка трепонемоспецифических IgM - АТ, которые ввиду избирательной проницаемости плаценты не обнаруживаются у детей при отсутствии сифилиса. Выявление IgG-АТ имеет при этом относительное значение и может свидетельствовать о наличии инфекции, если титры этих АТ, равно как и других, определяемых в нетрепонемных и трепонемных тестах, выше, чем у матери, и не имеют тенденции к снижению в течение 4 - 6 месяцев наблюдения. Существенную помощь в диагностике в данном случае могут оказать положительные результаты темнопольной микроскопии и ПЦР отделяемого слизистой оболочки носа ребенка, содержимого пузырей, поверхности папул при явных клинических стигмах врожденного сифилиса и ткани пуповины, сока плаценты, амниотической жидкости - при их отсутствии.

Диагностическими лабораторными признаками позднего врожденного сифилиса являются резко положительные результаты трепонемных тестов

при отрицательных, слабоположительных или положительных значениях нетрепонемных.

При диагностике сифилиса нередко возникают проблемы с трактовкой получаемых данных. Это прежде всего связано с ложноположительными результатами, которые нередко наблюдаются при скрининге крови с помощью НТТ и могут обуславливаться техническими погрешностями при постановке реакций, наличием в крови АТ к ревматоидному фактору, перекрестно реагирующими АТ у так называемых "кросс-реакторов" - больных с аутоиммунной патологией, антифосфолипидным синдромом, пожилых людей, беременных женщин, лиц с боррелиозом и лептоспирозами, пациентов с обширной соматической патологией, нарушениями обмена липидов, иммунодефицитами различной этиологии. Подтверждающими тестами при этом служат трепонемные реакции, определяющие АТ к разного рода трепонемным АГ, в частности, методики ИФА, основанного на использовании в качестве иммуносорбентов рекомбинантных белков и синтетических пептидов БТ.

Наряду с ложноположительными возможны и ложноотрицательные результаты серореакций на сифилис: в серонегативной фазе первичного сифилиса, при избытке антител (феномен прозоны), либо выраженной иммунной недостаточности; у больных вторичным сифилисом с симптомами злокачественности; при приеме иммунодепрессантов, в некоторых случаях присоединения ВИЧ-инфекции.

26.03.2001г. опубликован новый Приказ МЗ РФ №87 по серодиагностике сифилиса. Впервые в диагностику си-

филиса вводится иммуноферментный анализ (ИФА). Благодаря высокой чувствительности, специфичности и воспроизводимости, он является практически универсальным методом обследования и может быть применен: при профилактическом обследовании населения на сифилис, при профилактическом обследовании на сифилис больных глазных, психоневрологических, кардиологических стационаров и беременных, при обследовании доноров, для диагностики всех форм сифилиса и распознавания ложноположительных результатов.

Учитывая сложность иммунного ответа при сифилисе, по-прежнему необходимой является комплексная диагностика, предусматривающая применение как минимум двух методов: нетрепонемного и трепонемного. Одним из вариантов адекватной замены общепринятого КСР является сочетание ИФА и РМП. Несомненным преимуществом сочетания ИФА и РМП является заложенная в нем возможность скрининга и подтверждения диагноза, а также количественного анализа антител, что особенно важно при контроле за эффективностью терапии.

Тест-система "ИФА-АНТИ-ЛЮИС" была разработана в НПО "Диагностические системы" в 1995 году, зарегистрирована в МЗ РФ (ФС № 42-380-99) и рекомендована к применению в медицинской практике (Приказ МЗ РФ №87 от 26.03.2001 г.)

С 1999 года НПО "Диагностические системы" выпускает тест-систему по обнаружению ассоциированных с сифилисом реакиновых антител "ЛЮИС-ТЕСТ" (ВФС № 42-3443-99) - аналог РМП.

Системы "ИФА-АНТИ-ЛЮИС" и "ЛЮИС-ТЕСТ" прошли широкую апробацию в различных регионах России, стран СНГ и за рубежом, получив высокую оценку практиков и официальных контролирующих органов.

На стадии утверждения находятся разработанные в НПО "Диагностические системы" иммуноферментные тест-системы, выявляющие антитела классов G, M и G+ M к *T. pallidum*.

9. ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ СИФИЛИСА, ВЫПУСКАЕМЫЕ ООО «НПО «ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ».

Тест-система, выявляющая антитела IgG - "ИФА-АНТИ-ЛЮИС- G".

Тест-система, выявляющая антитела IgM и IgG - "ИФА-АНТИ-ЛЮИС- GM".

Тест-система, выявляющая антитела IgM - "ИФА-АНТИ-ЛЮИС- M".

Тест-система, выявляющая ассоциированные с сифилисом реакиновые антитела - "ЛЮИС - ТЕСТ".

Тест-системы "ИФА-АНТИ-ЛЮИС"

Действующим началом наших иммуноферментных тест-систем являются рекомбинантные белки (антигены), аналоги трансмембранных белков *T. pallidum* с молекулярной массой 41, 47 и 17 кДа, сорбированные на твердую фазу - иммуносорбент, и конъюгат, представляющий собой моноклональные мышинные антитела к иммуноглобулинам человека, конъюгированные с пероксидазой хрена.

Реакция осуществляется по следующей схеме.

На первом этапе осуществляется инкубация антигенов, иммобилизованных в лунках полистиролового планшета, и

антител, содержащихся в сыворотке крови. Для этого в лунки иммуносорбента вносятся сыворотки крови, разведенные в блок-растворе. При наличии в сыворотках противотрепонемных антител образуются комплексы "антиген-антитело". После удаления не связанных иммуноглобулинов в лунки планшета вносится раствор конъюгата, и к имеющимся комплексам "антиген-антитело" присоединяются антитела, меченные ферментом (2 этап). После удаления не связавшегося конъюгата, в ходе инкубации с раствором субстрата (перекись водорода с хромогеном - тетраметилбензидином (ТМБ) происходит взаимодействие фермента с субстратом, в результате чего развивается цветная реакция, интенсивность которой зависит от количества связанных сывороточных антител. Реакция останавливается добавлением стоп-реагента (3 этап). Результат оценивается спектрофотометрически.

Для оценки чувствительности и специфичности иммуноферментных тест-систем было исследовано 742 образца сывороток крови больных сифилисом и 670 образцов сывороток крови здоровых людей.

Всего было проанализировано 103 образца от больных первичным сифилисом (100 сывороток содержали антитела класса М, 97 сывороток - G и М антитела и 3 образца только IgG), 412 сывороток больных сифилисом вторичным (412 содержали только IgG, а 200 содержали также IgM), 227 сывороток больных сифилисом латентным (227 - IgG и 46 - IgM и IgG) (Таб 3).

Средняя чувствительность для системы "ИФА-АНТИ-ЛЮИС-Г" составила 98,8%, для системы "ИФА-АНТИ-ЛЮ-

ИС-GM" - 99,4%. Чувствительность тест-системы "ИФА-АНТИ-ЛЮИС-М" при тестировании сывороток больных сифилисом первичным составила 97%.

Таблица 3.

Чувствительность и специфичность тест-систем "ИФА-АНТИ-ЛЮИС"

Диагноз	"ИФА-АНТИ-ЛЮИС"		
	IgM	IgG	IgG+IgM
Сифилис первичный	97%	94%	98%
Сифилис вторичный	49%	100%	100%
Сифилис латентный	20%	100%	100%
Здоровые доноры	99,4%	99,7%	99,6%

Снижение чувствительности для остальных стадий сифилиса связано с естественным падением титра антител класса М в течении первого года от начала заболевания. Специфичность тест-систем: "ИФА-АНТИ-ЛЮИС-Г" - 99,7%, "ИФА-АНТИ-ЛЮИС-GM" - 99,6%, "ИФА-АНТИ-ЛЮИС-М" - 99,4%.

Для оценки диагностической эффективности тест-систем "ИФА-АНТИ-ЛЮИС-Г", "ИФА-АНТИ-ЛЮИС-GM", "ИФА-АНТИ-ЛЮИС-М" проводилось их сравнительная оценка с общепринятым КСР у больных сифилисом. Сыворотки больных были любезно предоставлены Нижегородским научно-исследовательским кожно-венерологическим институтом Минздрава РФ и Сорновским КВД. Данные исследований представлены в таблице 4.

Всего исследовано 444 сыворотки больных сифилисом и 46 сывороток пациентов, прошедших курс лечения и находящихся на контроле.

Группа из 83-х пациентов со стадией сифилис первичный объединяла больных первичным серопозитивным и се-

Таблица 4

Сравнение чувствительности тест-систем "ИФА-АНТИ-ЛЮИС" и КСР при различных формах сифилиса

Группа обследованных	РСКкард %	РСКтреп %	РМП %	ИФА- М %	ИФА- G %	ИФА-GM %
Сифилис Первичный (n=83)	79	84	76	94	90	96
Сифилис вторичный свежий (n=89)	99	99	100	98	100	100
Сифилис вторичный рецидивный (n=153)	97	99	100	72	100	100
Сифилис скрытый (n=110)	93	94	99	37	100	100
Сифилис после лечения (n=46)	14	27	18	0	37	37
Нейросифилис (n=10)	90	90	100	10	100	100

ронегативным сифилисом. У трех из них иммуноферментные реакции и данные КСР были отрицательными, и диагноз ставился на основании обнаружения *T.pallidum* методом темнопольной микроскопии в отделяемом твердого шанкра. Антитела только класса М были обнаружены у 5-и пациентов, у 2-х больных антитела только класса G и еще у 3-х - суммарные антитела классов М и G при отрицательных реакциях КСР. В общей сложности трепонемспецифические IgM антитела определялись у 94% больных первичным сифилисом, что позволило осуществлять диагностику ранних стадий заболевания с помощью тест-систем "ИФА-АНТИ-ЛЮИС-М" и "ИФА-АНТИ-ЛЮИС-GM".

Все сыворотки больных вторичным сифилисом содержали антитела IgG. Антитела класса М были найдены у 98% больных вторичным свежим и только у 72% больных вторичным рецидивным сифилисом. Это подтверждает данные литературы о естественном снижении IgM - ответа в течении 6 - 12 месяцев

после инфицирования *T.pallidum* при увеличении синтеза IgG.(А.А.Гражданцева, 1998). После проведения успешной терапии уровень антител класса М снижается в течении месяца в 2-4 раза. Обнаружение специфических IgM у больных с серологической резистентностью после законченного лечения особенно ценно, так как позволяет определить активность инфекционного процесса и обосновать тактику дальнейшего ведения пациентов.

В 41 из 110 сывороток крови пациентов с диагнозом сифилис скрытый найдены IgM, что позволяет предположить у них ранние формы сифилиса. Деление скрытого сифилиса на ранний и поздний имеет существенное значение, поскольку при раннем скрытом сифилисе проводят те же противоэпидемические мероприятия, что и при разных формах заболевания.

Полученные результаты свидетельствуют о высокой чувствительности тест систем "ИФА-АНТИ-ЛЮИС-G", "ИФА-АНТИ-ЛЮИС-М" и "ИФА-АНТИ-ЛЮИС-GM" в диагностике как ранних

(первичный, вторичный свежий), так и более поздних (вторичный, рецидивный, скрытый) стадий сифилиса.

Тест-система "ИФА-АНТИ-ЛЮИС-Г" прошла испытания в Институте Венерологии Медицинской академии в Варшаве. В качестве систем сравнения были использованы РПГА (фирмы "Behring") и кардиолипиновый тест VDRL (фирмы "Biomed", Краков, Польша). Всего было исследовано 360 образцов сывороток крови: 129 образцов сыворотки крови больных сифилисом, 122 образца больных сифилисом после лечения, 51 образец сыворотки крови больных другими заболеваниями, передающимися половым путем, 58 образцов сыворотки крови лиц, обследующихся профилактически. Данные испытаний представлены в таблице 5.

По данным Варшавского Института Венерологии Медицинской академии, система "ИФА-АНТИ-ЛЮИС-Г" раньше, чем РПГА, дает положительные результаты при сифилисе, но обладает меньшей специфичностью. По сравнению с VDRL-тестом ИФА и РПГА обла-

дают более высокой чувствительностью и специфичностью, но могут давать позитивные результаты в течение многих лет после успешного лечения сифилиса. Немаловажное значение при определении тактики ведения пациентов имеет дифференциальная диагностика рецидива и реинфекции. При исследовании сывороток крови 6 больных с диагнозом реинфекция сифилиса у 2-х пациентов были обнаружены антитела классов IgG и IgM, а у 4-х - только антитела класса IgG. Наличие антител IgM и отмеченное при наблюдении больных нарастание титра IgG подтверждало факт повторного заражения сифилисом. Следует учесть, что для подтверждения реинфекции требуются, кроме того, дополнительные данные, свидетельствующие о том, что первый диагноз сифилиса был достоверным, больной получил полноценное лечение и серологические реакции в крови и спинномозговой жидкости окончательно негативировались.

Необходимость разработанного нами теста для определения антисифилитических антител класса М трудно переоценить, имея в виду, что дифференцированное определение IgM имеет значение не только в диагностике врожденного сифилиса, но и нейросифилиса, так как IgM АТ не проходят через гемозенцефалический барьер, и их появление в СМЖ позволяет диагностировать нейросифилис.

Известно, что большая сифилисом женщина во время беременности может передать плоду бледную трепонему через плаценту. Постановке диагноза врожденного сифилиса во многом помогают серологические реакции. Пассивная передача от матери ребенку возможна только для низкомолекулярных IgG, а крупные молекулы IgM проникают в организм ребенка лишь при нарушении барьерной функции плаценты, либо активно вырабатываются

Таблица 5.

Сравнение результатов, полученных в РПГА и ИФА

Результаты	РПГА	ИФА
Положительные	51,4%	52,5%
Отрицательные	48,6%	47,5%
Всего	360	360

дают более высокой чувствительностью и специфичностью, но могут давать позитивные результаты в течение многих лет после успешного лечения сифилиса.

Немаловажное значение при определении тактики ведения пациентов

организмом ребенка при заболевании сифилисом. Это дает основание для использования в диагностике раннего врожденного сифилиса, как дифференцирующего фактора, иммуноферментной реакции, выявляющей антитела IgM.

Исследовались сыворотки крови 47 новорожденных детей (от 14 дней до 1 года), рожденных от матерей, болевших сифилисом. У 2-х детей обнаруживались антитела IgG и IgM (именно этим детям на основе клинической картины и серологических данных поставлен диагноз врожденного сифилиса). У 10-ти детей были получены отрицательные результаты в ИФА. Сыворотки крови 25-ти детей имели только антитела IgG в разных титрах.

Необходимо учитывать, что в связи с особенностями реактивности организма новорожденного (повышенная лабильность белков крови, отсутствие комплемента и естественного гемолизина, недостаточное содержание в сыворотке антител) в первые дни жизни ребенка серологические реакции могут быть отрицательными, несмотря на наличие сифилиса. Серологические реакции могут быть также отрицательными в первые 4-12 недель жизни новорожденного, мать которого инфицировалась в поздние сроки беременности.

Для оценки частоты появления ЛПР в серологических тестах была исследована группа лиц с различными заболеваниями, передаваемыми половым путем, а также группа беременных с положительными результатами КСР (таблица 6).

При получении сомнительного результата рекомендуется взять у паци-

ента кровь и повторить анализ через 7-10 дней. Нарастание титра антител говорит о наличии сифилитической инфекции, а сохранение титра антител на том же уровне может быть связано с тем, что в анамнезе был сифилис или это ЛПР.

Таблица 6.

**Ложноположительные реакции
в тест-системах
"ИФА-АНТИ-ЛЮИС"**

Группа обследованных	Число ложноположительных результатов	
	"ИФА-АНТИ-ЛЮИС-М"	"ИФА-АНТИ-ЛЮИС-Г"
Герпес (n=42)	0	4
Трихомониаз (n=7)	0	1
Гонорея (n=9)	0	2
Уреаплазмоз (n=1)	0	0
Дерматит (n=2)	0	3
Чесотка (n=2)	0	0
Пузырчатка (n=6)	0	0
Нейродермит (n=2)	0	0
Лимфоаденит (n=1)	0	0
Красная волчанка (n=8)	0	0
Псориаз (n=51)	0	3
Онкозаболевания (n=72)	1	2

Для оценки специфичности систем "ИФА-АНТИ-ЛЮИС-М" и "ИФА-АНТИ-ЛЮИС-Г" были проанализированы сыворотки 310 человек с направлением "обследование на сифилис" и последующим исключением сифилитической инфекции. Число ложноположительных результатов составило: 9 в РСК кардиолипиновом (2,9%), 15 в РСК трепонемном (4,8%), 14 в реакции микро-

преципитации (4,5%), 2 в системе "ИФА-АНТИ-ЛЮИС-М" (0,6%) и 5 в системе "ИФА-АНТИ-ЛЮИС-Г" (1,6%). Полученные результаты говорят о высокой специфичности иммуноферментных тест-систем.

В процессе лечения и после его окончания врач систематически наблюдает за динамикой серологических реакций как за одним из наиболее убедительных показателей эффективности лечения. Скорость негативации серологических реакций зависит от стадии сифилиса, проводимого лечения, реактивности организма больного. Негативация иммуноферментных реакций по сравнению с КСР происходит значительно медленнее. По нашим данным, до 80% больных, лечившихся по поводу заразных форм сифилиса, через 3 - 4 года имели еще положительные значения в "ИФА-АНТИ-ЛЮИС-Г" и "ИФА-АНТИ-ЛЮИС-ГМ". При лечении больных сифилисом первичным и вторичным ранним, когда оптическая плотность, определяемая в тест-системах "ИФА-АНТИ-ЛЮИС-Г" меньше 1,0, негативация значений IgM и IgG происходит в течение нескольких недель.

При наблюдении за динамикой инфекционного процесса и оценке эффективности противосифилитического лечения больных сифилисом имеет значение количественное определение уровня специфических антител в ИФА. Наиболее объективным способом оценки результатов при этом является определение титра антител. В ИФА-тест-системах производства НПО "Диагностические системы" определение титра производится следующим образом.

Для титрования образца в лунку верхнего ряда иммуносорбента (ряд А), от-

мытого в соответствии с инструкцией по применению, вносят 180 мкл блок-раствора. В остальные лунки вертикального ряда иммуносорбента вносят по 100 мкл блок-раствора. Затем в лунку ряда А вносят 20 мкл образца сыворотки крови, тщательно перемешивают пипетированием и переносят 100 мкл в лунку второго ряда (ряд В), вновь тщательно перемешивают и переносят 100 мкл в лунку ряда С и т.д. до 8-го ряда. Из лунки 8-го ряда 100 мкл раствора после перемешивания отбирается и сливается в дезинфицирующий раствор. Таким образом, в вертикальном ряду получают последовательные двукратные разведения образца от 1:10 до 1:1280. Далее все операции проводятся в соответствии с Инструкцией по применению. За титр антител к *Treponema pallidum* принимают максимальное разведение образца, при котором регистрируется положительный результат (ОП образца выше ОП критического).

В тест-системах "ИФА-АНТИ-ЛЮИС" возможно определение титра антител по формуле.

Сыворотку, в которой необходимо определить титр антител, следует развести в 100 раз. Для этого в две лунки стрипа вносят по 90 мкл блок-раствора. Затем в первую лунку вносят 10 мкл исследуемого образца сыворотки (разведение 1:10) и тщательно перемешивают пипетированием. Отбирают из лунки 10 мкл разведенной сыворотки и переносят во вторую лунку (разведение 1:100). Далее все операции проводятся в соответствии с инструкцией по применению.

Коэффициент позитивности (КП) вычисляется по формуле:

$$КП = \frac{ОПобр. (1:100)}{ОПкрит.}$$

Титр антител (ТА) определяется по формуле: $TA = A * КП2 + B * КП$,

где А и В - коэффициенты, определяемые методом статистической обработки результатов ИФА на предприятии-изготовителе, величины которых приведены в рабочей инструкции и паспорте на препарат.

Для удобства сравнения титров антител, определяемых при вертикальной разлитровке по стригу и титра антител, определяемого по формуле, последний можно перевести в титры, кратные двум, воспользовавшись таблицей 7.

Нами были протестированы парные образцы сывороток крови 9-ти больных (шесть больных сифилисом вторичным рецидивным и три больных сифилисом скрытым). Через 3 недели от начала лечения, при одновременной постановке парных сывороток на одном иммуносорбенте отмечено снижение титра антител в 2 раза.

Таблица 7.

Определение титра антител, кратного двум

Титр, определенный по формуле	Титр, кратный двум
До 15,0	10
15,1- 30,0	20
30,1-60	40
60,1-120	80
120,1-240	160
240,1-480	320
480,1-960	640
960,1-1920	1280
Выше 1920,1	Выше 1280

При исследовании сывороток в динамике на разных иммуносорбентах (особенно в тест-системах от разных серий) достоверным нужно считать снижение титра не менее чем в 4 раза.

Необходимо учитывать, что титр антител одного и того же образца крови в тест-системах разных производителей может быть различным. Поэтому исследование сыворотки крови одного больного в динамике должно проводиться с использованием аналогичных тестов одного производителя.

Тест-система "ЛЮИС-ТЕСТ"

Тест-система "ЛЮИС-ТЕСТ", в отличие от наборов для РМП, содержит стандартизованный антиген с уже добавленными холинохлоридом и консервантами, что исключает стадию его предварительного приготовления. Применение окрашенного антигена облегчает визуальную оценку результатов реакции. Простота и быстрота выполнения анализа (8-10 минут) наряду с высокой чувствительностью делают тест-систему "ЛЮИС-ТЕСТ" очень удобной для массовых исследований.

Для оценки чувствительности и специфичности системы "ЛЮИС-ТЕСТ" проводилось сравнение с РМП (Харьков). Данные представлены в таблице 8.

Результаты исследований показали, что системы "ЛЮИС-ТЕСТ" и РМП имеют близкую чувствительность (80% и 76% при сифилисе первичном, 100% при сифилисе вторичном, 89% и 94% при сифилисе скрытом) и специфичность (100%). "ЛЮИС-ТЕСТ", как и РМП может использоваться в диагностике сифилиса в качестве отборочного теста и для контроля за эффективностью лечения.

10. ОБЩИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ ТЕСТ-СИ- СТЕМ, СОБЛЮДЕНИЕ КОТОРЫХ ПОВЫШАЕТ ДОСТОВЕРНОСТЬ АНАЛИЗА

Перед началом работы с иммуноферментными тест-системами тщательно изучить инструкции по применению.

Таблица 8.

Сравнение чувствительности и специфичности "ЛЮИС-ТЕСТА" и РМП

Группа обследованных	Число положительных результатов	
	"ЛЮИС- ТЕСТ"	РМП
Сифилис первичный (n=25)	20	19
Сифилис вторичный свежий (n=54)	54	54
Сифилис вторичный ре- цидивный (n=35)	35	35
Сифилис скрытый (n=18)	16	17
Контрольная группа (n=60)	0	0

Строго выполнять все рекомендации, изложенные в инструкции.

Сроки и условия хранения наборов

Качественная работа диагностических наборов гарантируется производителем только в рамках указанного срока годности и при соблюдении требуемых условий хранения. Иногда срок годности наборов может быть продлен производителем по просьбе потребителя. Решение принимается на основании контрольной проверки наборов данной серии в ОКК предприятия-производителя и должно быть подтверждено письменным предписанием.

Сроки и условия хранения образцов

Для исключения ложных результатов исследуемые образцы необходимо отбирать и хранить в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Образцы сыворотки (плазмы) крови, содержащие осадок и агрегаты, необходимо осветлять центрифугированием. В дополнительной антикомплементарной обработке образцы не нуждаются. Отобранные образцы сывороток хранят при температуре от 4°C до 8°C не более 74 ч. Более длительное хранение допустимо при температуре не выше минус 15°C с исключением многократного оттаивания и замораживания (не более 1 раза). Ложные результаты могут быть получены с образцами с выраженным гемолизом, гиперлипидемией и бактериальным проростом.

Оборудование и лабораторная посуда

1. Стеклоянная посуда для лабораторных работ замачивается в моющем растворе без биодобавок на 2 часа, после чего промывается проточной водопроводной водой. Затем посуду заливают на 1-2 часа хромовой смесью (калий бихромат и серная кислота), после чего промывают не менее 10 раз проточной водопроводной водой и не менее 3-х раз дистиллированной водой. Нельзя мыть с использованием моющих средств посуду для растворов хромогенов: ОФД и ТМБ. Такую посуду нужно ополаскивать 50%-ным раствором этилового спирта и затем дистиллированной водой.

2. Наконечники автоматических пипеток после каждого использования за-

мачивают в 6% растворе перекиси водорода на ночь, затем промывают несколько раз проточной водопроводной водой и несколько раз дистиллированной водой, кипятят 15-30 минут и снова промывают дистиллированной водой, после чего просушивают. Для работы с растворами хромогенов (ОФД и ТМБ) желательно иметь новые или отдельные наконечники.

3. Необходимо постоянно проверять точность дозировки и следить за рабочим состоянием пипеток и другого оборудования.

4. Во избежание загрязнения реагентов и проб следует для каждого из них использовать отдельные наконечники. Для нанесения различных растворов на планшет необходимо использовать разные емкости. За растворами коньюгата и субстрата закрепить определенные емкости, менять их нельзя.

Проведение иммуноферментного анализа

1. ИФА не проводится в присутствии паров кислот, щелочей, альдегидов или пыли, которые могут менять ферментативную активность коньюгатов.

2. Перед использованием необходимо выдержать реагенты при комнатной температуре (18-22 С) 30 минут.

3. Нельзя смешивать реактивы из разных серий, так как все компоненты тест-систем подбираются индивидуально для каждой серии

4. Перед началом анализа рекомендуется составить протокол нанесения сывороток крови и контрольных образцов на иммуносорбент. Не изменяйте протокол исследования в ходе работы.

5. Если допущена ошибка при внесении образца, нельзя, опорожнив эту

лунку, вносить в нее новый образец. Такая лунка бракуется.

6. Не оставляйте ячейки сухими между стадиями нанесения реагентов. Если в ходе работы возникли непредвиденные задержки, плотно закройте планшет крышкой. Минимальное высушивание ведет к потере ферментативной активности.

7. Важным этапом при проведении теста является процедура промывки. Некачественная промывка может привести к неправильным результатам. В процессе промывки лунки должны быть заполнены до краев, что позволяет отмыть края лунки в случае его загрязнения реагентами.

8. Нередко при засорении одной из игл промывателя в результате плохой отмытки во всех лунках одного из горизонтальных или вертикальных рядов может наблюдаться повышение сигнала.

9. Не менее важным параметром является и время подсушивания. Оно должно быть достаточным, чтобы лунки были полностью высушены.

10. Иглы промывателя, по которым подводится раствор, должны находиться на расстоянии 0,3-0,5 мм от дна лунок. Важно, чтобы они не касались дна, ибо в этом случае может заблокироваться ток жидкости. В лунках с плоским дном иглы должны располагаться у боковой стенки лунки, в круглодонных лунках они находятся в центре лунки

11. Промыватель необходимо тщательно контролировать на объем и однородность заполнения лунок и полностью отсоса жидкости.

12. Иглы проомывателя тщательно промывают дистиллированной водой, периодически очищая от солей. Промыватель регулярно разбирают и про-

веряют на предмет коррозии, шланги - на утечку и целостность. Механические части проомывателя необходимо очищать, изношенные - заменять новыми.

13. Ферментативная реакция очень чувствительна к присутствию металлических ионов. Поэтому, не допускайте контактов каких-либо металлических предметов с конъюгатом, растворами субстратов, таблетками ОФД, раствором ТМБ.

14. Для получения правильного рабочего разведения исследуемых сывороток необходимо:

а) при отборе 10 мкл сыворотки не погружать наконечник глубоко в сыворотку, чтобы исключить налипание сыворотки на внешнюю поверхность наконечника;

б) отбирать сыворотку наконечником однократно, не допускается ополаскивание наконечника сывороткой несколько раз;

в) тщательно перемешивать пипетированием сыворотку в блок-растворе в лунке планшета.

15. Растворы конъюгата и субстратные смеси (ОФД и ТМБ) готовить непосредственно перед нанесением на планшет.

16. Субстратную смесь готовить с особой аккуратностью. При открывании флакона с субстратом нельзя касаться внутренней поверхности крышки. Для переноса концентрата ТМБ в субстрат желательно использовать новый наконечник.

17. Субстратная смесь энергично встряхивается до полного растворения. Необходимо проверять раствор субстрата до внесения его в планшет. Он должен быть бесцветным. Планшеты с субстратом инкубировать в темноте.

Точно выдерживать время инкубации.

18. После последней промывки иммуносорбента (перед нанесением субстратной смеси) для исключения ошибок при измерении оптической плотности на спектрофотометре необходимо протереть нижнюю сторону планшета.

19. Инкубация с субстратной смесью должна проходить при комнатной температуре 20-22 °С. Скорость ферментативной реакции зависит от температуры. Повышение или понижение комнатной температуры приводит к изменению чувствительности проводимого анализа. Поэтому, инкубацию с субстратной смесью желательно проводить в термостате, настроенном на температуру 20-22°C.

20. После внесения субстратной смеси необходимо следить за процедурой окрашивания раствора в лунках. Иногда окраска начинает развиваться в виде полумесяца от края лунки, что может быть обусловлено трещинами между стенкой и дном лунки (производственный брак планшета) - в которые попадает конъюгат, не удалившийся в процессе отмывки. Если окраска развивается в виде отдельной точки, то в данном случае в лунку попала грязь. Результаты анализа в таких лунках не учитываются.

21. После добавления стоп-реагента содержимое лунок необходимо перемешать осторожным постукиванием по краю планшета. На величину оптической плотности могут повлиять пузыри, оставшиеся после нанесения субстратной смеси и стоп-реагента. Пузыри удаляются чистыми наконечниками.

11. ОБЩИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ СИСТЕМЫ "ЛЮИС-ТЕСТ"

1. Эмульсию кардиолипинового антигена хранят в холодильнике при температуре 4-6°C на протяжении срока годности препарата. Не допускается многократное нагревание и охлаждение кардиолипинового антигена. Перед началом работы отобрать из флакона с кардиолипиновым антигеном чистым наконечником необходимое количество эмульсии в отдельный темный флакон (эмульсию кардиолипинового антигена необходимо защищать от света). Оставить при комнатной температуре (20-22°C) на 30 минут. Перед проведением анализа перемешать эмульсию антигена до гомогенного состояния. По окончании реакции убрать остатки кардиолипинового реагента в отдельном флаконе в холодильник, ис-

пользовать при ближайших постановках. Нельзя хранить кардиолипиновый антиген в пластиковых флаконах.

2. Для проведения реакции используются нативная плазма и инактивированная при 56 С сыворотка крови. Условия хранения сывороток такие же, как при иммуноферментном анализе (см. выше).

3. Во избежании повреждения картонных тест-карт нельзя прикасаться к их поверхности кончиками пипетки или капельницы при нанесении реагентов.

4. Не прикасаться к глянцевой поверхности тест-карты руками. Жирные пятна препятствуют проведению реакции.

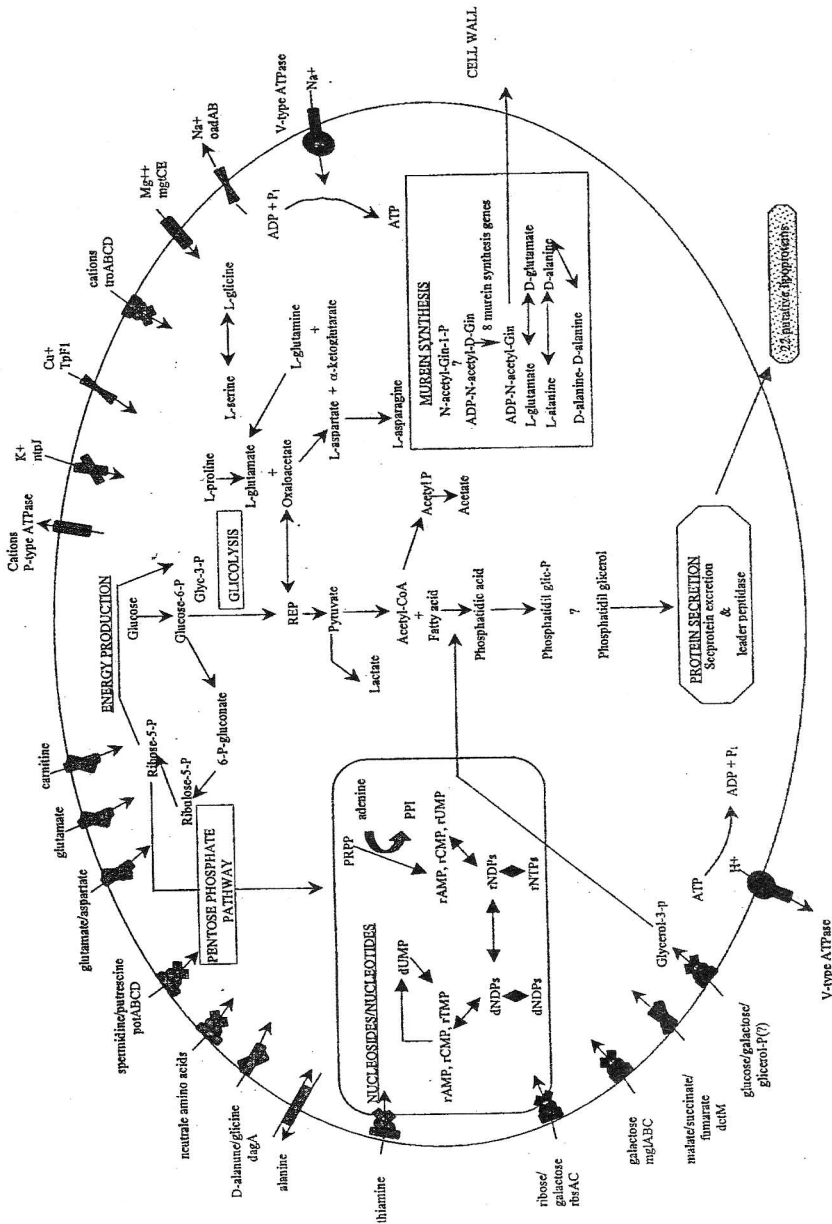
5. Результаты реакции учитываются немедленно после окончания перемешивания. Картина реакции на неподвижной пластине (тест-карте) спустя некоторое время может измениться.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Венерические болезни. М.: Медицина, 1980,534 с.
2. Гражданцева А.А., Кочнева Г.В., Сиволобова Г.Ф. и др. Исследование сывороток больных сифилисом методом иммуноферментного анализа с использованием рекомбинантных антигенов. Иммунология, 1998; 4:20-23.
3. Кожные и венерические болезни: руководство для врачей/под ред.Скрипкина Ю.К.,Мордовцева В.Н..т.1, М.: Медицина, 1999,466-589.
4. Мавров И.И. Половые болезни. К.:Укр. Энцикл.; М.:”АСТ-Пресс”,1994, 480 с.
5. О совершенствовании серологической диагностики сифилиса. Приказ № 87. М., МЗ РФ, 2001, 63 с.
6. Милич М.В. Эволюция сифилиса. М.: Медицина, 1987,149 с.
Орлина Э.А., Уменко В.И. Неспецифические положительные результаты серологических тестов на сифилис// VIII Всероссийский съезд дерматовенерологов. Тезисы научных работ. Ч.II. М., 2001, с.52-53.
8. Родионов А.Н. Сифилис. Руководство для врачей. СПб, 1997,288с.
Фриго Н.В. Современные критерии дифференциальной диагностики раннего скрытого сифилиса и ложноположительных результатов стандартных серологических реакций на сифилис. Автореферат диссертации на соискание степени д.м.н.М,2001:34с.
- 10 Blanco D.R.,Miller J.N.,Lovett M.A. Surface antigens of the Syphilis Spirochaeta and their potential as virulence determinants. Emery Infect Dis.1997,Jan-March;3(1):11-20.
- 11 Fraser C.M.,White O.,Sutton G.G. et al. Complete Genome sequence of Treponema pallidum the Syphilis Spirocheate.Science,17 July 1998;281:375-388.
- 12 Millis K.B.,Faloona F.A. Specific synthesis of DNA in-vitro-via a polymeraze catalyzed chain reaction. Meth Enzymol,1987;155:335-350
- 13 Sexually transmitted diseases. Editors: King K. Holmes, P.Frederick Sparting, Per-Anders Mardh et al.,WC 140 s5174;1999.

Приложение 1

Пути метаболизма бледной трепонемы





Нижний Новгород

Главный офис:

ООО «НПО «Диагностические системы»
603093, г.Нижний Новгород,
ул. Яблоневая, д. 22
тел. (831) 434-86-83

Отдел сбыта:

ул. Нижне-Волжская набережная, д. 9
тел. (831) 461-92-02
тел/факс (831) 461-92-15, 461-92-16, 461-92-17
info@npods.nnov.ru
selling@npods.ru
http://www.npods.ru

Региональные предприятия

Москва	ООО "Диагностические системы—Столица" 117405, г. Москва, ул. Дорожная, д. 60 Б тел. (495) 411-96-84, 411-96-85, 411-96-86 e-mail: ds-stolica@bk.ru zav2006@bk.ru
Санкт-Петербург	ООО "Диагностические системы—СПб" 194044, г. Санкт-Петербург, пр. Большой Сампсониевский, д. 66, Литер А тел/ факс (812) 702-17-13, 702-17-14 spb@npods.ru managerspb@npods.ru
Красноярск	ООО "Диагностические системы—Сибирь" 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 16 д тел/ факс (3912) 54-16-55, 54-14-66, 54-17-58 ds-siberia@scn.ru
Республика Украина	ООО "Диагностические системы—Украина" 04210, г. Киев, а/я 119 тел. (10-380-44) 501-90-80, тел/факс 501-91-00 ua@npods.ru
Республика Казахстан	ТОО "Диагностические системы—Казахстан" 050034, г. Алматы, ул. Бродского, д. 37 а, офис 227 тел./факс (3272) 27-37-68, 27-37-69 ds-kazakstan@mail.kz
Республика Узбекистан	ООО "Диагностические системы—Бактрия" 100015 г. Ташкент, ул. Ойбек, д. 32 тел./факс (998 71) 152-23-15, 152-23-16 тел.: (998 98) 127-15-87, (998 93) 181-75-21, (998 97) 157-20-77 ds-baktriya@mail.ru
Ростов-на-Дону	Обособленное подразделение 344068, г. Ростов-на-Дону пр. М.Нагибина, д. 33 а/47, 3 этаж, офис 5 тел/факс (863) 292-41-01, моб. 8-8632-75-66-22 RostovDon@npods.ru
Чита	Обособленное подразделение 672000, г. Чита, ул. 9 января, д. 6, офис 103 тел. (3022) 35-27-91, chitanpods@mail.ru