

СИФИЛИС: ПРОБЛЕМЫ ДИАГНОСТИКИ И ВОЗМОЖНОСТИ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ

*Гущин А.Е.¹, Родионова Е.Н.¹, Шипулин Г.А.¹, Кубанова А.А.²
Фриго Н.В.², Лосева О.К.², Ротанов С.В.², Топоровский Л.М.²*

Дударева Л.А.³, Воронова Н.Ю.⁴, Петрова Г.А.⁴, Зорькина М.В.⁴

*1 – ГУ ЦНИИ эпидемиологии МЗСР РФ, Центр молекулярной диагностики
инфекционных болезней*

2 – ГУ ЦНИКВИ МЗСР РФ

*3 – ГКБ №14 им. В.Г. Короленко
Москва*

*4 – ГУ ННИКВИ МЗСР РФ
Нижегород*

Сифилис - одна из наиболее серьезных инфекций, передаваемых половым путем, характеризующееся длительными стадийным течением и риском развития поздних осложнений. При этом приходится констатировать, что, несмотря на некоторую тенденцию к снижению, заболеваемость сифилисом в Российской Федерации по-прежнему находится на достаточно высоком уровне [1]. Среди различных причин, в том числе социальных и экономических, следует указать на недостаточную эффективность современных алгоритмов диагностики, приводящую к выявлению сифилиса на поздних сроках заболевания. При этом известно, что успех антибактериальной терапии сифилиса, как и для большинства других бактериальных инфекций, во многом определяется сроком заболевания - при более поздних формах сифилиса требуется более высокая доза антибиотика и более длительный курс лечения. Но даже в этом случае эффективность лечения ниже по сравнению с эффективностью лечения на ранних сроках заболевания. Поэтому одной из приоритетных задач следует считать наиболее раннее установление этиологии инфекции с целью назначения своевременной и эффективной терапии.

Большинство отечественных и зарубежных авторов сходятся во мнении, что, несмотря на существование характерных патоморфологических признаков сифилиса (первичная сифилома, регионарный лимфоаденит), клинический диагноз обязательно требует лабораторного подтверждения [2,3].

Основой лабораторной диагностики сифилиса считаются серологические тесты на выявление антител к трепонемным и нетрепонемным антигенам. Несмотря на то, что впервые антитела к антигенам *T. pallidum* начинают появляться со второй недели после инфицирования, современные рутинные серологические тесты пока не обладают необходимой чувствительностью, прежде всего на ранних сроках заболевания [4]. Поскольку в раннем периоде болезни возбудитель активно размножается в очаге инфицирования, то ключевым элементом в установлении этиологии инфекции является прямое обнаружение возбудителя. В отсутствие культивирования в условиях искусственных питательных сред микроскопическая идентификация *T. pallidum* (темнополюсная микроскопия, ТПМ) остается единственным прямым лабораторным тестом. Но и в случае микроскопического теста ограничениями являются сравнительно низкая чувствительность (не менее 10^5 клеток/ в мл) и необходимость в наличии подвижных микроорганизмов [5]. В условиях применения пациентами различных антибактериальных препаратов, в том числе по поводу сопутствующих заболеваний, диагностическая чувствительность ТПМ снижается. С другой стороны, этиологическим агентом эрозивно-язвенных поражений могут выступать другие инфекционные агенты – в первую очередь вирус простого герпеса, а также ряд других бактериальных агентов. Нередки случаи наличия в отделяемом эрозивно-язвенных поражений *T. pallidum* и HSV1/2. Следовательно, в рамках решения задачи ранней диагностики сифилиса следует решать и задачу дифференциальной диагностики инфекционных агентов.

Одним из решений задачи увеличения информативности лабораторной диагностики – создание высокочувствительных и специфичных прямых тестов на основе молекулярно-биологических технологий.

Разработка и внедрение в последние годы технологий амплификации нуклеиновых кислот, в частности полимеразной цепной реакции (ПЦР) значительно увеличило возможности лабораторной диагностики, в том числе инфекций, передаваемых половым путем. К основным достоинствам метода относят высокую чувствительность, специфичность, независимость от «культивируемости» возбудителей *in vitro*, возможность одновременной диагностики разных возбудителей. В ЦНИИЭ МЗСР РФ совместно с ГУ ЦНИКВИ МЗСР РФ, ГКБ №14 им В.Г. Короленко (г. Москва), ГУ ННИКВИ МЗСР РФ (г. Нижний Новгород) проводится комплексная научно-методическая работа по разработке алгоритмов диагностики сифилиса с использованием молекулярно-биологических технологий. Создана тест-система «Амплисенс *Treponema pallidum*», предназначенная для выяв-

ления ДНК возбудителя в материале, полученном из эрозивно-язвенных поражений. Как было показано ранее, аналитическая чувствительность тест-системы составила около 400 ГЭ/л, что почти в 1000 раз выше аналитической чувствительности ТПМ [6]. Проведенные лабораторные испытания на клиническом материале (соскобы из высыпных элементов кожи и слизистых) показали, что при первичном сифилисе в *T. pallidum* обнаруживалась в 100% случаев, то время как по данным ТПМ - в 92% случаев. При вторичном сифилисе частота выявления возбудителя составила 87% и 51% с использованием ПЦР и ТПМ соответственно. У 2 больших скрытым сифилисом при клиническом осмотре были обнаружены эрозии шейки матки. В отделяемом эрозий темнопольная микроскопия дала отрицательный результат, а в ПЦР была выявлена ДНК *T. pallidum*. При исследовании спектра инфекционных агентов из отделяемого язвенных поражений на слизистых урогенитального тракта, кроме *T. pallidum*, обнаруживался вирус простого герпеса, а также *N.gonorrhoeae* и *T.vaginalis* [7]. Разработанная тест-система прошла государственные испытания в ГУ ЦНИКВИ МЗ СР, подтвердившие ее высокие аналитические характеристики.

В рамках научно-исследовательской работы у пациентов с различными формами сифилиса были исследованы образцы плазмы крови на наличие ДНК и РНК *T. pallidum*. Исследования показали зависимость частоты выявления нуклеиновых кислот от стадии болезни. При первичном сифилисе ДНК была обнаружена у 21 пациента из 22 (95,6%), РНК у всех (100%). При вторичном сифилисе ДНК определялась в плазме у 107 пациентов из 153 обследованных (70%), РНК - у 121 (79%). При скрытом раннем сифилисе только у 11 из 81 (13%) пациентов удалось обнаружить ДНК и еще у троих - РНК (17%) [6]. Потенциально информативным материалом может служить пунктат лимфатических узлов. При тестировании с помощью ПЦР пунктата ЛУ от 5 пациентов со вторичным сифилисом во всех случаях результаты были положительными. В тоже время в материале с кожных элементов у этих пациентов ДНК определялась у 4 пациентов, а результаты ТПМ были положительны только у трех пациентов.

Разработка технологии Real-time PCR (ПЦР с детекцией продукта в режиме реального времени, ПЦР-РРВ) позволяет проводить не только качественный ПЦР-анализ, но и количественное определение ДНК возбудителя. Так, с помощью разработанной нами количественной технологии на основе ПЦР-РРВ была установлена достаточно низкая концентрация *T. pallidum* в плазме крови - в среднем несколько тысяч микроорганизмов в 1 мл [8]. Несмотря на то, что определение нуклеиновых кислот в плазме крови пациентов может иметь дополнительное прогностическое значение, особенно в серонегативный период и при отсутствии кожных проявлений, при таком низком титре *T. pallidum* требуется высокая аналитическая чувствительность тест-систем и высок риск ложноотрицательных резуль-

татов. Количественная технология ПЦР-РПВ может быть использована при исследовании динамики диссеминации *T. pallidum* при моделировании сифилиса с использованием лабораторных животных.

В заключение следует подчеркнуть, что в рамках совершенствования алгоритмов лабораторной диагностики сифилиса ТПМ остается наиболее простым, быстрым и дешевым способом прямого выявления *T. pallidum* с поверхности сифилидов эрозивно-язвенного характера. Однако в случае отрицательных и сомнительных результатов ТПМ, особенно при негативных серологических реакциях, целесообразно использовать ПЦР как более чувствительный метод, позволяющий, при необходимости, расширить спектр тестируемых микроорганизмов из того же клинического материала.

Литература.

1. Аверина В.И., «Эффективность выявления больных сифилисом и гонореей урологических учреждениями России и ее федеральных округах в 1995 и в 2001 годах», Вестник последипломного медицинского образования, 2003, №1, С.66-68
2. Скрипкин Ю.К., Мордовцев В.Н. с коллективом авторов, «Кожные и венерические болезни»: Руководство для врачей. «Медицина» 1999г.
3. DiCarlo R.P., Martin D.H. «The clinical diagnosis of genital ulcer disease in men» Clin. Infect. Dis. 1997., V25., PP.292-298.
4. Родионов А.Н., «Сифилис»: Руководство для врачей», Издательство «Питер», 2000 г.
5. Liu H., Rodes B., Chen C.-Y., Steiner B. New tests for syphilis: rational design of a PCR method for detection of *Treponema pallidum* in clinical specimens using unique regions of the DNA polymerase I gene. // J. Clin. Microbiol. – 2001. – V. 39, N 5. – P. 1941-1946.
6. Родионова Е.Н., Гушин А.Е., Шипулин Г.А., с соавт., «Выявление ДНК и РНК *Treponema pallidum* в клиническом материале у пациентов с различными стадиями сифилиса» ЖМЭИ, 2003., №3, С.43-50
7. Воронова Н.Ю., Петрова Г.А., Зорькина М.В., с соавт., «Генодиагностика инфекционных болезней» 5-я Всероссийская научно-практическая конференция 2004г. Тезисы конференции.
8. Гушин А.Е., «Перспективы использования ПЦР в диагностике сифилиса», I-й Российский Конгресс Дерматовенерологов, 2003, Тезисы научных работ, Т. II, С.6