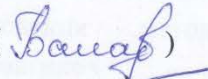


Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Красноярский государственный медицинский
университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
Фармацевтический колледж

ДИПЛОМНАЯ РАБОТА

Тема: Современная диагностика сифилиса

по специальности 31.02.03 Лабораторная диагностика

Выполнил: Балабина Дарья Александровна ()

Руководитель: Тюльпанова Ольга Юрьевна ()

Рецензент: Попов Виталий Галактионович ()
зав. клинко-диагностической лабораторией КККВД №

Работа допущена к защите ЦМК «Лабораторных и
санитарно-гигиенических дисциплин»

Протокол № 9 от « 28 » _____ мая 2018 г

Красноярск, 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
Глава 1. Общая характеристика и диагностика <i>Treponema pallidum</i>	6
1.1.Систематика.....	6
1.2.Морфология.	6
1.3.Культивирование.....	7
1.4.Ферментативные и антигенные свойства.	8
1.5.Патогенез.	8
1.6.Профилактика и лечение.	10
1.7.Диагностика.....	10
Глава 2. Анализ профиля исследуемого биоматериала в бактериологической лаборатории на носительство сифилиса	14
2.1. Анализ статистических данных «В Красноярском Кожно- Венерологическом диспансере № 1» за период 2017 года	15
2.2. Реакцию микропреципитации с кардиолипидным антигеном (РМП).	18
2.3.RPR (быстрый тест для качественного и количественного определения реагиновых антител в сыворотке или плазме крови)	22
2.4.Учет результатов RPR:	24
ВЫВОДЫ	27
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ	28

ВВЕДЕНИЕ

Вопрос о происхождении сифилиса не разрешен до настоящего времени. Теорий происхождения заболевания много, они различны и противоречивы. Объясняется это тем, что до начала XX столетия возбудитель сифилиса был неизвестен, и трудно было отличить эту болезнь от других заболеваний, особенно в древние времена, когда сведения по медицине были примитивны. Сложность точного установления происхождения заболевания обусловлена тем, что достоверность различных исторических документов не доказана. Первые упоминания о сифилисе появились уже очень давно и берут свое начало из мифов и сатирических произведений писателей древности и средних веков, а также из сочинений врачей тех времен и археологических раскопок.

У Гиппократ (460—400 гг. до нашей эры) имеются указания на заболевания, которые во многом напоминают современные описания симптомов сифилиса: «у многих были афты и язвы во рту, частые воспаления половых частей с язвами и опухолями, как внутренними, так и наружными, припухания в пахах, продолжительные и безболезненные гнойные воспаления глаз, мясистости на внутренней и наружной поверхности век, называемые бородавками, вследствие чего многие лишились зрения».

Достаточно ясные указания на сифилис встречаются у индийского автора Сусрута в его произведении A'yurvedas, опубликование которого относится к эпохе до нашей эры. «Заразительная материя», — говорится в данном труде, — раз проникнув в мужской половой орган, поражает тело и кровь, производит раздражение, вследствие которого открывается рана, на которой образуются бугроватости, отделяющие жидкую кровяную сыворотку. У женщин заразительная материя, попавшая на половые части, производит грибовидные, гноящиеся и дурно пахнущие наросты». Здесь же в одном месте, по-видимому, указывается на проявления врожденного сифилиса у маленьких детей, приписываемые влиянию демонов.

В знаменитом «Каноне медицины» Авиценны также можно найти указания, свидетельствующие, что автору был знаком ряд проявлений сифилиса: твердый шанкр, широкие кондиломы, папулезные сифилиды кожных покровов, гуммы и отдельные симптомы врожденного сифилиса. Чрезвычайно важны для подтверждения теории о древности сифилиса в Старом Свете результаты раскопок древних погребений. Обнаруженные при этом кости людей, относящиеся к неолитическому периоду, носили следы гуммозного остеоperiостита, гуммозного остеомиелита и сифилитического изменения зубов. Большой вклад в мировую науку по этому вопросу сделала советская сифилидология. Сифилис - это заболевание, передающееся в основном половым путем. Оно поражает все слои общества, не зависимо от пола, возраста, социального статуса и образа жизни. Несмотря на снижение заболеваемости по данным Государственного доклада «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Красноярском крае в 2016 году» число заболевших 719, доля от общего числа заболевших 6,7%. За последние 5 лет в крае отмечается стабилизация заболеваемости сифилисом на уровне 30-50 случаев на 100 тысяч населения. В 2016 году в сравнении с 2015 годом, заболеваемость сифилисом снизилась на 14,0 %, показатели составили 25,1 случаев против 29,2 случаев на 100 тысяч населения. В 24 территориях показатели заболеваемости на 100 тысяч населения превышают средний показатель по краю. Максимальные показатели заболеваемости сифилисом отмечаются в Идринском и Мотыгинском районах. Преимущественно (99,0 %) случаи заболеваний регистрируется среди взрослого населения, показатель заболеваемости в этой группе составил 31,5 случаев на 100 тысяч населения, что в 26,2 раза выше показателя заболеваемости детей – 1,2 на 100 тысяч населения. Основные мероприятия по профилактике венерических заболеваний должны быть направлены на усиление работы по активному выявлению больных и контактных с ними лиц. Особое внимание следует уделять пропаганде профилактики этих заболеваний среди населения.

До сих пор тема изучения и диагностики сифилиса остаётся актуальной. В настоящее время сифилис часто протекает по скрытому типу, из-за чего происходит позднее обращение к врачу. Скрытые формы приводят к серьёзным осложнениям, таким как спинная сухотка и нервный паралич. Возбудитель этого заболевания - бледная трепонема (*Treponema pallidum*) поражает все органы и системы организма. Очень важное значение имеет диагностика и выявление возбудителя на ранних стадиях заболевания. Современные методики исследования сифилиса позволяют с большой уверенностью поставить этот диагноз, однако не все из них являются специфическими и достоверными. Поэтому в науке не последнее место занимает разработка новых и более совершенных методов по диагностике и борьбе с этой болезнью.

Цель работы: изучение современных методик диагностики сифилиса.

Для реализации цели были определены следующие задачи:

1. Изучить патогенез, клинику и диагностику сифилиса
2. Провести анализ использования различных методик диагностики сифилиса, которые используются в Краевом Красноярском Кожно-Венерологическом Диспансере №1.
3. Провести серию современных исследований сифилиса методами РМП и РПР.

Объект исследования: Сыворотка исследуемых пациентов

Предмет исследования: Реакция Микропреципитации с кардиолипиновым антигеном и тест определения быстрых плазменных реагинов (RPR).

Методы исследования: анализ; серологические, статистические

База исследования: КККВД №1 г. Красноярска

Глава 1. Общая характеристика и диагностика *Treponema pallidum*

1.1. Систематика.

Возбудителем заболевания сифилис является бледная спирохета-*Treponema pallidum*. Она относится к семейству Spirochaetaceae Роду *Treponema*, Вид *Treponema pallidum*. Открыта в 1905 г. немецкими микробиологами Фрицем Шаудином и Эрихом Гофманом.

1.2. Морфология.

T. pallidum - спиралевидная нить размером $8-18 \times 0,08-0,2$ мкм с мелкими, равномерными завитками. Число завитков 12-14. Концы трепонемы заострены или закруглены. Трепонемы подвижны. Обладают тремя видами движения: вращение вокруг своей оси, изгибание под прямым углом и поступательное волнообразное перемещение. Сгибание клетки под прямым углом является важным диагностическим элементом при дифференцировке *T. Pallidum*. По Романовскому - Гимзе окрашиваются в бледно-розовый цвет, поэтому они называются *T. pallidum* - бледная трепонема. Плохое окрашивание объясняется малым содержанием нуклеопротеидов. Спирохеты можно выявлять в препаратах, окрашенных по Бурри, серебрением. Кроме того, их изучают в живом состоянии - в темном поле. Возбудители сифилиса спор и капсул не имеют. Один раз в 30-32 часа трепонема размножается делением.

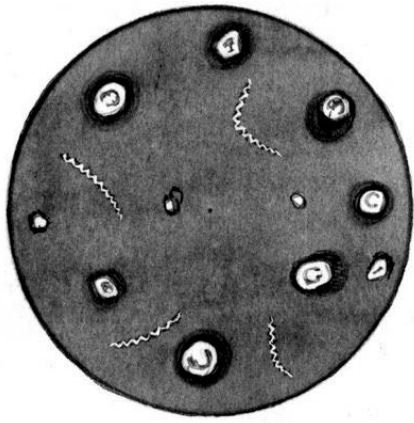


Рисунок 1. Бледная спирохета под микроскопом.

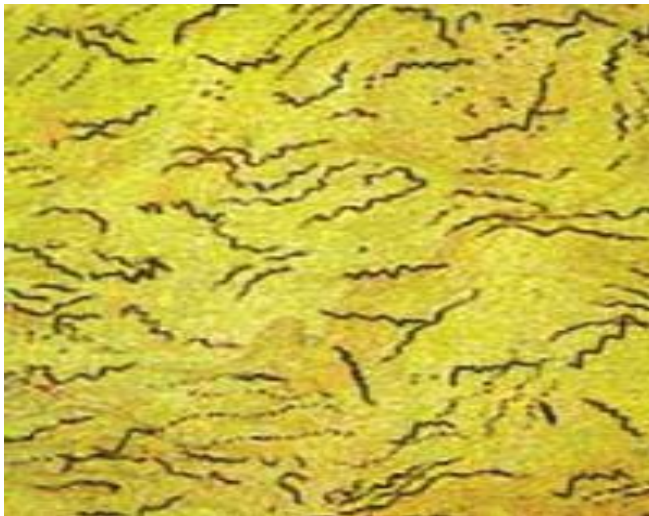


Рисунок 2. Импрегнация серебром по методу Левадити

1.3. Культивирование.

Бледные трепонемы очень требовательны к питательным средам. На искусственных питательных средах они растут только в присутствии кусочков мозга или почек кролика и асцитической жидкости. Растут медленно, 5-12 дней при температуре 35-36° С в анаэробных условиях. Бледные трепонемы хорошо размножаются в курином эмбрионе (поперечным делением). При выращивании на искусственных питательных средах трепонемы теряют вирулентность. Такие культуры называются культуральными. Культуры, выращенные в курином эмбрионе, называют тканевыми. Они обычно сохраняют вирулентность.

1.4. Ферментативные и антигенные свойства.

Трепоне́мы не обладают ферментативными свойствами. Однако культуральные штаммы различаются между собой по способности образовывать индол и сероводород. Бледная трепоне́ма содержит несколько антигенных комплексов: полисахаридный, липидный и протеиновый. Серогруппы и серовары не установлены.

1.5. Патогенез.

Входными воротами являются слизистые оболочки половых путей и ротовой полости.

Первичный период - спирохеты попадают на слизистую оболочку, и после инкубационного периода (в среднем 3 недели) на месте внедрения образуется язва, которая характеризуется плотными краями и дном - твердый шанкр. Образованию твердого шанкра сопутствует увеличение лимфатических узлов. Первичный период продолжается 6-7 недель.



Рисунок 3. Твердый шанкр на пальцах рук. Проявление первичного сифилиса

Вторичный период - возбудители сифилиса по лимфатическим и кровеносным путям распространяются по всему организму. При этом на коже и слизистых оболочках образуются розео́лы, папулы, везикулы. Продолжительность этого периода - 3-4 года.



Рисунок 4. Сифилиды на стопах ног. Проявление вторичного сифилиса

Третий период - Если лечение не проводится, то через 2— 3 года наступает третий период сифилиса — гуммозный. В этот период в органах, тканях, костях, сосудах образуются грануляционные разрастания - гуммы или гуммозные инфильтраты, склонные к распаду. Этот период может продолжаться несколько лет (в скрытой форме). Больной в этот период незаразен. При нелеченом сифилисе (в некоторых случаях), спустя много лет, может наступить поражение центральной нервной системы: при поражении головного мозга - прогрессивный паралич, при поражении спинного мозга - спинная сухотка. Эти заболевания возникают при локализации трепонем в мозговой ткани, что приводит к тяжелым органическим и функциональным изменениям в организме.



Рисунок 5. Сифилидная гумма. Проявление третичного сифилиса

В последнем, четвертом, парасифилитическом периоде, который может наступить через 10—20 лет после начала заболевания, наблюдаются

специфические поражения центральной нервной системы в форме прогрессивного паралича или спинной сухотки.

Источники инфекции. Больной человек.

Пути передачи. Контакт бытовой (прямой контакт), преимущественно половой путь. Иногда сифилис может передаваться через предметы (посуду, белье). От больной сифилисом матери заболевание передается через плаценту ребенку (врожденный сифилис).

Иммунитет. Естественный, врожденный, иммунитет отсутствует: заражение всегда приводит к развитию заболевания. Вопрос о состоянии приобретенного иммунитета до конца не изучен. Во время болезни вырабатывается нестерильный иммунитет, носящий характер клеточного, тканевого. Его называют противощанкерным, так как при повторном заражении во время болезни новый шанкр не появляется, а спирохеты распространяются по всему организму, принимая участие в развитии последующих сифилитических поражений.

Защитный иммунитет не вырабатывается. В ответ на антигены возбудителя развивается ГЗТ и аутоиммунные процессы. Гуморальный иммунитет вырабатывается на липоидный антиген Т. и представляет собой титр IgA и IgM.

1.6.Профилактика и лечение.

Санитарно-просветительная работа, раннее выявление больных сифилисом. Специфическая профилактика. Не разработана. Пенициллин, бициллин, биохинол и др.

1.7.Диагностика.

Лабораторную диагностику сифилиса можно разделить на 2 группы проводимых исследований: первая позволяет выявить непосредственно возбудителя сифилиса, вторая же выявляет иммунологические изменения, происходящие в организме при сифилисе.

1. Исследования, направленные на выделение и идентификацию возбудителя:

Темнопольная микроскопия. Биоматериал для темнопольной микроскопии берется из первичного очага инфекции – из сифилитической специфической язвы, кожной сыпи, эрозии. При исследовании материала в темном поле зрения бледная спирохета отличается от сапрофитных спирохет, встречающихся на слизистых оболочках полости рта и половых органов, равномерными завитками, плавными волнообразными движениями. Она тоньше других трепонем, способна сгибаться под углом и совершать характерные маятникообразные движения.

РИТ — реакция иммобилизации трепонем — является специфической. Живую культуру трепонем получают при культивировании в яичке кролика. Яичко измельчают в специальной среде, в которой трепонемы сохраняют подвижность. Ставят реакцию следующим образом: взвесь тканевых (подвижных) трепонем соединяют в пробирке с исследуемой сывороткой и добавляют свежий комплемент. В одну контрольную пробирку вместо исследуемой сыворотки добавляют сыворотку здорового человека, в другую — вместо свежего комплемента добавляют инактивированный — неактивный. После выдерживания при 35 °С в анаэробных условиях (анаэроустат) из всех пробирок готовят препарат «раздавленная» капля и в темном поле определяют количество подвижных и неподвижных трепонем.

РИФ — реакция непрямой иммунофлюоресценции — является специфической при диагностике сифилиса. Данному методу диагностики предшествует обработка биоматериала специальной флюоресцирующей сывороткой, что приводит к прикреплению на поверхности бледной трепонемы специфических иммунных комплексов. В результате этой реакции при микроскопии обработанного биоматериала в люминесцентном микроскопе бледная трепонема светится желто-зеленым цветом.



Рисунок 6. Бледная трепонема при исследовании биоматериала методом РИФ

ПЦР (полимеразная цепная реакция). Данный метод позволяет выявить ДНК инфекционного агента, делая его присутствие в организме пациента явным.

2. Исследования для выявления иммунологических изменений организма при наличии возбудителя сифилиса:

Такие исследования называют серологическими. Основным биоматериалом является сыворотка или плазма крови. Все серологические тесты можно разделить на трепонемные – выявляющие антитела против структурных элементов бледной трепонемы и нетрепонемные – выявляющие иммунологические изменения, связанные с последствием деятельности бактерии.

К нетрепонемным исследованиям относят:

Микрореакция микропреципитации с неспецифическим кардиолипидным антигеном. Данная реакция заменила устаревшую реакцию Вассермана. Положительная реакция с сывороткой крови больного сифилисом характеризуется образованием и выпадением хлопьев разной величины; при отрицательном результате наблюдается равномерная легкая опалесценция. Данный тест обладает высокой достоверностью, но малой специфичностью. Дело в том, что выявляемые антитела могут

присутствовать в крови при многих заболеваниях и патологических состояниях. Потому данный тест используют лишь как скрининг заболевания, выявляющий подозрение на заболевание.

Иммуноферментный анализ (ИФА) является основным при выявлении большинства инфекционных заболеваний. Основан метод на избирательной высокоспецифичной реакции антиген – антитело. Одной из особенностей данного анализа является то, что с его помощью можно выявить антитела различных классов (IgA, IgM, IgG). Так же важным является способность данного анализа определять количество выявляемых антител. В итоге определение типа антител и его количественной составляющей позволяет сделать ряд выводов о длительности заболевания, динамике процесса, активности возбудителя и иммунной системы пациента. В итоге данный анализ оказался незаменимым в деле диагностики инфекционных заболеваний, а также как контроль динамики заболевания на фоне проводимого лечения.

Реакция пассивной гемагглютинации (РПГА). Данная реакция основывается на иммунологически индуцированном склеивании эритроцитов. Механизм данной реакции заключается в том, что предварительно подготавливаются эритроциты, на поверхности которых фиксированы белковые компоненты бледной трепонемы. Потому, при смешивании с плазмой крови, содержащей антитела к трепонеме, происходит склеивание эритроцитов – кровь из красной превращается в зернистую. Положительной реакция гемагглютинации становится спустя 4 недели после инфицирования. После успешного лечения сифилиса данная реакция в течение всей жизни может оставаться положительной.

Глава 2. Анализ профиля исследуемого биоматериала в бактериологической лаборатории на носительство сифилиса

Исследование проводилось на базе микробиологической лаборатории. В Красноярском Кожно-Венерологическом диспансере № 1В данной лаборатории используются следующие методы диагностики сифилиса:

1. РМП(реакция микропреципитации)
2. RPR(тест быстрых реагинов)
3. ИФА(иммуноферментный анализ)
4. РПГА (реакция пассивной гемагглютинации)
5. РИФ (реакция иммунофлюоресценции)
6. РИТ (реакция иммобилизации трепонем)
7. Темнопольная микроскопия

Первые два используются преимущественно для скрининга при медицинских исследованиях, РПГА и ИФА используют как для скрининга, так и для диагностики (подтверждения) сифилиса. Наиболее достоверные результаты дает комплекс нетрепонемных (реагиновых) и трепонемных тестов (РМП с РПГА и ИФА). РИФцелесообразно применять при расхождении результатов трепонемных тестов РПГА и ИФА.

В первичном серонегативном периоде (до 2 месяцев после заражения) проводят поиск трепонемы в темном поле или с использованием флюоресцирующих антител.

При первичном серопозитивном, вторичном и скрытом сифилисе используют РМП и ИФА, а как подтверждающий тест – РПГА.

У пациентов с рецидивами вторичного сифилиса исследуют элементы сыпи, пытаясь выделить из них трепонемы для микроскопического изучения.

В третичном периоде РМП у трети больных отрицательная. ИФА и РПГА положительные, но они могут свидетельствовать не о третичном сифилисе, а о перенесенном ранее заболевании. Слабоположительный анализ скорее говорит о выздоровлении, чем о третичном сифилисе.

При выставлении диагноза «врожденный сифилис» принимают во внимание наличие болезни у матери, разницу в показателях РМП у матери и ребенка, положительные ИФА и РПГА у новорожденного, иммуноблоттинг.

Обязательно обследуются на сифилис беременные женщины, особенно те, у которых уже были роды мертвым плодом, неразвивающаяся беременность, ранние выкидыши. Им проводится РМП, ИФА, РПГА. Обследуют на наличие заболевания и перед прерыванием беременности.

2.1. Анализ статистических данных «В Красноярском Кожно-Венерологическом диспансере № 1» за период 2017 года

Динамика использования методов диагностики сифилиса в КККВД представлена в приложении № 1 и на диаграмме № 1. Это так же подтверждается в таблице №1.

Таблица 1. Динамика использования методов диагностики сифилиса в



Вывод: Как видно из диаграммы, наиболее используемый метод РМП и РПГА в 2017 году.

Таблица 2. Достоверность методов диагностики сифилиса

методы	чувствительность	специфичность
Темнопольная микроскопия	70%	100%
ПЦР	70-91%	99%
РМП/ RPR	Около 90%	Около 80%
РИФ	84-90%	97-99%
РИТ	79-94%	97-99%
ИФА	98-100%	96-100%
РПГА	93-98%	98-100%

Вывод: Наиболее достоверным является ИФА и РПГА.

Причины острых ложноположительных проб при использовании РМП:

1. острые инфекционные заболевания;
2. воспаление легких;
3. инфаркт миокарда;
4. инсульт;
5. травмы и отравления.

Хронические ложноположительные результаты часто возникают при следующих болезнях:

1. туберкулез;
2. бруцеллез;
3. лептоспироз;
4. саркоидоз;
5. ревматические болезни;
6. инфекционный мононуклеоз;
7. злокачественные опухоли;
8. сахарный диабет;

Причины ложноположительных результатов реакции:

В сыворотке крови людей реагиновые антитела нередко обнаруживают при:

1. системных поражениях паренхиматозных органов (печени, почек),
2. коллагенозах,
3. ревматизме,
4. онкологических заболеваниях,
5. остром инфаркте миокарда,
6. пневмонии,
7. сотрясении головного мозга,
8. атеросклерозе,
9. некоторых инфекционных заболеваниях (туберкулезе, сыпном тифе),
10. тиреотоксикозе,
11. некоторых физиологических состояниях (беременности, менструации).
12. Ложноположительные результаты RPR наблюдают:
13. после злоупотребления алкоголем,
14. приема жирной пищи,
15. на фоне медикаментозной терапии.

Количество ложноположительных результатов увеличивается при исследовании образцов крови пожилых людей.



Рисунок 7. Биологический материал для исследования

Передо мной стояла задача провести анализ использования различных методик диагностики сифилиса, которые используются в Краевом Красноярском Кожно-Венерологическом Диспансере №1. В первый день я изучила РМП, а затем реакцию RPR.

2.2. Реакцию микропреципитации с кардиолипиновым антигеном (РМП)

Относят к иммунологическим реакциям. В настоящее время применение РМП регулируется Приказом Минздрава РФ №87 от 26 марта 2001 года «О совершенствовании серологической диагностики сифилиса» (приложение №1 «Постановка отборочных и диагностических тестов на сифилис»).

РМП относят к нетрепонемным реакциям, так как антиген (холестерин — кардиолипин — лецитиновый комплекс) по своему происхождению не имеет отношения к возбудителю сифилиса. Его получают при технологическом соединении высокоочищенных биологических реагентов животного происхождения.

РМП не является строго специфической реакцией на сифилис. Реагиновые антитела (иммуноглобулины класса IgG и IgM) у больного сифилисом являются комплексным ответом на высвобождение липоидных молекулярных фрагментов из поврежденных клеток хозяина, с одной стороны, и на появление липопротеиноподобных структур, сходных с кардиолипином, входящих в состав бактериальной клетки бледной трепонемы, с другой стороны.

Принцип метода: при добавлении к плазме или сыворотке крови больного сифилисом эмульсии кардиолипинового антигена происходит образование комплексов антиген-антитело, выпадающих из раствора в осадок в виде преципитата (мелких хлопьев белого цвета).

Реактивы. В качестве антигена в РМП применяется смесь кардиолипина, лецитина и холестерина. Соотношение ингредиентов антигена в настоящее время стандартизировано: холестерин — 0,98%, кардиолипин — 0,03%, лецитин — 0,27% в абсолютизированном этиловом спирте.

Передо мной стояла задача провести серию современных исследований сифилиса методом РМП.

Методика проведения РМП:



Схема 1. Постановки реакции микропреципитации с кардиолипидным антигеном

Пипеточным дозатором набрала небольшое количество сыворотки крови из пробирки и перенесла по 150 мкл в соответствующую лунку планшета, остаток сыворотки возвратила в исходную пробирку, при этом для каждого образца использовала индивидуальный наконечник, который после использования сбрасывала в емкость с дезинфицирующим раствором.

По окончании внесения в лунки планшета всех образцов биологического материала и контролей во все лунки добавила по 50 мкл хорошо ресуспендированной рабочей эмульсии кардиолипидного антигена.

Планшет поместила на платформу горизонтального шейкера для постоянного перемешивания содержимого лунок на 5 минут, что обеспечивает оптимальное прохождение реакции.

Через 5 минут во все лунки планшета внесла по 150 мкл физиологического раствора и плавными покачивающими движениями планшета достигла равномерного перемешивания реакционной среды, не допуская переливания содержимого в соседние лунки. Перемешивать содержимое лунок возможно и при размещении планшета в течение 5 минут на платформе орбитального шейкера.

Планшет оставила на 3-5 минут в спокойном состоянии, после чего приступила к учету результатов реакции.

Учет результатов. Провела при боковом освещении планшета дополнительным источником света. Планшет держала в руках и слегка покачивая. Наблюдала за образованием в реакционной среде хлопьев преципитата различной величины или отсутствием преципитата. Для более четкой регистрации элементов преципитата белого цвета под планшетом разместила лист черной бумаги и применяла лупу двукратного увеличения. Величина образующихся частиц преципитата оценивается визуально, этот признак является мерой полуколичественного учета содержания антител и может быть выражен в условных единицах — от 1 до 4 плюсов.

Таблица 3. Оценка результатов реакции микропреципитации

Результат	Описание
Резко положительный результат (4+)	Крупные хлопья преципитата белого цвета распределяются равномерно по всему объему лунки, либо имеют тенденцию к расположению по периферической части лунки, при этом реакционная среда практически полностью прозрачная.
Положительный результат (3+)	Хлопья средней величины распределены по всему объему лунки, реакционная среда имеет белесоватый оттенок.
Слабоположительный результат (2+ и 1+)	Мелкие хлопья преципитата распределены по объему лунки, реакционная среда имеет белесоватый оттенок.
Сомнительный результат ($\pm$)	Наличие очень мелких хлопьев, сомнение в наличии преципитата; при покачивании планшета частицы антигена демонстрируют перламутровые переливы реакционной среды. При получении подобного результата рекомендуют повторное исследование данного образца биологического материала в цельном виде и в разведениях (для исключения феномена прозоны) и нового образца (парные сыворотки), полученного через 7-10 дней для контроля динамики процесса
Отрицательный результат	Преципитата нет, реакционная среда непрозрачная, при покачивании планшета частицы кардиолипинового антигена перемещаются, формируя перламутровые переливы белого цвета в центре лунки

При получении максимального ответа «4+» дальнейшую оценку напряженности гуморального иммунного ответа проводят путем

тестирования последовательных разведений исследуемого образца патологического материала (титрование).

Методика проведения полуколичественного варианта исследования в РМП (титрование антител)

В лунки иммунологического планшета со 2 по 8 (10) внесла по 150 мкл свежеприготовленного физиологического раствора хлорида натрия. В первую и вторую лунки ряда, внесла по 150 мкл. исследуемого образца биологического материала. Многократным пипетированием (5—10 раз) во второй лунке перемешала содержимое и перенесла 150 мкл полученного разведения (1:2) в третью лунку. Данную операцию повторила во всех лунках ряда, по окончании разведения из последней лунки избыток материала 90 мкл удалила.

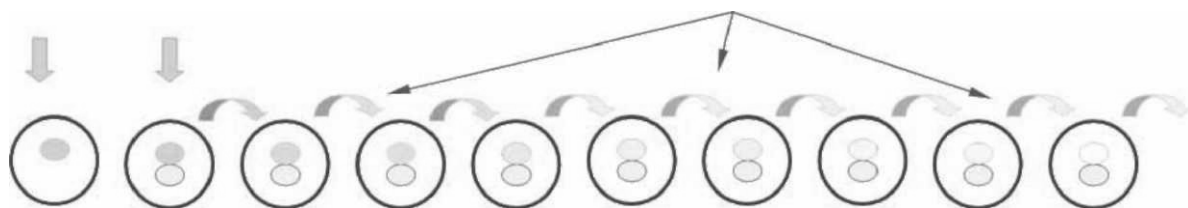


Рисунок 8. Схема постановки полуколичественного исследования.

Таким образом, получила серию разведений: от цельного биологического материала к 1:2, 1:4,... идо 1:128 (8 лунка) или 1:512 (10 лунка). Аналогично получила разведения других образцов биологического материала, включенных в постановку.

Во все лунки каждого ряда добавила по 50 мкл хорошо ресуспендированной эмульсии кардиолипинового антигена, поместила планшет для постоянного перемешивания на горизонтальную площадку орбитального шейкера на 5 минут. По окончании процедуры во все лунки внесла по 150 мкл. физиологического раствора и через 5 минут учла результаты исследования.

2.3.RPR (быстрый тест для качественного и количественного определения реакиновых антител в сыворотке или плазме крови)

относят к нетрепонемным флокуляционным тестам по выявлению антител, ассоциированных с сифилисом.

В данном тесте обнаруживаются IgG и IgM антитела к липидам клеточной стенки бледной трепонемы, которые появляются в крови примерно через 1 неделю после формирования твердого шанкра. Большинство исследователей отмечают самую высокую чувствительность RPR среди нетрепонемных тестов при всех стадиях сифилиса.

Методика исследования в RPR проста в исполнении, недорога, не требует специального оборудования и не занимает длительного времени; при этом реакция демонстрирует высокую чувствительность и специфичность.

Принцип метода: при добавлении к плазме или сыворотке крови больного сифилисом суспензии стабилизированного кардиолипинового антигена, адсорбированного на мелкодисперсных угольных частицах, происходит образование комплексов антиген-антитело, собирающих частицы древесного угля в более крупные агрегаты; при этом результат реакции становится возможным учитывать невооруженным глазом.

При отсутствии антител в исследуемом образце внешний вид реакционной среды не изменяется: она остается гомогенной, слегка окрашенной в зависимости от первоначального цвета сыворотки или плазмы крови

Реактивы: Кардиолипиновый антиген, положительный и отрицательный контроль.

Передо мной стояла задача провести серию современных исследований сифилиса методом RPR.

Методика проведения RPR (качественное определение):

Пипеточным дозатором набрала 50 мкл. отрицательного контроля и внесла в соответствующую лунку карточки, этим же наконечником распределила отрицательный контроль внутри очерченной зоны лунки. Наконечник сбросила в емкость с дезинфицирующим раствором.

Пипеточным дозатором набрала 50 мкл. положительного контроля и внесла в соответствующую лунку карточки, этим же наконечником распределила положительный контроль внутри очерченной зоны лунки. Наконечник сбросила в емкость с дезинфицирующим раствором. Пипеточным дозатором набрала 50 мкл. сыворотки, (также можно плазму) крови из пробирки и перенесла в соответствующую лунку карточки. Этим же наконечником распределила образец биологического материала внутри очерченной зоны лунки. Наконечник сбросила в емкость с дезинфицирующим раствором. Операцию повторила для других проб пациентов, при этом для каждого образца использовала индивидуальный наконечник.

После окончания внесения в 10 лунок одной карточки образцов биологического материала и контролей, в каждую лунку пипеточным дозатором добавила по 16 мкл. хорошо ресуспендированного кардиолипинового антигена, или по одной капле если используется диспенсор, входящий в состав набора. Диспенсер держала строго вертикально иглой вниз.

Планшет поместила на платформу горизонтального шейкера (ротатора) для постоянного перемешивания содержимого лунок в течение 8 минут при скорости 150—180 оборотов в минуту и амплитуде горизонтального вращения не менее 18 мм, что обеспечивает оптимальное течение реакции. Не допускала переливания содержимого в соседние лунки! Через 8 минут приступила к учету результатов реакции.

2.4. Учет результатов RPR:

Учет результатов исследования начинала с оценки результатов с положительным и отрицательным контролями. Оценила результат реакции при хорошем освещении, держа карточку в руках и слегка покачивая ее.

Таблица 4. Оценка результатов реакции RPR.

Результат	Описание	Интерпретация
-----------	----------	---------------

Положительный результат 	Крупные и средней величины агрегаты угольных частиц черного цвета располагаются по всему объему лунки, либо имеют тенденцию к расположению ближе к периферической части лунки, при этом реакционная среда практически полностью прозрачная	Высокое содержание реакиновых антител в пробе
Слабоположительный результат 	Редкие и мелкие агрегаты угольных частиц, хлопья преципитата распределены по периферии реакционной лунки, реакционная среда имеет гомогенную структуру.	Реагиновые антитела присутствуют в пробе
! Наличие в пробе после реакции разводов или неравномерности окраски при отсутствии видимых агрегатов не является признаком положительной реакции		
Отрицательный результат 	Видимые агрегаты угольных частиц в пробе отсутствуют, реакционная среда гомогенной структуры либо частицы угля собираются в центральной части лунки, формируя пятно черного цвета	Реагиновые антитела в пробе не выявлены

Содержание антител-преципитинов в крови после адекватного специфического лечения сифилиса постепенно понижается, что находит отражение сначала в снижении титров, а затем и степени позитивности RPR,

которая из резко положительной становится слабоположительной, а затем — отрицательной. В связи с этим RPR используют для оценки эффективности лечения и как один из критериев установления излеченности или при дифференциальной диагностике реинфекции.

Чувствительность основных скрининговых тестов при различных формах сифилиса

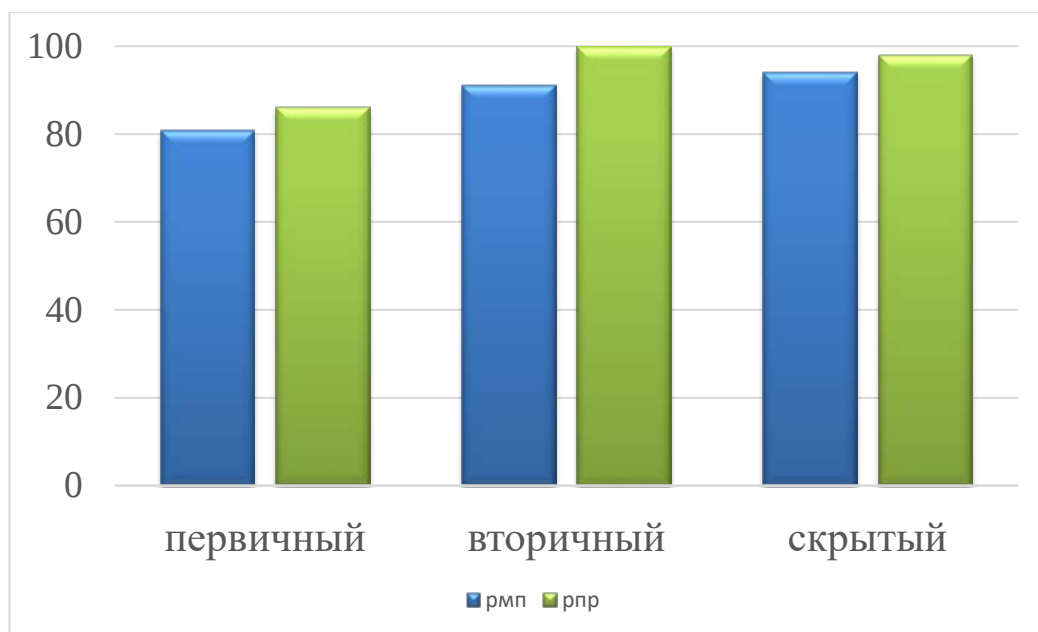


Рисунок 8. Чувствительность основных скрининговых тестов при различных формах сифилиса

ВЫВОДЫ

1. Изучила патогенез, клинику и диагностику сифилиса
2. Провела анализ использования различных методик диагностики сифилиса, которые используются в Краевом Красноярском Кожно-Венерологическом Диспансере №1.
3. Произвела серию современных исследований сифилиса методами РМП и РПР.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. Том 2: учебник. ГЭОТАР-Медиа, 2010. -410 стр. Автор: В.В. Зверев, М.Н. Бойченко
2. Клиническая лабораторная диагностика : учебное пособие. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. - 976 с. : ил.
3. Кожные и венерические болезни: учеб. для мед. училищ и колледжей / Б.И. Зудин, Н.Г. Кочергин, А.Б. Зудин. - 2-е изд., перераб. и доп. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. - 288 с.: ил. Серия "СПО"
4. Сифилис. Родионов А.Н. 2010-
5. Лечение сифилиса. Лечение сифилиса 2005-163с.
Чеботарёв В.В, Тамразова О.Б, Чеботарёва Н.В, Одинец А.В.
Дерматовенерология ГЭОТАР-Медиа 2013.-288с.
6. Сифилис А.Н.Родионов 2013-321с.
7. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Красноярском крае в 2013 году: Государственный доклад. – Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Красноярскому краю, 2014. – 299 с.
8. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Красноярском крае в 2010 году: Государственный доклад. – Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Красноярскому краю, 2011. – 191 с.
9. Все о сифилисе. Елизаров Михаил-Москва. 2010г. 372с.
10. Выявление заболевания сифилис. Гончаров Николай. Санкт-Петербург. 2007г. 203с.
<http://microbiology.ucoz.org/>
<http://venuro.ru/venera/diagluues.php>
<http://vse-zabolevaniya.ru/sifilis/laboratornaja-diagnostika-sifilisa.html>
<http://medportal.ru/>
<http://dermatovenerology.net/>

<http://www.afclinic.ru/>

<http://www.tiensmed.ru/news/sifilis-diagnostika1.html>

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Динамика использования методов диагностики сифилиса в КККВД №1

Годы Тесты	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Общее количество тестов	258935	238641	141976	201113	181011	265812	212602
РМП всего	197914	169154	104003	152642	130723	170343	170346
РМП «+»	5992	6472	4313	5114	4265	5551	5024
РПГ А всего	5612	6935	17526	22121	24708	44723	24157
РПГ А «+»	3249	3736	2978	2950	3557	3138	3080
РИФ всего	258	144	236		145	205	205
РИФ «+»	82	39	156		115	132	139
RPR всего			1089	2094	2526	21888	1249
RPR «+»			374	1035	1648	1327	551

ИФА Сумм всего	6528	5970	4170	5085	4389	7761	5574
ИФА сумм «+»	1606	2505	1696	2055	3557	1517	2048
ИФА Ig M всего	2176	5970	4019	4240	4339	5957	2553
ИФА Ig M «+»	83	51	153	137	286	197	89
ИФА Ig G всего	7674	6270	11586	14547	13773	15858	8120
ИФА Ig G «+»	4300	3787	3272	3965	4116	4493	3317
Имм уноблот Ig G всего			72	274	110	256	120
Имм уноблот Ig G «+»			59	63	79	171	92