

КАЗАНСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ



Интерпретация результатов лабораторных и инструментальных исследований

Файзуллина Е.В.

Казань, 2024



Получение результатов лабораторных и инструментальных исследований

1. Нетрепонемные и трепонемные тесты (разновидности)
2. Реакция Вассермана.
3. Основные трепонемные тесты
4. ПЦР в диагностике сифилиса





Основные нетрепонемные тесты:

- РМП— реакция микропреципитации с плазмой и инактивированной сывороткой (чувствительность: от 81 % при первичном сифилисе до 94—99 % при вторичном и скрытых формах сифилиса) – реакция Вассермана (RW)
 - *RPR — тест быстрых плазменных реагинов (Rapid Plasma Reagins), или быстрый, или ускоренный плазмареагиновый тест;
 - *VDRL (Venereal Disease Research Laboratory) — тест исследовательской лаборатории венерических заболеваний)
- *В настоящей лекции RPR, VDRL рассматриваться не будут

Фриго Н.В., Жукова О.В., Сапожникова Н.А. Современные лабораторные методы и алгоритмы диагностики сифилиса. Клиническая дерматология и венерология. 2015;14(6):56-61.

Frigo NV, Zhukova OV, Sapozhnikova NA. The modern laboratory methods and algorithms for the diagnosis of syphilis. Russian Journal of Clinical Dermatology and Venereology. 2015;14(6):56-61. (In Russ.)

<https://doi.org/10.17116/klinderma201514656-61>



Основные трепонемные тесты:

- 1. ИФА** — иммуноферментный анализ (ELISA — Enzymelynced immunosorbent assay, EIA – Enzyme immunoassay);
 - 2. РПГА** — реакция пассивной гемагглютинации (ТРНА, ТРПА — Treponema pallidum hemagglutination assay, Treponema pallidum particle agglutination assay);
 - 3. РИФ** — реакция иммунофлюоресценции (FTA Fluorescent treponemal antibody);
 - 4. *Иммуноблоттинг** (Immunoblotting);
 - 5. *ИХЛ** — иммунохемилюминесценция (CLIA — Chemiluminescence Immunoassay);
 - 6. Простые быстрые тесты у постели больного — ПБТ (РОС — point of care tests);**
- РИБТ** (РИТ) — реакция иммобилизации бледных трепонем (TPI — Treponema pallidum immobilization test)

* - в рамках данной лекции не рассматриваются

Фриго Н.В., Жукова О.В., Сапожникова Н.А. Современные лабораторные методы и алгоритмы диагностики сифилиса. Клиническая дерматология и венерология. 2015;14(6):56-61.

Frigo NV, Zhukova OV, Sapozhnikova NA. The modern laboratory methods and algorithms for the diagnosis of syphilis. Russian Journal of Clinical Dermatology and Venereology. 2015;14(6):56-61. (In Russ.)

<https://doi.org/10.17116/klinderma201514656-61>

РЕАКЦИЯ ВАССЕРМАНА (RW)

- Реакция Вассермана становится положительной в середине первичного периода сифилиса, в связи с этим первичный сифилис принято делить на:
 1. сероотрицательную (серонегативную) и
 2. сероположительную (серопозитивную) стадии.
- Реакция Вассермана положительна на протяжении всего вторичного периода, в первые годы третичного периода; при позднем третичном сифилисе могут стать отрицательными у 1/3 больных.
- RW - лабораторное серологическое исследование, позволяющее выявить антитела к бледной трепонеме.





Для постановки реакции необходимы следующие ингредиенты:

- 1) исследуемая сыворотка;
- 2) антигены (кардиолипид, получаемый из бычьего сердца). Сложный антигенный комплекс по своему строению похож на антиген бледной спирохеты ;
- 3) комплемент;
- 4) гемолитическая сыворотка;
- 5) эритроциты барана.



Технология постановки RW

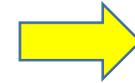
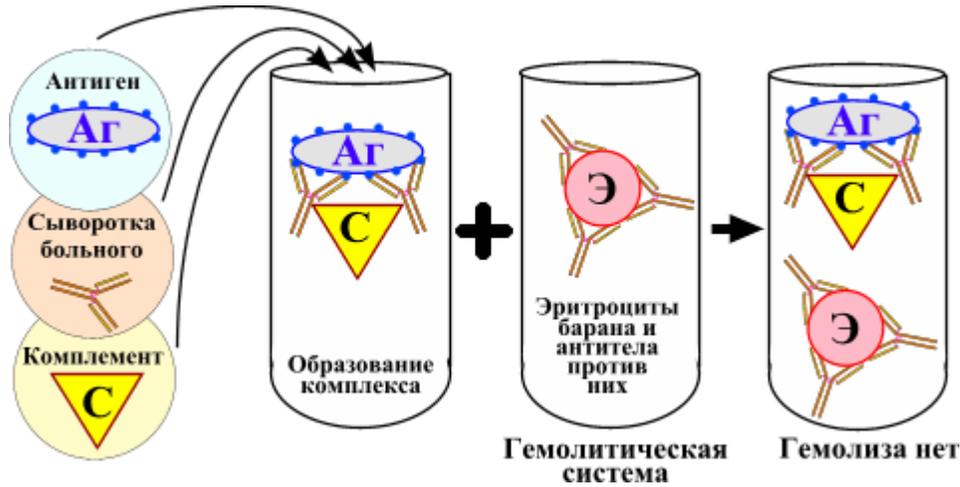
1. Перед постановкой реакции Вассермана исследуемую сыворотку необходимо прогреть на водяной бане в течение 30 мин. с целью инактивации собственного компонента и стабилизации глобулинов.
2. В качестве антигена используют спиртовые экстракты липоидов из патологических или нормальных тканей.
3. Антигены для реакции Вассермана выпускают в готовом виде с указанием титра и способа разведения.



Все ингредиенты для реакции Вассермана берут в одинаковом объеме — 0,5 или 0,25 мл.

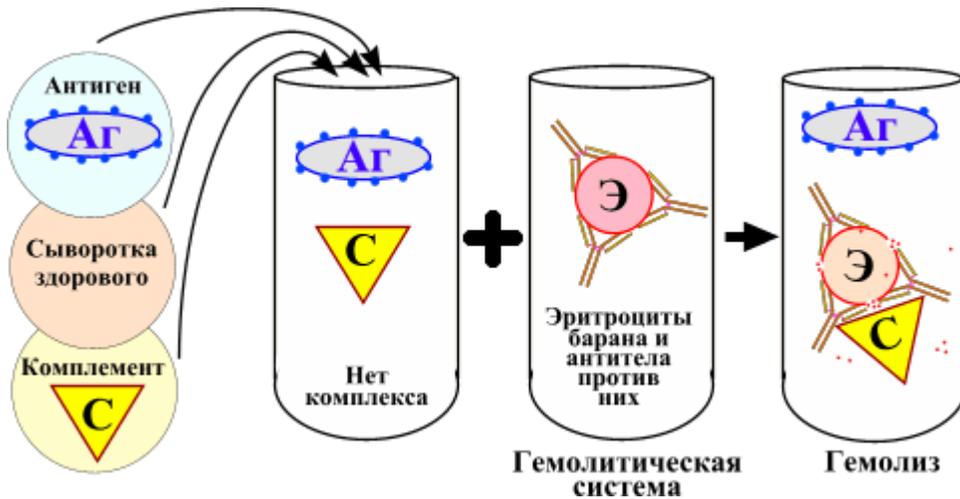
I фаза реакции: с целью прочной фиксации компонента на специфическом комплексе смесь исследуемой сыворотки, антигена и компонента помещают в термостат при $t^{\circ} 37^{\circ}$ на 45—60 мин.

II фаза реакции: После чего вносят гемолитическую систему, состоящую из бараньих эритроцитов и гемолитической сыворотки, и пробирки снова помещают в термостат на 30—60 минут до наступления гемолиза.



Результат RW

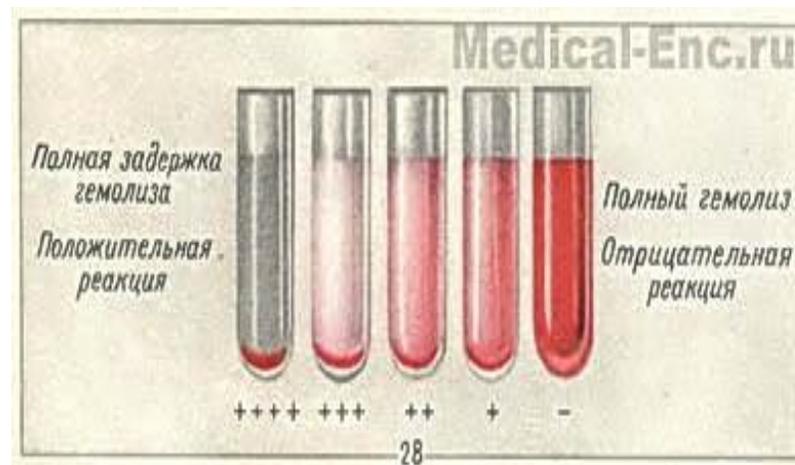
Кровь больного



Кровь здорового

Степень положительности реакции Вассермана принято обозначать количеством крестов:

- + + ++ полная задержка гемолиза, жидкость не окрашена, все эритроциты в осадке;
- + + + выраженная задержка гемолиза, жидкость розовая, эритроциты в осадке;
- + + частичная задержка гемолиза, жидкость окрашена интенсивно, осадок эритроцитов ясно виден;
- + слабая задержка гемолиза, жидкость интенсивно окрашена, осадок незначительный,
- слабо заметен; — полный гемолиз, жидкость окрашена интенсивно, осадка нет.





Рассмотрим основные трепонемные тесты:

1. ИФА — иммуноферментный анализ (ELISA — Enzymelynced immunosorbent assay, EIA – Enzyme immunoassay);

2. РПГА — реакция пассивной гемагглютинации (ТРНА, ТРПА — Treponema pallidum hemagglutination assay, Treponema pallidum particle agglutination assay);

3. РИФ — реакция иммунофлюоресценции (FTA Fluorescent treponemal antibody);

4. Простые быстрые тесты у постели больного — ПБТ (РОС — point of care tests);

РИБТ (РИТ) — реакция иммобилизации бледных трепонем (ТРИ — Treponema pallidum immobilization test)



ИФА — иммуноферментный анализ (ELISA — Enzymelynced immunosorbent assay, EIA – Enzyme immunoassay)

Структура анализа

1. Биологический материал (кровь) помещается в чистые лунки планшета на 15—30 минут, достаточное, чтобы антигены могли приклеиться к поверхности лунок.
2. Далее в лунки добавляют меченные антитела к выявляемому антигену (конъюгат). Выявляя антигены сифилиса, добавляются антитела против антигенов сифилиса.
3. Данную смесь оставляют на некоторое время (от 30 минут до 4—5 часов), чтобы антитела конъюгата смогли найти и связаться со «своим» антигеном.

Чем больше в биологической пробе антигенов, тем больше антител свяжется с ними.

Поскольку антитела добавляются в избытке, то не все они свяжутся с антигенами, а если антигена вообще нет в пробе, то, соответственно, ни одно антитело не свяжется с искомым антигеном.

4. Для того чтобы убрать «лишние» антитела, содержимое из лунок выливают (или вымывают методом декаетации).

В результате остаются только те антитела, которые связались с антигенами, «приклеенными» к поверхности лунок.

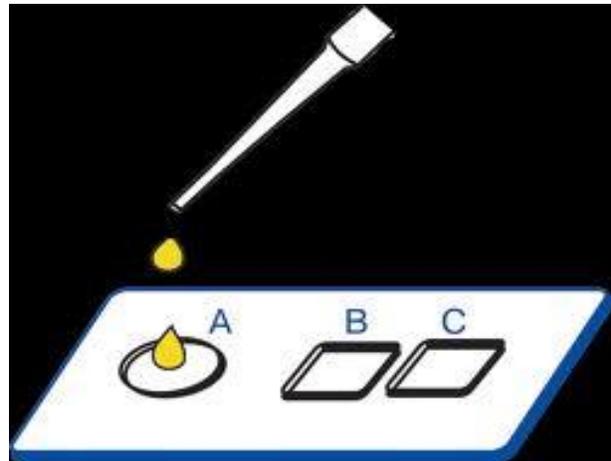
Следующий этап — ферментативная реакция.

5. В промытые лунки добавляют раствор с ферментом и оставляют на 30—60 минут. Данный фермент имеет сродство к веществу (специфической метке), с которым связаны антитела. Фермент проводит реакцию, в результате которой эта специфическая метка (субстрат) превращается в окрашенное вещество (продукт). Краткий принцип: **(Антиген)—Антитело***

РПГА — реакция пассивной гемагглютинации (ТРНА, ТРРА — *Treponema pallidum* hemagglutination assay, *Treponema pallidum* particle agglutination assay)

Реакция не прямой (пассивной) гемагглютинации (РНГА, РПГА) основана на использовании эритроцитов (или латекса) с адсорбированными на их поверхности антигенами или антителами, взаимодействие которых с соответствующими антителами или антигенами сыворотки крови больных вызывает склеивание и выпадение эритроцитов на дно пробирки или ячейки в виде фестончатого осадка.

В 2 лунки микропланшета вносится по 25 **мкл исследуемой сыворотки**, разведенной 1:20 прилагаемым к набору буфером, затем добавляется по 1 капле (75 мкл) из фиксированной капельницы на флаконе **тест-эритроцитов**, сенсibilизированных трепонемным антигеном, в первую лунку, и контрольных несенсибилизированных эритроцитов в другую лунку. Планшет слегка покачивают и затем оставляют при комнатной температуре на 45 мин.



РПГА — реакция пассивной гемагглютинации (ТРНА, ТРРА — *Treponema pallidum* hemagglutination assay, *Treponema pallidum* particle agglutination assay)

Чтение результата реакции: в положительном случае эритроциты оседают на дне лунки в виде ровного слоя клеток со складчатым или зазубренным краем (перевернутый зонтик), в отрицательном - оседают в виде *пуговки* или колечка.

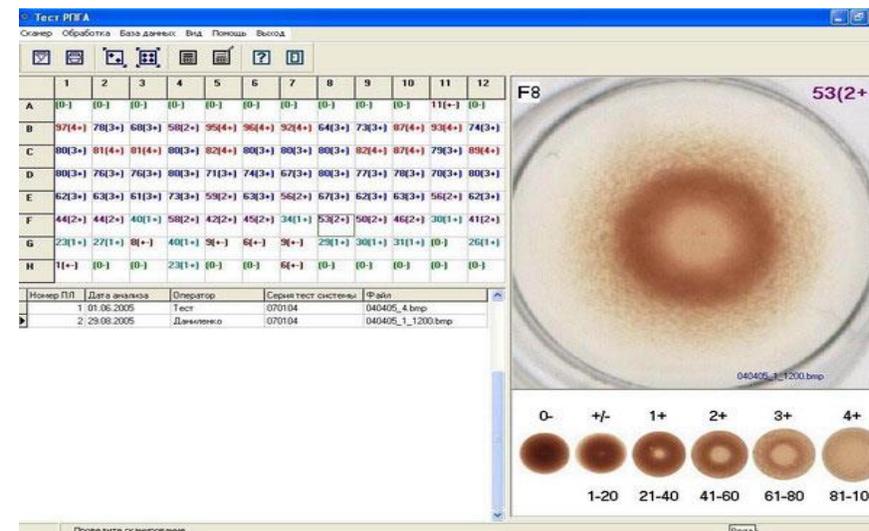
Результат РНГА (РПГА)



Положительный («зонтик»)

Отрицательный («пуговка»)

Автоматический диагностический комплекс анализа изображений РПГА «КРИТЕРИЙ 2» позволяет количественно оценивать результаты РПГА в автоматизированном режиме, сохранять результаты в базе данных, распечатывать протоколы анализа. Точность компьютерной обработки превосходит возможности визуальной оценки врачом-лаборантом, воспроизводимость результатов РПГА приближается к 99%.



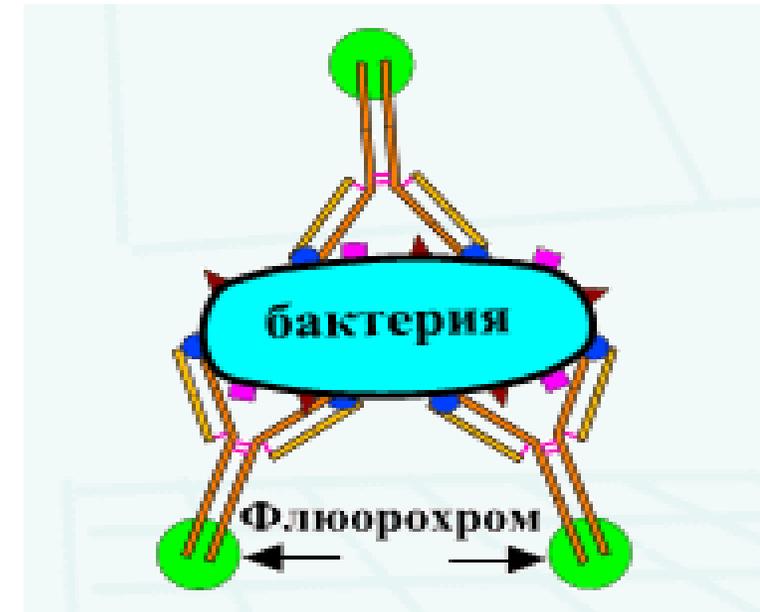
РИФ — реакция иммунофлюоресценции (FTA Fluorescent treponemal antibody)

Прямой метод РИФ основан на том, что антигены тканей или микробы, обработанные иммунными сыворотками с антителами, мечеными флюорохромами, способны светиться в УФ-лучах люминесцентного микроскопа. Бактерии в мазке, обработанные такой люминесцирующей сывороткой, светятся по периферии клетки в виде каймы зеленого цвета.

Компоненты прямой РИФ:

- 1) исследуемый материал (испражнение, отделяемое носоглоткой и др.);
- 2) меченая специфическая иммунная сыворотка, содержащая АТ-ла к искомому антигену;
- 3) изотонический раствор хлорида натрия.

Мазок из исследуемого материала обрабатывают меченой антисывороткой. Происходит реакция АГ-АТ. При люминесцентном микроскопическом исследовании в том участке, где локализуются комплексы АГ-АТ, обнаруживают флюоресценцию — свечение.



РИФ — реакция иммунофлюоресценции (FTA Fluorescent treponemal antibody)

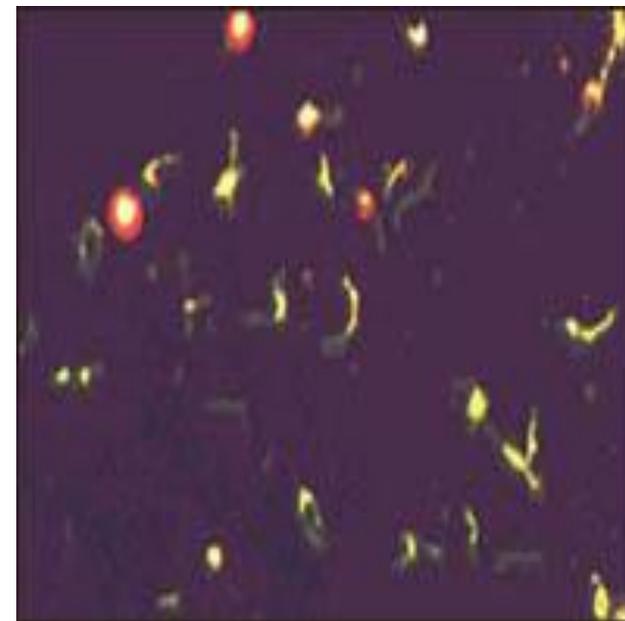
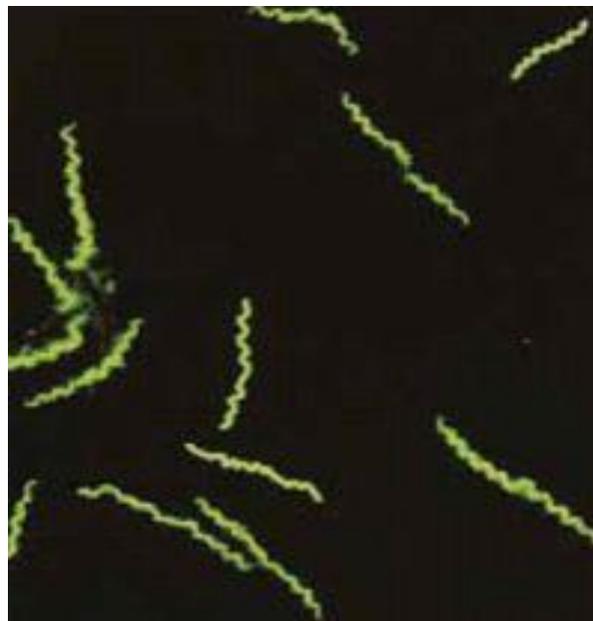
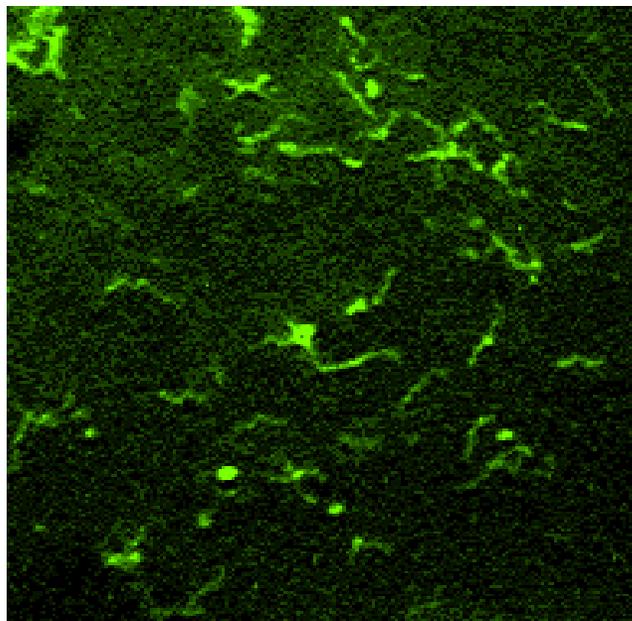
Непрямой метод РИФ заключается в выявлении комплекса антиген - антитело с помощью антиглобулиновой (против антитела) сыворотки, меченной флюорохромом.

Для этого мазки из взвеси микробов обрабатывают антителами антимикробной кроличьей диагностической сыворотки.

Затем антитела, не связавшиеся антигенами микробов, отмывают, а оставшиеся на микробах антитела выявляют, обрабатывая мазок антиглобулиновой (антикроличьей) сывороткой, меченной флюорохромами.

В результате образуется комплекс микроб + антимикробные кроличьи антитела + антикроличьи антитела, меченные флюорохромом. Этот комплекс наблюдают в люминесцентном микроскопе, как и при прямом методе.





Степень свечения оценивается плюсами

Положительная реакция констатируется 4 +, 3 + и 2 +.

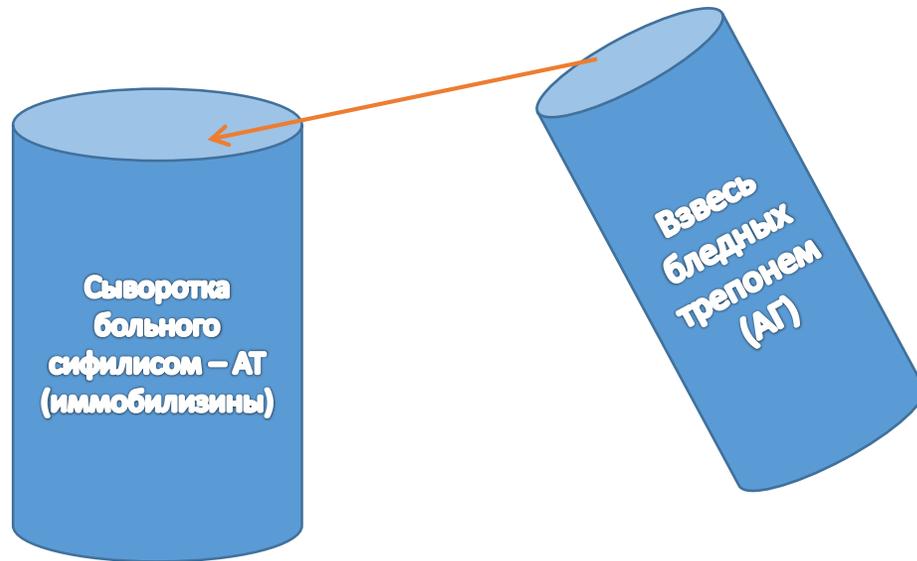
При степени свечения 1 + и отсутствии свечения реакция считается отрицательной.

При вторичном сифилисе РИФ положительная почти в 100 % случаев.

Она всегда положительна при латентном сифилисе (99—100 %),
при третичных формах и врожденном сифилисе положительна в
95—100 %.

РИБТ (РИТ) — реакция иммобилизации бледных трепонем (TPI — *Treponema pallidum* immobilization test)

Серологическая реакция, основанная на феномене обездвиживания бледных трепонем антителами типа иммобилизинов, имеющимися в сыворотке крови больных сифилисом



АГ – антиген выделяется из первичной сифиломы кролика (орхит), зараженного либо штаммом Николса, либо Будапештским штаммом бледных трепонем.

Смесь аг + ат ставится в термостат на 18 часов при $t^{\circ} 35 \text{ C}$.



РИБТ (РИТ) — реакция иммобилизации бледных трепонем (TPI — Treponema pallidum immobilization test)

Проводится темнопольная микроскопия 25 бледных трепонем в контроле (при количестве подвижных трепонем в контроле менее 17 - РИБТ не достоверна).

Подсчет в основном опыте проводится также при наблюдении бледных трепонем в темном поле зрения.

ИТОГОВЫЙ ПРОЦЕНТ ИММОБИЛИЗАЦИИ :

$$И = [(ПК—ПО) \times 100] / ПК,$$

где И — процент иммобилизации,

ПК — количество подвижных трепонем в контроле,

ПО — количество подвижных трепонем в опыте.

РЕЗУЛЬТАТЫ реакции оцениваются в процентах

положительная РИБТ констатируется при иммобилизации от 51 до 100 % бледных трепонем;
слабоположительная — от 31 до 50 %;
сомнительная — от 21 до 30 %;
отрицательная — от 0 до 20 %.





РИБТ (РИТ) — реакция иммобилизации бледных трепонем (TRP — Treponema pallidum immobilization test)

Показания к назначению **РИБТ (РИТ) — реакция иммобилизации бледных трепонем (TRP — Treponema pallidum immobilization test)**

- 1) Подозрение на скрытый сифилис, особенно у беременных;
- 2) Поздние формы сифилиса;
- 3) Окончание противосифилитического лечения;
- 4) Положительные результаты реакции Вассермана и осадочных реакций у лиц, которым клинически затруднительно или невозможно поставить диагноз сифилиса.

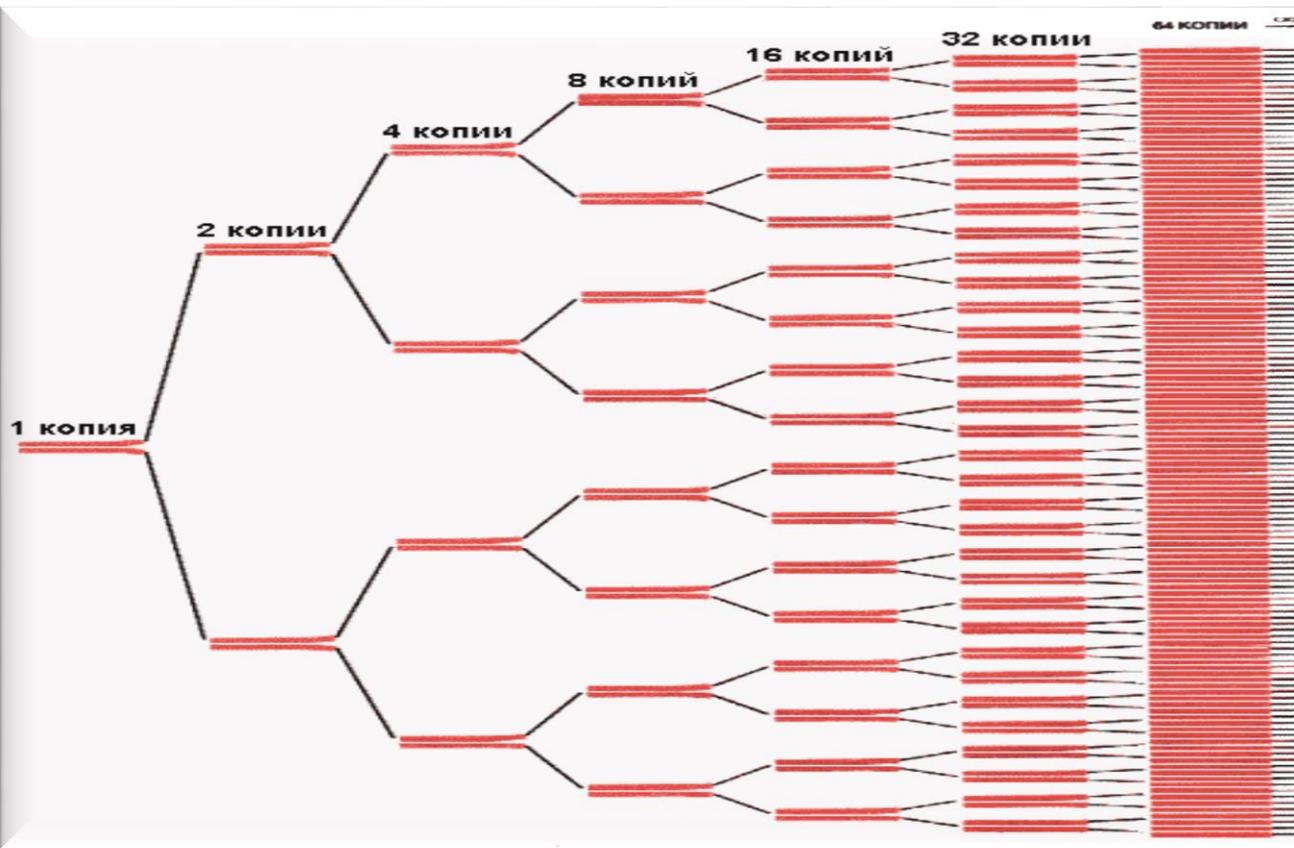


ДРУГИЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ СИФИЛИСА

ПЦР в диагностике сифилиса

1. Позволяет выявить единственную молекулу ДНК бледной трепонемы среди сотен тысяч других молекул.
2. ПЦР - метод инструментальной диагностики инфекций, высокоспецифичный, чувствительный и при грамотном техническом исполнении и хорошей подготовке образцов практически не дает ложных результатов.
3. Инфекцию можно обнаруживать сразу после заражения, за недели или месяцы до того, как проявятся симптомы заболевания.

ПЦР - эффективный способ получения *in vitro* большого числа копий специфических нуклеотидных последовательностей ДНК микроорганизма

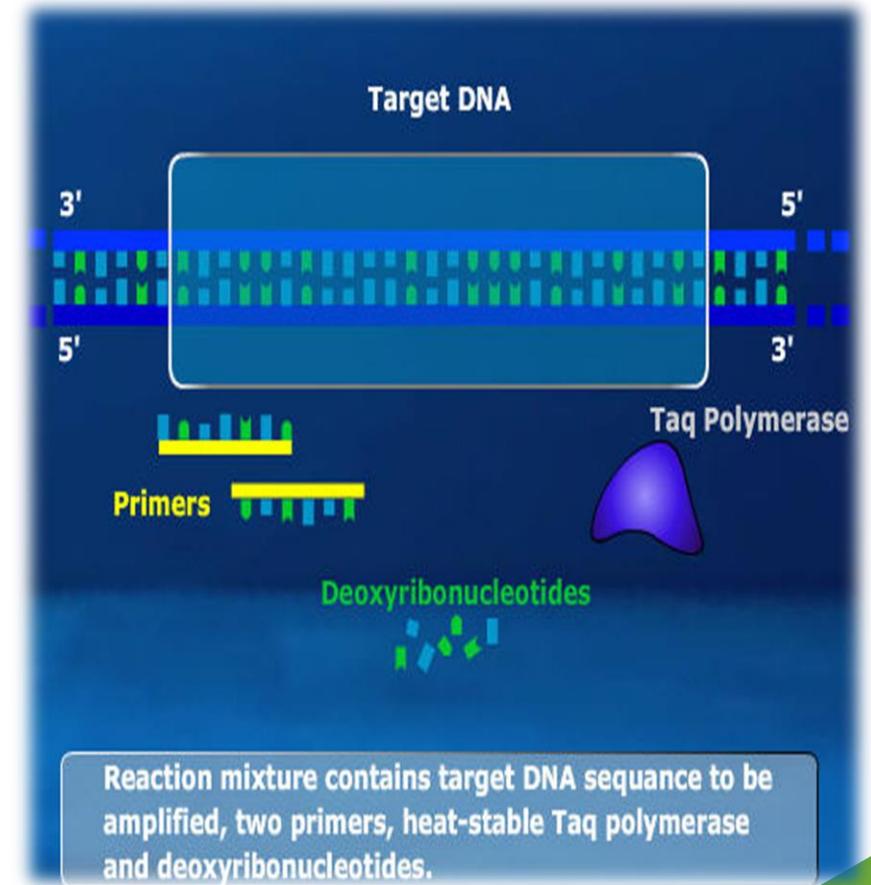


ПЦР осуществляется в ходе трехэтапного циклического процесса:

- ✓ Денатурация
- ✓ Ренатурация (отжиг)
- ✓ Элонгация (синтез)

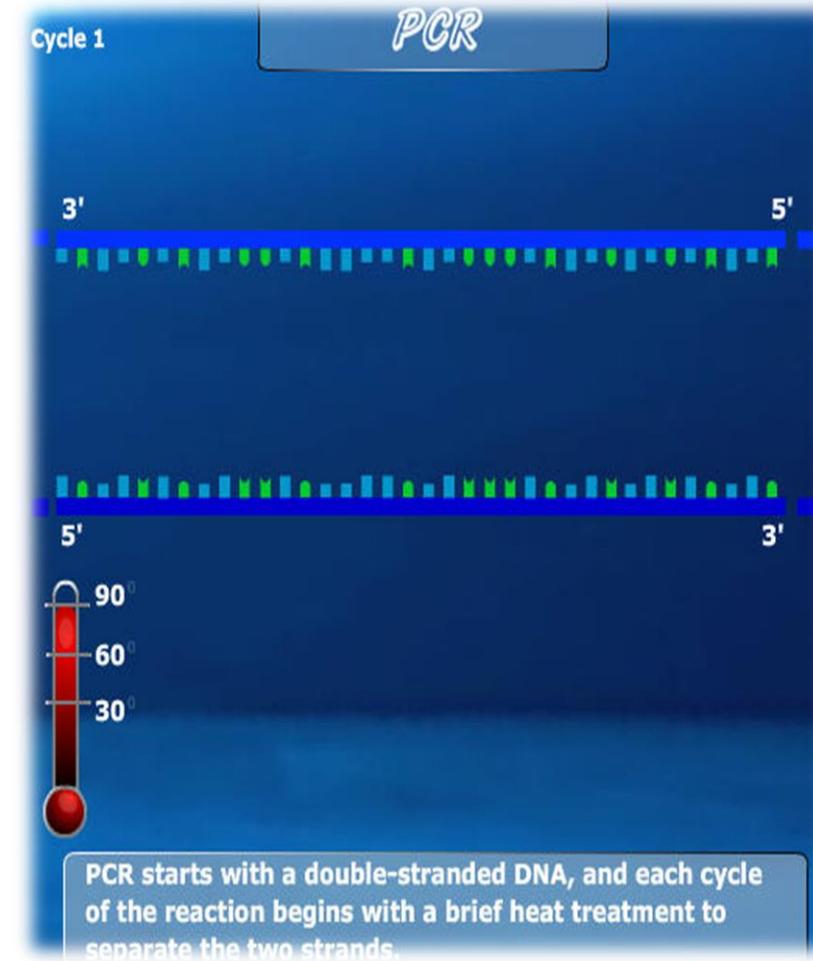
Для постановки ПЦР реакции необходимо:

- **ДНК-матрица**, содержащая тот участок ДНК, который требуется амплифицировать.
- **Два праймера**, комплементарные противоположным концам разных цепей требуемого фрагмента ДНК.
- **Термостабильная ДНК-полимераза** — фермент, который катализирует реакцию полимеризации ДНК. Полимераза для использования в ПЦР должна сохранять активность при высокой температуре длительное время, поэтому используют ферменты, выделенные из термофилов.
- **Дезоксинуклеозидтрифосфаты.**
- **Ионы Магния**, необходимы для работы полимеразы.



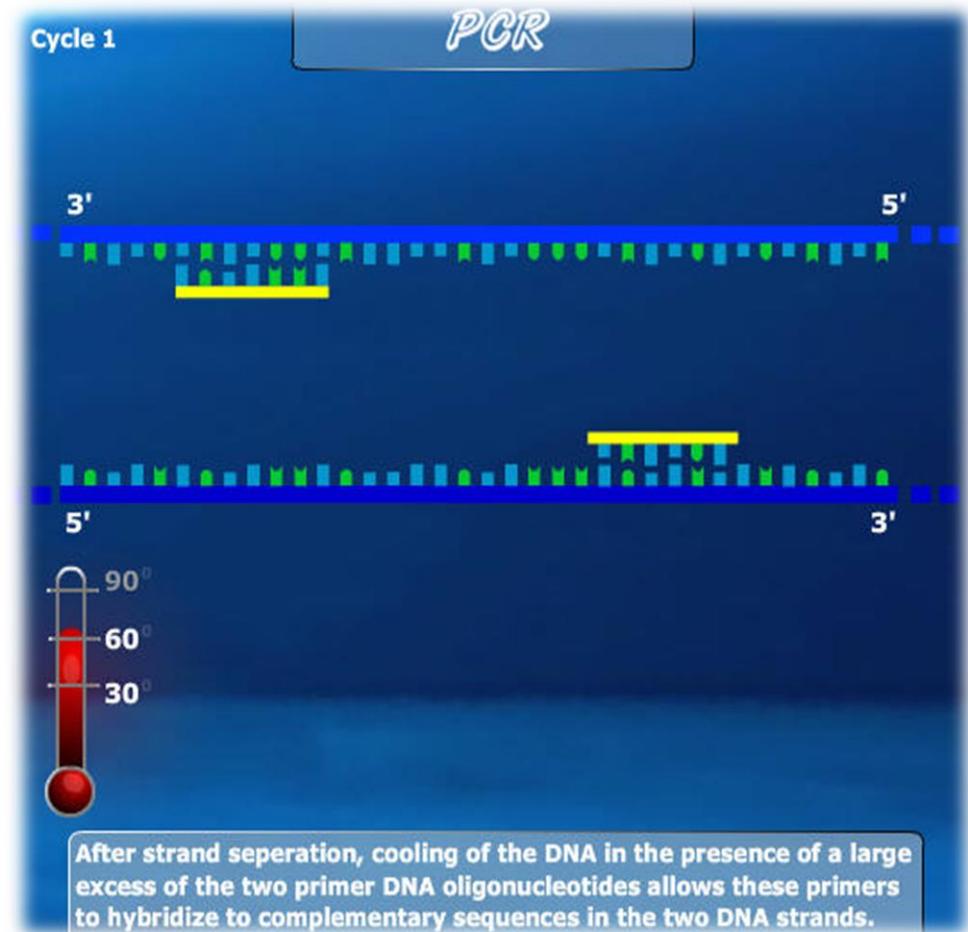
Денатурация

- Двухцепочечную ДНК-матрицу нагревают до $94\text{—}96^\circ\text{C}$ на $0,5\text{—}2$ мин., чтобы цепи ДНК разошлись.
- Разрушаются водородные связи между двумя цепями ДНК.



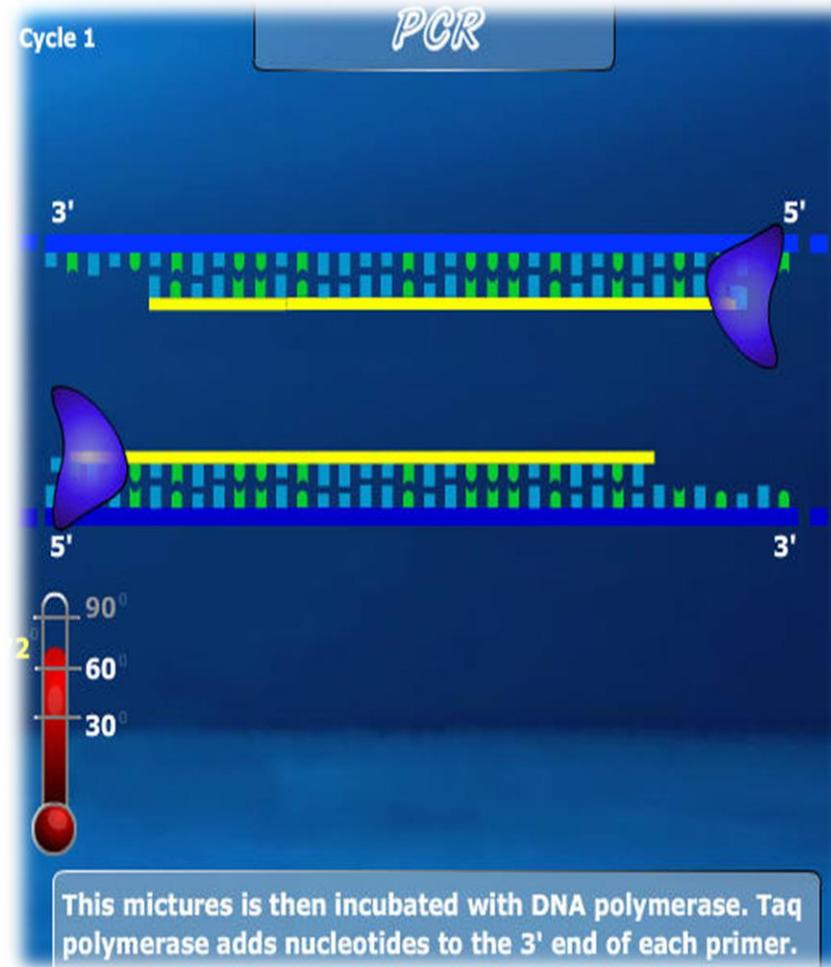
Ренатурация (Отжиг)

- Когда цепи разошлись, температуру понижают, чтобы праймеры могли связаться с одноцепочечной матрицей.
- Температура отжига зависит от состава праймеров. Время стадии — 0,5—2 мин.
- Неправильный выбор температуры отжига приводит либо к плохому связыванию праймеров с матрицей, либо к связыванию в неверном месте и появлению неспецифических продуктов.



Синтез (Элонгация)

- ДНК-полимераза реплицирует матричную цепь, используя праймер в качестве затравки.
- Полимераза начинает синтез второй цепи от 3'-конца праймера, который связался с матрицей, и движется вдоль матрицы.





Выводы

- При интерпретации результатов лабораторных и инструментальных исследований необходимо обращать внимание на результаты как трепонемных так и нетрепонемных тестов, использовать в работе их разновидности для установления правильного диагноза и назначения адекватного лечения согласно клиническим рекомендациям.
- Использование современных инструментальных методов диагностики является чрезвычайно важным в практике врача-дерматовенеролога.



Вопросы для самоконтроля

1. Какие трепонемные тесты вы знаете?
2. В чем суть и как проводится реакция РПГА?



Информационные источники

1. Портал КГМУ - <https://kazangmu.ru/>
2. Фриго Н.В., Жукова О.В., Сапожникова Н.А. Современные лабораторные методы и алгоритмы диагностики сифилиса. Клиническая дерматология и венерология. 2015;14(6):56-61. Frigo NV, Zhukova OV, Sapozhnikova NA. The modern laboratory methods and algorithms for the diagnosis of syphilis. Russian Journal of Clinical Dermatology and Venereology. 2015;14(6):56-61. (In Russ.) <https://doi.org/10.17116/klinderma201514656-61>
3. <https://ekolab.ru/>



СПАСИБО!