

На правах рукописи

**ЭРМАТОВА ФОТИМА АБДУЖАЛИЛОВНА**

**ДИАГНОСТИКА РАННИХ ФОРМ СИФИЛИСА НА ОСНОВЕ  
ОПРЕДЕЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ**

**КЛАССА М**

**(клинико-лабораторное исследование)**

**14.01.10 – кожные и венерические болезни**

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

**Москва – 2014**

Работа выполнена на кафедре дерматовенерологии лечебного факультета ГБОУ ВПО Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Минздрава России, г. Москва.

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, доцент **РОТАНОВ Сергей Владимирович**

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук, профессор  
профессор кафедры кожных и венерических  
болезней им. В.А. Рахманова лечебного факультета  
ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова

Минздрава России

**ЛОМОНОСОВ Константин Михайлович**

доктор медицинских наук, профессор  
зав. кафедрой клинической биохимии и  
лабораторной диагностики  
«Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова»  
Министерства обороны Российской Федерации

...

**ИВАНОВ Андрей Михайлович**

**Ведущее научное учреждение:** ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Минздрава России (г. Санкт-Петербург).

**Защита диссертации состоится** «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ **2015 года** на заседании Диссертационного совета Д 208.115.01 при ФГБУ «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии» Минздрава России по адресу: 107076; г. Москва, ул. Короленко дом 3, строение 6.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России.

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ **2015 г.**

**Учёный секретарь диссертационного совета**

кандидат медицинских наук

**КАРАМОВА Арфеня Эдуардовна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Сифилис является антропонозной бактериальной инфекцией, вызываемой *Treponema pallidum*. Для микроорганизма характерен невысокий уровень метаболизма, что обуславливает длительный цикл его развития: период времени от одного деления микроорганизма до последующего занимает в среднем около 33-34 часов (Р.Р. Уилкоккс, 1981). Указанное обстоятельство находит своё отражение в затяжном течении инкубационного периода (в среднем 3-4 недели), медленном и постепенном развитии клинических признаков заболевания.

В ответ на размножение *T. pallidum* в организме больного происходит активация защитных реакций с преимущественным участием гуморального звена адаптивного иммунитета, проявлением чего на ранних этапах развития заболевания является выработка иммуноглобулинов класса М (Кашкин К.П., 2004; Хаитов Р.М., 2009; Young Н., 1992, 2000; Egglstone S.I., Turner A.J.L., 2000).

В значимых количествах трепонемоспецифические IgM в крови больных сифилисом определяются не ранее 10-14 дней после инфицирования, а максимальное их содержание наблюдается на 6-9 неделях заболевания, что соответствует срокам окончания периода сифилиса первичного и сифилису вторичному свежему (Иванов А.М., 2007; Красносельских Т.В. и Соколовский Е.В., 2010; Luger A. 1998; Goh B.T., 2001, 2005).

При сифилисе вторичным содержание специфических IgM в крови медленно понижается; при этом происходит переключение характера иммунного ответа с выработки антител класса М на продукцию трепонемоспецифических IgG и IgA. Специфические IgG к *T. pallidum* в крови больных сифилисом появляются позднее IgM: на 3-4 неделе после заражения; их содержание быстро увеличивается и достигает существенно более высоких уровней по сравнению с IgM. Максимальные уровни IgG в крови больных определяют через 1-1,5 года, после чего они несколько понижаются, подвергаясь волнообразным колебаниям в зависимости от обострения или стихания клинического течения заболевания (Ляхов В.Ф., 1990; Ткачев В.К. и Вяткина Т.Г., 2005; Baker-Zander S.A. et al., 1986).

Для выявления больных сифилисом, а также установления клинической формы заболевания в настоящее время широко используют иммунохимические (серологические) исследования, основанные на определении в крови специфических Ig против характерных для *T. pallidum* антигенных детерминант. Современные лабораторные методы позволяют выявлять трепонемоспецифические антитела классов М, G и А в виде суммарного пула или дифференцированно

IgG или IgM (Ломоносов К.С., 2002; Фриго Н.В., 2006, 2009; Фахретдинова Х.С. и др., 2010; Young H., 1992, 2000; STI: UK Guidelines, 2006, 2008).

Диагностике клинических форм сифилиса с использованием результатов выявления у больных пула специфических антител разными методами посвящено значительное количество научных исследований (Приказ МЗ РФ №87, 2001; Китаева Н.В. и др. 2008; Larsen S. et al., 1995, 1998).

Дифференцированное определение антитрепонемных антител разных классов у больных сифилисом стало возможным благодаря развитию технологий получения на лабораторных животных высокоспецифичных моноклональных антител, сенсibilизированных к несвязанному Fc-фрагменту молекулы IgG или к  $\mu$ -форме тяжелой аминокислотной цепи в структуре IgM (Ляхов В.Ф. и др., 1990; Сидорова Е.В. и др., 1995; Ткачев В.К. и Вяткина Т.Г., 2005).

Клиническое значение выявления специфических IgM при диагностике сифилиса изучено недостаточно, что было обусловлено трудностями разработки высокочувствительных технологий для их определения. Разработка наборов реагентов российского производства для выявления трепонемоспецифических IgM в РИФ<sub>abc</sub> или ИБ позволили осуществить выполнение настоящей работы.

### **Цель исследования**

Совершенствование диагностики ранних клинических форм сифилиса на основании изучения информативности медицинских технологий определения специфических иммуноглобулинов класса М к антигенам *T. pallidum*.

### **Задачи исследования:**

1. Оценить частоту применения современных иммунохимических методов исследования для ранней диагностики сифилиса в медицинских организациях дерматовенерологического профиля субъектов Российской Федерации.

2. Для диагностики клинических форм сифилиса изучить информативность использования результатов (по ГОСТ Р 53022.3-2008) иммуноферментного анализа, реакции непрямой иммунофлюоресценции и линейного иммуноблоттинга с определением трепонемоспецифических антител класса М на примере наборов реагентов российского производства.

3. У больных сифилисом первичным изучить особенности содержания в крови антител классов М и G к антигенам *T. pallidum* с использованием метода линейного иммуноблоттинга.

4. У пациентов, получивших специфическое лечение по поводу ранних форм сифилиса, изучить длительность циркуляции в крови трепонемоспецифи-

ческих иммуноглобулинов класса М.

5. Разработать алгоритм обследования пациентов для диагностики ранних клинических форм сифилиса с использованием современных иммунохимических методов исследования на основе определения IgM к антигенам *T. pallidum*.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Установлено, что при диагностике ранних клинических форм сифилиса в специализированных медицинских организациях дерматовенерологического профиля субъектов Российской Федерации недостаточно используются современные иммунохимические исследования, основанные на выявлении специфических антител класса М к антигенам *T. pallidum*.

2. Определена клиническая информативность применения современных иммунохимических тестов для диагностики сифилиса (ИФА<sub>IgM</sub>, РИФ<sub>abc-IgM</sub> и ИБ-IgM) в соответствии с требованиями ГОСТ Р 53022.3-2008, включающими оценку показателей клинической чувствительности и специфичности, диагностической эффективности, предсказательной ценности положительных и отрицательных результатов, на примере отечественных наборов реагентов.

3. У больных сифилисом первичным установлены разные профили иммунологической реактивности к основным иммунодоминантным антигенам бледной трепонемы (TrpN15, TrpN17, TrpA и TrpN47), используемым при диагностике сифилиса методами ИБ-IgM и ИБ-IgG.

4. У больных, получивших адекватное антибактериальное лечение по поводу ранних клинических форм сифилиса, современными иммунохимическими методами в крови длительное время могут определяться трепонемоспецифические антитела класса М; полное исчезновение указанных антител у всех пациентов происходит к сроку наблюдения около 3 лет.

5. Разработан алгоритм обследования больных ранними формами сифилиса с применением современных методов лабораторного исследования путём определения в крови антител класса М к иммунодоминантным антигенам *T. pallidum*.

#### **Научная новизна исследований**

Впервые в медицинских организациях дерматовенерологического профиля субъектов Российской Федерации оценена частота использования для диагностики ранних форм сифилиса современных иммунохимических методов исследований (ИФА, РИФ и ИБ) с определением специфических IgM, IgG дифференцированно или суммарно (IgG+IgM+IgA).

Впервые охарактеризована по ГОСТ Р 53022.3-2008 клиническая информативность применения современных иммунохимических методов исследования (ИФА, РИФ и ИБ) путём определения специфических IgM к антигенам *T. pallidum* на примере наборов реагентов российских производителей.

Впервые установлено, что на начальных этапах развития сифилитической инфекции у больных преобладает гуморальный ответ только на один из антигенов *T. pallidum* (TpN15, TpN17, TmpA и TpN47), применяемых для лабораторных исследований, и определена частота развития разных профилей иммунологической реактивности.

Впервые разработан алгоритм обследования пациентов для диагностики ранних клинических форм сифилиса с использованием иммунохимических методов определения трепонемоспецифических IgM, основанный на клинической информативности этих методов и особенностях гуморального иммунитета на начальных этапах развития инфекции, который предложен к внедрению в медицинские организации дерматовенерологического профиля России.

### **Практическая значимость работы**

Применение разработанного алгоритма обследования пациентов современными иммунохимическими методами для определения трепонемоспецифических антител класса М направлено на своевременную диагностику ранних клинических форм сифилиса при оказании специализированной медицинской помощи по профилю дерматовенерология.

Установленные показатели клинической информативности разных иммунохимических исследований с выявлением специфических IgM к *T. pallidum* (ИФА, РИФ<sub>abc</sub> и ИБ) позволили осуществить сопоставление и обоснованный выбор наиболее чувствительного метода исследования для диагностики первичного и вторичного сифилиса.

Вариативность развития гуморального иммунного ответа на разные антигены бледной трепонемы (TpN15, TpN17, TmpA и TpN47) у больных первичным сифилисом необходимо учитывать при оценке результатов иммунохимических исследования при диагностике сифилиса.

### **Внедрение результатов исследования:**

Результаты проведенных исследований по применению современных иммунохимических тестов определения специфических IgM для своевременной диагностики ранних клинических форм сифилиса, включены в учебные программы преподавания:

- на циклах общего и тематического усовершенствования в системе последипломной подготовки врачей дерматовенерологов и врачей клинической лабораторной диагностики в ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России;

- в курсе дерматовенерологии на кафедре дерматовенерологии лечебного факультета ГБОУ ВПО РНИМУ имени Н.И. Пирогова Минздрава России.

Разработанный порядок обследования с использованием современных методов определения трепонемоспецифических антител класса М применяют в консультативно-диагностическом центре ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России при диагностике раннего сифилиса.

### **Апробация материалов диссертации**

Материалы диссертации были доложены и обсуждены на Научно-практической конференции, организованной Минздравом Республики Башкортостан (г. Уфа, 2012), V Всероссийском конгрессе дерматовенерологов и косметологов (г. Казань, 2013), VIII Международной (XVII Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых (г. Москва, 2013), Научно-практической конференции врачей клинической лабораторной диагностики и дерматовенерологов Ярославской области (г. Ярославль, 2013).

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из введения и 7 глав, включающих обзор литературы, характеристику материалов и методов, результаты собственных исследований, а также заключения, выводов, списка литературы и приложения.

Работа изложена на 168 листах компьютерного текста, включает библиографический список из 160 источников (106 отечественных и 54 зарубежных), 25 рисунков, 23 таблицы и 10 приложений.

### **Личный вклад автора в проведенное исследование**

Автором самостоятельно подготовлен обзор отечественных и зарубежных источников научной литературы и разработан дизайн исследования; создана анкета, проведен опрос и изучение данных, предоставленных из медицинских организаций дерматовенерологического профиля субъектов России; сформированы опытная и контрольная группы исследования, образцы крови пациентов этих групп изучены в ИФА, РИФ и ИБ для диагностики сифилиса; проведены интерпретация, систематика и анализ полученных данных, расчёты и сравнительная оценка клинической информативности изучавшихся лабораторных методов. Разработан алгоритм обследования для диагностики ранних клинических форм сифилиса с использованием медицинских технологий, основанных на выявле-

нии трепонемоспецифических антител класса М. Диссертантом сформулированы выводы и практические рекомендации, установлены новизна и практическая значимость результатов проведенных научных исследований.

### **Публикации**

По материалам научных исследований, представленным в диссертации, опубликованы 9 печатных работ: из них 5 (в том числе 3 научные статьи) в изданиях, рекомендуемых ВАК Минобрнауки Российской Федерации.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы исследования**

На разных этапах выполнения работы в качестве материалов и объектов изучения были использованы:

- 60 заполненных анкет, полученных в 2013 году при опросе серологических лабораторий и клинических отделений специализированных медицинских дерматовенерологических организаций 83 субъектов Российской Федерации;
- данные официальной государственной статистической отчетности Минздрава России о заболеваемости населения ранним сифилисом в 2012 году;
- 492 больных сифилисом с впервые в жизни установленным диагнозом до проведения антибактериальной терапии (основная опытная группа); в том числе: сифилис первичный - 79, вторичный - 205, скрытый ранний - 114, скрытый неуточнённый как ранний или поздний - 62, скрытый поздний – 32;
- 341 больных ранними клиническими формами сифилиса после проведения им антибактериального лечения в сроки наблюдения от 3 месяцев до 3 лет (дополнительная опытная группа); в том числе: сифилис первичный - 30, вторичный - 148 и скрытый ранний – 163;
- 153 пациента без указаний на наличие активного или перенесенного ранее сифилиса (контрольная группа); в том числе: от 123 активных доноров крови и от 30 лиц с БЛПР в лабораторных тестах на сифилис.

### **Методы исследования:**

- социологический (анкетный) опрос специалистов медицинских организаций дерматовенерологического профиля субъектов Российской Федерации;
- иммунохимические (серологические) исследования для диагностики сифилиса: ИФА<sub>(IgM+IgG+IgA)</sub> («РекомбиБест антипаллидум - суммарные антитела», кат. № D-1854-6, РУ №ФСР 2007/00614 от 17.08.2007; ЗАО «Вектор-Бест», Россия); ИФА<sub>IgM</sub> («ИФА-АНТИ-ЛЮИС-М», кат. № L-154-5, РУ № РЗН 2013/126

от 26.02.2013; ООО «НПО «Диагностические системы», Россия); РИФ<sub>abc</sub> («ЛюмиБест антипаллидум», кат. № D-1812, РУ № ФСР 2007/13695 от 30.07.2012; ЗАО «Вектор-Бест», Россия); РИФ<sub>abc</sub>-IgM («Антипаллидум-Флюороген-IgM» кат. № 03.04.02, РУ № РЗН 2013/247 от 28.02.2013; ЗАО «ЭКОлаб», Россия); ИБ-IgG/IgM («Лайн-Блот Сифилис» кат. № 03.22.2-3 № РЗН 2014/1657 от 05.06.2014; ЗАО «ЭКОлаб», Россия); ИБ-IgM («*recomBlot* Treponema IgM», РУ № ФС 2006/2221 от 26.12.2006; «Mikrogen® GmbH», Германия);

- оценка клинической информативности клинических лабораторных методов исследований в соответствии с требованиями по ГОСТ Р 53022.3-2008;

- статистическая обработка результатов исследований проведена в соответствии с требованиями по ГОСТ Р 50779.10-2000.

## Результаты исследования и их обсуждение

### 1. Применение методов определения трепонемоспецифических IgM при диагностике сифилиса в Российской Федерации

При проведении анкетного опроса 83 специализированных дерматовенерологических медицинских организаций субъектов России о применении при диагностике раннего сифилиса лабораторного обследования и количестве выполненных в 2012 году исследований разными методами заполненные анкеты были получены от 60 (72,3%) медицинских организаций всех 8 Федеральных округов России. В 7 из 8 ФО в опросе приняли участие от 54,5 до 85,7% медицинских организаций, а в 1-м (ЮФО) - только 33,3%, что позволило нам оценить представленные данные как репрезентативные, в полной мере характеризующие состояние проблемы как большинству ФО, так и по России в целом.

Установлено, что для диагностики сифилиса в обследованных организациях применяется обследование современными лабораторными методами: ИФА – в 100%, а РИФ – в 75,00%, в то время как ИБ – только в 28,33%. Количество исследований, выполненных каждым методом, отличается. Исследования в ИФА составили значительную часть – 23,08% от общего количества иммунохимических тестов, а в РИФ и в ИБ – только по 1,36 и 0,03% соответственно (табл. 1).

Таблица 1.

**Структура иммунохимических исследований для диагностики сифилиса, выполненных в 2012 году в лабораториях дерматовенерологических организаций субъектов Российской Федерации, принявших участие в исследовании**

Показатель	Методы иммунохимических исследований										
	РМП	РПР	РСК <sub>T</sub>	РСК <sub>K</sub>	ИФА	РПГА	РИФ	ИБ	ИХЛ	РИТ	ВСЕГО
Кол-во исследований (в %)	43,57	3,53	10,84	10,70	23,08	6,75	1,36	0,03	0,09	0,07	100

Среди всего объёма иммунохимических исследований для диагностики сифилиса IgM-тесты составили всего 1,30%, в их структуре преобладали исследования в ИФА<sub>IgM</sub> - 97,27%, лишь небольшую часть составили исследования в РИФ-IgM и ИБ-IgM – по 2,0 и 0,73% соответственно, что являлось отражением отсутствия производственного выпуска доступных наборов реагентов российского производства для РИФ<sub>abc</sub>-IgM и ИБ-IgM, в то время как наборы реагентов для ИФА<sub>IgM</sub> были представлены в широком ассортименте, а сам метод используется в лабораториях в течение длительного времени.

Интересные данные получены при оценке доли применения модификаций методов с определением антител класса М при диагностике сифилиса (рис. 1).

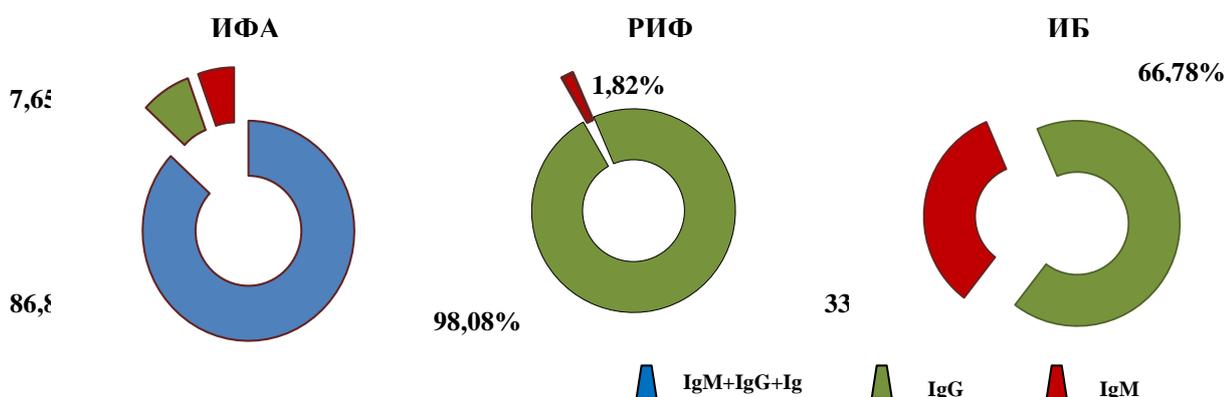


Рис.1. Соотношение количества определений антитрепонемных антител разных классов, выполненных разными методами в лабораториях дерматовенерологических организаций в 2012 году.

Исследования в ИФА<sub>IgM</sub> составили 5,47% от всех исследований методом ИФА, в РИФ<sub>abc</sub>-IgM - 1,82% от всех исследований в РИФ, в то время как в ИБ-IgM - 33,22% от всех исследований методом ИБ. Выявленные положения подтвердили актуальность нашего исследования, так как продемонстрировали реальную потребность практического здравоохранения в применении методов детекции антитрепонемных IgM для диагностики сифилиса.

Для количественной характеристики указанной потребности нами был осуществлён расчёт количества выполненных в лабораториях исследований каждым методом в пересчете на один вновь выявленный в 2012 году клинический случай раннего сифилиса. Установлено, что при обследовании населения и постановке клинического диагноза раннего сифилиса по России в целом проводили 6,86 исследований с определением IgM к антигенам *T. pallidum*, в том числе: в ИФА<sub>IgM</sub> – 6,68 в РИФ<sub>abc</sub>-IgM – 0,14, а в ИБ-IgM – 0,05 исследований.

Анализ частоты применения указанных диагностических лабораторных методик показал, что в 2012 году они наиболее интенсивно применялись в регионах с наиболее высокими уровнями заболеваемости населения сифилисом: в

ЦФО, ПрФО, СЗФО, ДВФО и СФО (по 7,91; 7,90; 6,86; 6,67 и 6,54 исследований соответственно), в которых было установлено по 3 796, 6 392, 1 130, 3 043 и 6 7058 случаев раннего сифилиса соответственно. В то время как в ФО с более низкими показателями заболеваемости ранним сифилисом: УФО, СКФО и ЮФО (по 1 574, 922 и 829 случаев) исследований с определением трепонемоспецифических IgM было проведено по 4,21; 5,28 и 4,19 ед. в расчете на 1 вновь диагностированный случай раннего сифилиса.

## 2. Оценка информативности ИФА<sub>IgM</sub> при диагностике сифилиса

При аттестации 492 образцов опытной группы (больные сифилисом до лечения) в ИФА(IgG+IgM+IgA) было получено 98,98% положительных результатов (при сифилисе первичном - 97,47%, при вторичном и скрытом раннем - по 100%, при скрытом неуточнённом как ранний или поздний - 96,77% и при скрытом позднем - 96,88%); отрицательные результаты наблюдали с 1,02% образцов.

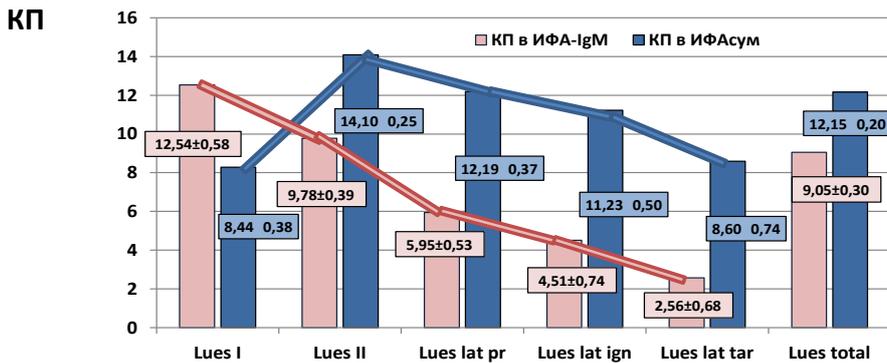
Исследование этих сывороток крови опытной группы в ИФА<sub>IgM</sub> выявило присутствие специфических IgM к *T. pallidum* (положительные результаты) только в 76,83% образцов: при сифилисе первичном – в 97,47%, при вторичном – в 93,66%, скрытом раннем – в 62,28%, скрытом неуточнённом как ранний или поздний – в 53,23% и скрытом позднем – в 15,63% случаев. С 23,17% образцов крови опытной группы в ИФА<sub>IgM</sub> были получены отрицательные результаты исследования, свидетельствовавшие об отсутствии в них значимых количеств трепонемоспецифических IgM (табл. 2).

Таблица 2.

Результаты определения в ИФА антител к *T. pallidum* у больных сифилисом

Клиническая форма сифилиса	Результаты исследования			
	Количество положительных результатов в тестах (абс / %)		Оценка содержания антител по КП (M±m)	
	ИФА <sub>IgG+IgM+IgA</sub>	ИФА <sub>IgM</sub>	ИФА <sub>IgG+IgM+IgA</sub>	ИФА <sub>IgM</sub>
Первичный n=79	77 / 97,47%	77 / 97,47%	8,44±0,38	12,54±0,58
Вторичный n=205	205 / 100%	192 / 93,66%	14,10±0,25	9,78±0,39
Скрытый ранний n=114	114 / 100%	71 / 62,28%	12,19±0,37	5,95±0,53
Скрытый неуточнённый как ранний или поздний n=62	60 / 96,77%	33 / 53,23%	11,23±0,50	4,51±0,74
Скрытый поздний n=32	31 / 96,88%	5 / 15,63%	8,60±0,74	2,57±0,68
<b>Всего больных сифилисом n=492</b>	<b>487 / 98,98%</b>	<b>378 / 76,83%</b>	<b>12,15 ±0,20</b>	<b>9,05±0,30</b>

Оценка содержания в образцах специфических IgM (по величине коэффициента позитивности аналитического сигнала в ИФА) соответствовала современным представлениям о динамике образования антител при бактериальных инфекциях: гуморальный иммунитет больного после инфицирования *T. pallidum* рано и активно дебютирует выработкой специфических IgM с постепенным переключением на более выраженный синтез антител класса G, а также A и одновременным снижением образования антител класса M (рис. 2).



## Диагноз

Рис. 2. Полуколичественная оценка содержания IgM и суммарно Ig(M+G+A) к *T. pallidum* в образцах опытной группы методом ИФА по коэффициенту позитивности.

Было установлено, что только при сифилисе первичном средний уровень КП в ИФА<sub>IgM</sub> (12,54±0,58) был достоверно выше, чем в ИФА<sub>(IgG+IgM+IgA)</sub> (8,44±0,38) ( $p < 0,01$ ); при постановке исследований для диагностики каждой последующей клинической формы сифилиса значения КП в ИФА<sub>IgM</sub> были достоверно ниже, чем в ИФА<sub>(IgG+IgM+IgA)</sub> ( $p < 0,01$ ).

Аттестация в ИФА<sub>(IgG+IgM+IgA)</sub> 123 сывороток крови от лиц без указаний на наличие сифилиса и 30 образцов с БЛПР (контрольная группа) показало отрицательные результаты определения антител во всех случаях.

Исследование в ИФА<sub>IgM</sub> 153 сывороток крови контрольной группы показало отрицательные результаты в 97,39% случаях и ложноположительные результаты в 2,61% случаях (с 1,63% сывороток крови в подгруппе здоровых доноров и с 6,67% – в подгруппе лиц с БЛПР).

Полученные данные позволили определить клиническую информативность исследований в ИФА<sub>IgM</sub> и ИФА<sub>(IgG+IgM+IgA)</sub> при диагностике сифилиса (по ГОСТ Р 55022.3-2008) и сопоставить их друг с другом. Анализ рассчитанных показа-

телей установил, что клиническая чувствительность и диагностическая эффективность исследований в ИФА<sub>IgM</sub> при диагностике сифилиса первичного достаточно высокие (97,47 и 97,41%) и соответствуют таковым при ИФА<sub>(IgG+IgM+IgA)</sub> (97,47 и 97,41% соответственно). В то же время эти показатели в ИФА<sub>IgM</sub> при сифилисе вторичном (93,66 и 95,25%) были ниже, чем в ИФА<sub>(IgG+IgM+IgA)</sub> (100 и 98,88%), а при скрытых формах сифилиса установленный разрыв в величине показателей становился более выраженным: при скрытом раннем - 62,28 и 82,40% против 100 и 98,50%, при скрытом неутонченном как ранний или поздний - 53,23 и 84,65% против 96,77 и 97,21% и при сифилисе скрытом позднем - 15,63 и 83,24% против 96,88 и 97,84%.

Клиническая специфичность исследований в ИФА<sub>IgM</sub> при диагностике сифилиса (97,39%) несколько уступала показателю в ИФА<sub>(IgG+IgM+IgA)</sub> (100%).

### 3. Определение информативности исследований в РИФ<sub>abc</sub>-IgM

Аттестация образцов крови больных опытной группы в РИФ<sub>abc</sub>(IgG) выявила положительные результаты в 98,17% случаях (при сифилисе первичном - в 94,94%, вторичном и скрытом раннем - по 100%, скрытом неутонченном как ранний или поздний - 95,16%, скрытом позднем - в 93,75%) и отрицательные результаты в 1,83% случаях (при сифилисе первичном - в 5,06%, скрытом неутонченном как ранний или поздний - в 4,84%, скрытом позднем - в 6,25%).

Аттестация в РИФ<sub>abc</sub>(IgG) образцов крови пациентов из группы контроля позволило получить 89,54% отрицательных и 10,46% слабоположительных результатов, из числа которых: 7,19% - с кровью здоровых доноров и 3,27% - с сыворотками крови, демонстрировавшими БЛПР.

Исследование в РИФ<sub>abc</sub>-IgM образцов крови больные сифилисом (опытная группа) позволило получить 75,41% положительных (95,89% - в подгруппе с сифилисом первичным, 89,50% - вторичным, 53,93% - скрытым ранним, 42,11% - скрытым неутонченном как ранний или поздний и 26,09% - скрытым поздним) и 24,59% отрицательных результатов (при сифилисе первичном - 4,29%, при вторичном - 10,50%, при скрытом раннем - 46,07%, при неутонченном как ранний или поздний - 57,89% и при скрытом позднем - с 73,91%).

Изучение в РИФ<sub>abc</sub>-IgM сывороток крови, полученных от лиц без сифилиса (группа контроля) было выявлено 86,30% отрицательных и 13,70% ложноположительных результатов (5,77% - в подгруппе здоровых доноров крови и 33,33% - с образцами, представленными от лиц с БЛПР).

Полученные в этом разделе исследования результаты позволили нам рассчитать и в сравнительном аспекте охарактеризовать клиническую информа-

тивность исследований в РИФ<sub>абс</sub>(IgG) и РИФ<sub>абс</sub>-IgM при диагностике сифилиса.

Только при сифилисе первичном клиническая чувствительность РИФ<sub>абс</sub>-IgM (95,89%) превышала соответствующий показатель в РИФ<sub>абс</sub>(IgG) (94,94%). При сифилисе вторичном, скрытом раннем, скрытом неуточнённом как ранний или поздний и скрытом позднем клиническая чувствительность исследований в РИФ<sub>абс</sub>(IgG) была достоверно выше соответствующих показателей в РИФ<sub>абс</sub>-IgM (100; 100; 95,16 и 93,75% против 89,50; 53,93; 42,11 и 26,09%).

Клиническая специфичность исследований в РИФ<sub>абс</sub> при диагностике сифилиса составила: при РИФ<sub>абс</sub>(IgG) - 89,54% и при РИФ<sub>абс</sub>-IgM - 86,30%.

При ранних манифестных формах сифилиса диагностическая эффективность применения методики РИФ<sub>абс</sub>-IgM была достаточно высокой: при сифилисе первичном и вторичном - 91,10 и 88,64%; однако при скрытых формах инфекции она была недостаточной - 68,52-71,88%. Более высокая частота получения неспецифических положительных результатов в РИФ<sub>абс</sub>-IgM по сравнению с РИФ<sub>абс</sub> (IgG) обусловила также отставание показателя диагностической эффективности РИФ<sub>абс</sub>-IgM при всех формах сифилиса (77,02%) в сравнении с РИФ<sub>абс</sub> (IgG) (96,74%); так же соотносились между собою показатели диагностической эффективности при отдельных клинических формах инфекции: при сифилисе первичном, вторичном, скрытом раннем, скрытом неуточнённом как ранний или поздний и скрытом позднем диагностическая эффективность исследований в РИФ<sub>абс</sub>(IgG) была достоверно выше, чем в РИФ<sub>абс</sub>-IgM: 92,24; 95,53; 94,01; 90,74 и 90,80% против 91,10; 88,64; 68,52; 71,17 и 71,88%.

Предсказательная ценность получения положительного результата (ПЦ<sup>+</sup>) при определении IgM в РИФ<sub>абс</sub> при диагностике сифилиса (96,96%) была выше, чем при определении IgG (96,79%), эта же тенденция была характерна для исследований при сифилисе первичном и вторичном: в РИФ<sub>абс</sub>-IgM - 87,50 и 94,71% и в РИФ<sub>абс</sub> (IgG) 82,42 и 92,76%.

Предсказательная ценность отрицательного результата исследования (ПЦ<sup>-</sup>) в РИФ<sub>абс</sub> (IgG) при всех клинических формах сифилиса была выше, нежели в РИФ<sub>абс</sub>-IgM: при сифилисе первичном (97,16 и 95,45%), вторичном (100 и 75,00%), скрытом раннем (100 и 60,58%), скрытом неуточнённом как ранний или поздний (97,85 и 74,12%) и скрытом позднем (98,56 и 78,75%).

Полученные данные позволили обосновать показания к применению каждой модификации изучавшегося нами метода исследования.

#### **4. Определение информативности исследований в ИБ-IgM**

Исследования в ИБ-IgM и ИБ-IgG были проведены с 76 из 79 образцов

крови больных сифилисом первичным (из состава опытной группы) и 24 образцами сыворотки крови доноров (из состава контрольной группы).

В ИБ-IgM в опытной группе было получено 85,53% положительных, 10,84% неопределенных и 2,63% отрицательных результатов; в контрольной группе - 100% отрицательных результатов.

В результате исследования в ИБ-IgG образцов опытной группы получено 92,11% положительных, 6,58% - неопределенных и 1,31% отрицательный результат, а в контрольной группе - 100% отрицательных результатов.

Полученные результаты характеризовали клиническую чувствительность исследований в ИБ-IgM при сифилисе первичном на уровне 85,53%, в ИБ-IgG - 92,11%, клиническую специфичность обоих методов - по 100%, а показатели диагностической эффективности составили 89,00 и 94,00% соответственно.

Полученные нами данные также позволили определить информативность определения иммунных антител к каждому из 4 рекомбинантных антигенов *T. pallidum*, наносимых производителями наборов реагентов на стрипы для проведения иммуноблоттинга. При первичном сифилисе наибольшую клиническую чувствительность, клиническую специфичность и диагностическую эффективность имели результаты исследования в ИБ-IgM и ИБ-IgG с антигенами: TmpA (90,79; 100; 93,00% и 96,05; 100; 97,00% соответственно), TrN47 (75,00; 100; 81,00% и 93,42; 100; 95,00% соответственно) и TrN17 (71,05; 100; 78,00% и 78,95; 100; 84,00% соответственно), а минимальную - с TrN15 (35,53; 100; 51,00% и 57,90; 100; 68,00% соответственно).

## **5. Изучение особенностей образования антител к разным антигенам *T. pallidum* при первичном сифилисе**

При изучении в иммуноблоттинге 76 образцов сыворотки крови больных сифилисом первичным нами были установлено различные варианты спектра антител к антигенам *T. pallidum*, входящим в состав иммуносорбента (TrN15, TrN17, TrN37, TrN47 и TmpA). Это позволило придти к заключению, что на начальных этапах развития гуморального иммунитета при сифилисе наблюдается более выраженное содержание IgM только к одному из антигенов при существенно более низких уровнях антител против других.

Нами установлено, что у больных сифилисом первичным приоритет антителообразования в отношении антигена TmpA наблюдался наиболее часто - в 65,79% случаев, в то время как в отношении 3 других антигенов более выраженный антителогенез определяли значительно реже: к TrN17 - в 22,37%, к TrN47 - в 9,21% и к TrN15 - в 2,63% случаев. Нами не установленного выра-

женного иммунного ответа на антиген TrN37 у больных сифилисом первичным. Выявленную закономерность мы определили как варианты или профили иммунологической реактивности.

Сопоставление данных исследования в ИБ-IgM и ИБ-IgG позволило нам подтвердить справедливость установленного наблюдения, так как полуколичественная оценка содержания антител в отношении каждого из антигенов в условных единицах «плюсах» имела симметричную конфигурацию (рис. 3).

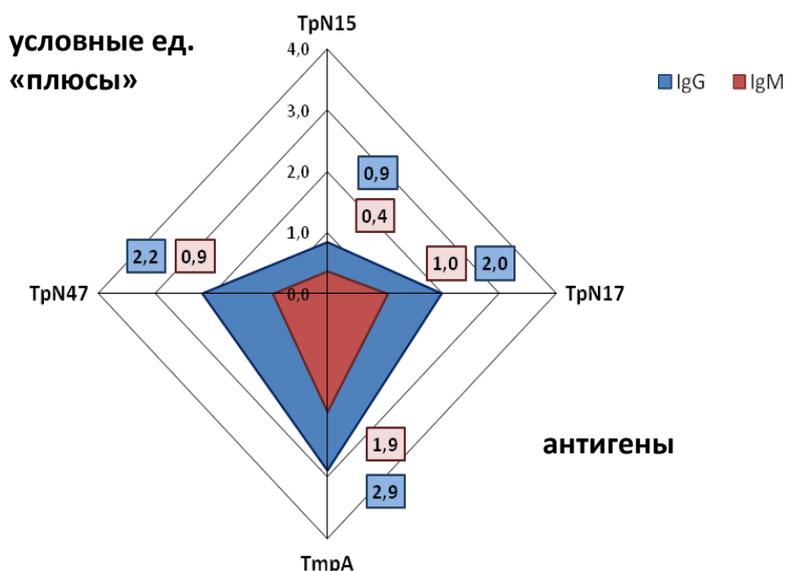


Рис. 3. Определение в крови больных сифилисом первичным IgM и IgG к антигенам *T. pallidum* методом ИБ

## 6. Изучение длительности циркуляции трепонемоспецифических IgM у больных после антибактериальной терапии ранних форм сифилиса

В ИФА<sub>IgM</sub> был изучен 341 образец сыворотки крови, полученный от больных ранними клиническими формами сифилиса в сроки от 3 месяцев до 3 лет после окончания адекватного антибактериального лечения по схемам, рекомендуемым методическими и клиническими рекомендациями, утвержденными Минздравом России (1999) или разработанными Экспертным советом Российского общества дерматовенерологов и косметологов (2010, 2012).

Установлено, что содержание антител в крови этих пациентов постепенно понижается уже при сроках наблюдения 3 и 6 месяцев. Количество положительных результаты исследования в ИФА<sub>IgM</sub> постепенно снижалось в период наблюдения от 9 месяцев до 2,5 лет; с образцами крови, полученными через 3 года после лечения, результаты исследования были отрицательными в 100% случаев (рис. 4).

Не установлено достоверных различий в сроках прекращения продукции IgM к антигенами *T. pallidum* у больных после лечения ранних клинических форм сифилиса в зависимости от применявшегося метода антибактериальной терапии (лечение бензатина бензилпенициллином или цефтриаксоном).

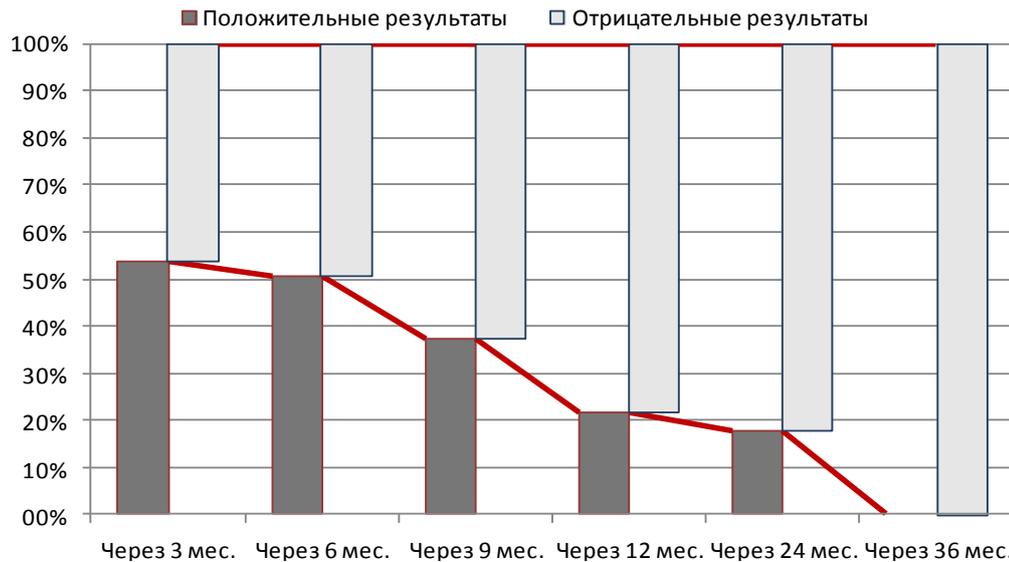


Рис. 4. Соотношение положительных и отрицательных результатов в ИФА-IgM при исследовании образцов крови больных ранними клиническими формами сифилиса после лечения.

Длительная циркуляция в крови антител класса М к антигенам *T. pallidum* не позволила рекомендовать это исследование в качестве раннего индикатора эффективности лечения при клинико-серологическом наблюдении над больными ранним сифилисом, получившими адекватную антибактериальную терапию.

#### 7. Разработка Алгоритма обследования пациентов при диагностике раннего сифилиса с использованием современных иммунохимических методов определения IgM к антигенам *T. pallidum*

Результаты проведенного исследования позволили нам определить, что современные методики иммунохимических исследований доступны и с различной степенью интенсивности применяются в специализированных дерматовенерологических организациях субъектов России при диагностике раннего сифилиса.

Исследования образцов крови опытной и контрольной групп позволили рассчитать клиническую информативность иммунохимических методов определения трепонемоспецифических IgM (ИФА-IgM, РИФ<sub>abc</sub>-IgM, ИБ-IgM) на примере новых наборов реагентов российского производства, в настоящее время разрешенных к применению в медицинских организациях России (табл. 3).

Полученные данные позволили разработать Алгоритм обследования пациентов с целью диагностики раннего сифилиса с применением лабораторных методик определения трепонемоспецифических IgM, учитывающий особенности и клиническую информативность каждого из этих методов, а также специфику иммунологической реактивности у больных сифилисом первичным по отношению разным к антигенам *T. pallidum*, используемым в лабораторных исследова-

ниях (рис. 5).

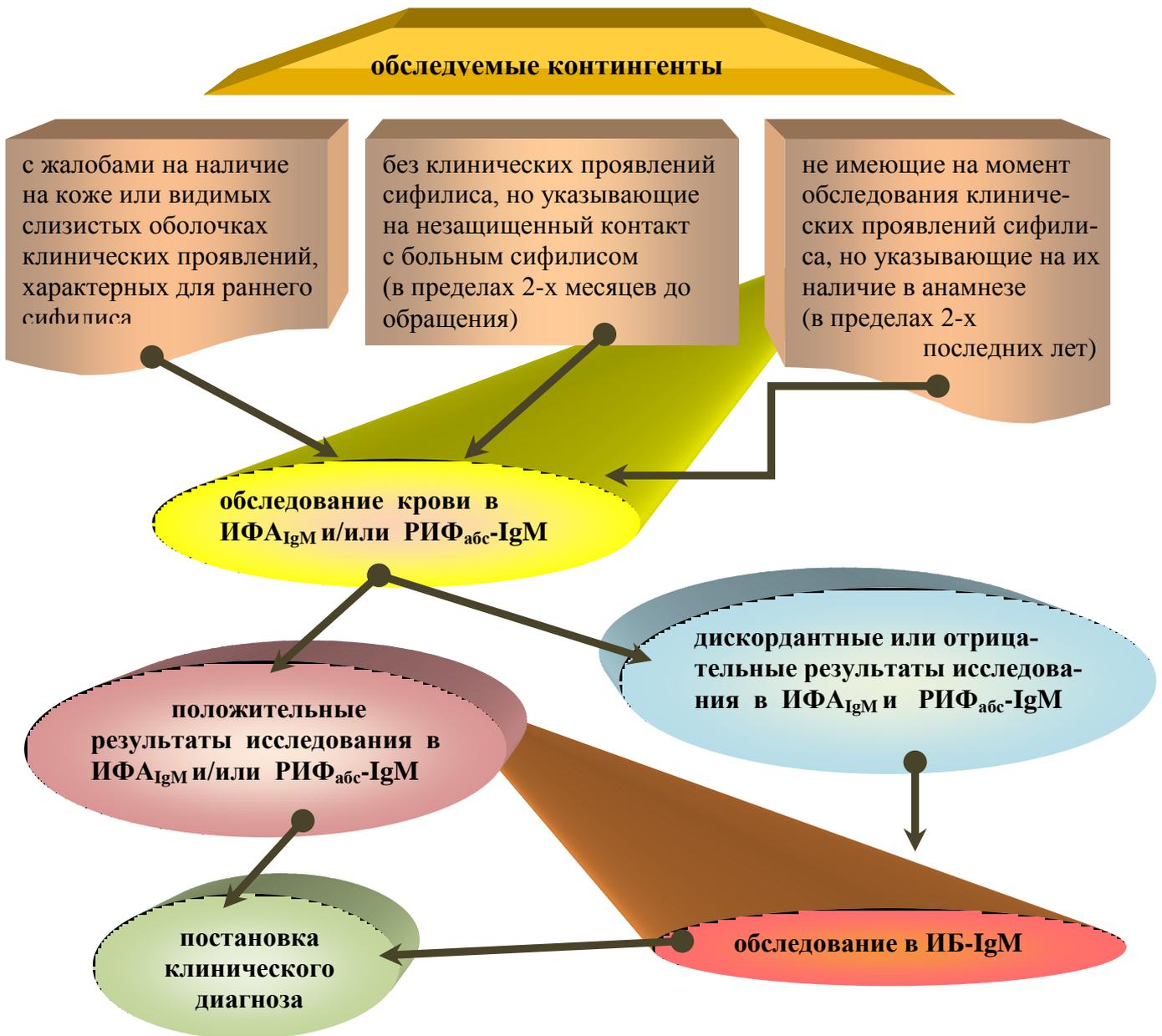
Таблица 3.

**Показатели клинической информативности современных  
иммунохимических исследований для диагностики сифилиса**

Показатель и клиническая форма сифилиса	Методика исследования					
	ИФА <sub>IgM+IgG-IgA</sub>	ИФА <sub>IgM</sub>	РИФ <sub>абс(IgG)</sub>	РИФ <sub>абс-IgM</sub>	ИБ-IgG	ИБ-IgM
<b>КЧ</b> (все формы)	<b>98,95</b>	76,83	<b>98,17</b>	75,41	--	--
первичный	<b>97,47</b>	<b>97,47</b>	94,94	<b>95,89</b>	92,11	85,53
вторичный	<b>100</b>	93,66	<b>100</b>	89,50	--	--
скрытый ранний	<b>100</b>	62,28	<b>100</b>	53,93	--	--
скрытый неуточнённый	<b>96,77</b>	53,23	<b>95,16</b>	42,11	--	--
скрытый поздний	<b>96,88</b>	15,63	93,75	26,09	--	--
<b>КС</b> (все формы)	<b>100</b>	<b>97,39</b>	89,54	86,30	<b>100</b>	<b>100</b>
<b>ДЭ</b> (все формы)	<b>99,22</b>	81,71	<b>96,74</b>	77,02	--	--
первичный	<b>97,41</b>	<b>97,41</b>	92,24	91,10	94,00	89,00
вторичный	<b>98,88</b>	<b>95,25</b>	<b>95,53</b>	88,64	--	--
скрытый ранний	<b>98,50</b>	82,40	94,01	68,52	--	--
скрытый неуточнённый	<b>97,21</b>	84,65	90,74	71,17	--	--
скрытый поздний	<b>97,84</b>	83,24	90,80	71,88	--	--
<b>ПЦ<sup>+</sup></b> (все формы)	<b>100</b>	<b>95,06</b>	<b>96,79</b>	<b>96,96</b>	--	--
первичный	<b>100</b>	<b>97,41</b>	82,42	87,50	<b>100</b>	<b>100</b>
вторичный	<b>100</b>	<b>97,96</b>	92,76	94,71	--	--
скрытый ранний	<b>100</b>	94,67	87,69	82,76	--	--
скрытый неуточнённый	<b>100</b>	89,19	78,67	61,54	--	--
скрытый поздний	<b>100</b>	55,56	65,22	37,50	--	--
<b>ПЦ<sup>-</sup></b> (все формы)	<b>96,82</b>	56,65	93,84	37,72	--	--
первичный	<b>97,41</b>	<b>98,68</b>	<b>97,16</b>	<b>95,45</b>	80,00	68,57
вторичный	<b>98,88</b>	91,98	<b>100</b>	75,00	--	--
скрытый ранний	<b>98,50</b>	77,60	<b>100</b>	60,58	--	--
скрытый неуточнённый	<b>97,21</b>	83,70	<b>97,85</b>	74,12	--	--
скрытый поздний	<b>97,84</b>	84,66	<b>98,56</b>	78,75	--	--

\* тёмным цветом выделены показатели выше 95%, что соответствует современным требованиям к информативности иммунохимических тестов для диагностики сифилиса (Приказ Минздрава России №78 от 21.03.2001 г.).

**Алгоритм обследования пациентов при диагностике раннего сифилиса с применением лабораторных методик, основанных на определении трепонемоспецифических IgM**



## ВЫВОДЫ

1. Установлено, что при диагностике раннего сифилиса в специализированных медицинских организациях дерматовенерологического профиля субъектов Российской Федерации недостаточно применяются современные модификации иммунохимических методов, основанные на определении трепонемоспецифических антител класса М: в 2012 году доля IgM-методов составила 1,30% от общего количества исследований для диагностики сифилиса, а в их структуре преобладали ИФА<sub>IgM</sub> – 97,27%, в то время как исследования в РИФ<sub>абс-IgM</sub> и в ИБ-IgM составили всего 2,0 и 0,73% соответственно, что, на наш взгляд, было обусловлено отсутствием производственного выпуска разрешенных к применению российских наборов реагентов, а также клинически обоснованных рекомендаций для их практического использования.

2. В сравнительном аспекте изучена клиническая информативность при диагностике раннего сифилиса трёх современных IgM-технологий (ИФА<sub>IgM</sub>, РИФ<sub>абс-IgM</sub> и ИБ-IgM). При сифилисе первичном установлена наиболее высокая клиническая чувствительность ИФА<sub>IgM</sub> (97,47%) и РИФ<sub>абс-IgM</sub> (95,89%), при сифилисе вторичном – только ИФА<sub>IgM</sub> (93,66%), что позволило рекомендовать эти методы как приоритетные при диагностике соответствующих форм заболевания. При сифилисе первичном определена клиническая информативность ИБ-IgM: клиническая чувствительность - 85,53%, клиническая специфичность - 100%, диагностическая эффективность - 89,00%, предсказательная ценность положительных и отрицательных результатов - 100 и - 68,57%, что позволило рекомендовать этот метод для использования в клинической практике в качестве подтверждающего теста. Применение IgM-методов при диагностике сифилиса скрытого раннего представляется нецелесообразным ввиду низкой клинической чувствительности (ИФА<sub>IgM</sub> - 62,28 и РИФ<sub>абс-IgM</sub> - 53,93%).

3. При сифилисе первичным установлены различные профили гуморального иммунитета, отличающиеся преобладанием в крови содержания антител к одному из иммунодоминантных антигенов *T. pallidum*: превалирование антител к TrpA выявлено в 65,79%, в то время как более высокое содержание антител к другим антигенам определялось с меньшей частотой (к TrpN17 - в 22,37%, к TrpN47 – в 9,21% и к TrpN15 - в 2,63% случаев), что необходимо учитывать при диагностике раннего сифилиса.

5. У больных ранними формами сифилиса, получивших адекватное специфическое лечение, в крови методом ИФА<sub>IgM</sub> длительное время могут определяться трепонемоспецифические антитела класса М, полная их элиминация

происходит к сроку наблюдения около 3 лет.

6. Разработан алгоритм обследования пациентов с целью диагностики раннего сифилиса, основанный на использовании результатов лабораторных методов определения в крови трепонемоспецифические антитела класса М (ИФА<sub>IgM</sub>, РИФ<sub>abc</sub>-IgM или ИБ-IgM).

### **Практические рекомендации**

1. Иммунохимические исследования, основанные на определении специфических антител класса М к антигенам *T. pallidum* (ИФА<sub>IgM</sub>, РИФ<sub>abc</sub>-IgM и ИБ-IgM), являются трепонемными диагностическими тестами, они предназначены для применения в клинических диагностических лабораториях специализированных медицинских организаций дерматовенерологического профиля.

2. Применение IgM-технологий (ИФА<sub>IgM</sub>, РИФ<sub>abc</sub>-IgM и ИБ-IgM) показано для обследования пациентов с целью выявления ранних клинических форм сифилиса: в первую очередь - сифилиса первичного, а также сифилиса вторичного; применение этих методик нецелесообразно при диагностике сифилиса скрытого раннего ввиду низкой клинической чувствительности.

3. Для постановки IgM-методик (ИФА<sub>IgM</sub>, РИФ<sub>abc</sub>-IgM и ИБ-IgM) в клинических лабораториях медицинских организаций рекомендуется применять только наборы реагентов, разрешенные к применению в Российской Федерации.

4. Диагностику раннего сифилиса рекомендуется проводить в соответствии с разработанным для этого алгоритмом обследования пациентов, основанном на дополнительном применении современных IgM-методов (ИФА<sub>IgM</sub>, РИФ<sub>abc</sub>-IgM и ИБ-IgM) с учётом величины показателей их клинической информативности (по ГОСТ Р 53022.3-2008), а также особенностей развития гуморального ответа к иммунодоминантным антигенам *T. pallidum* (TrN15, TrN17, TrpA и TrN47) у больных начальными формами сифилиса.

### Список научных работ соискателя, опубликованных по теме диссертации

1. Ротанов С.В. Показатели клинической информативности ИФА<sub>IgM</sub> при обследовании больных сифилисом. / С.В. Ротанов, **Ф.А. Эрматова** // XII Всероссийский Съезд дерматовенерологов и косметологов: Тезисы научных работ. г. Москва: РОДВК, 26-29 июня 2012: 54.
2. Ротанов С.В. Информативность ИФА<sub>IgM</sub> при обследовании больных с сифилитической инфекцией. / С.В. Ротанов, **Ф.А. Эрматова** // Клиническая лабораторная диагностика 2012; 9: 86.
3. Ротанов С.В. Выявление антител класса М к антигенам *T. pallidum* до лечения у больных сифилисом. / С.В. Ротанов, **Ф.А. Эрматова** // Актуальные вопр. дерматовенерол. и косметол.: Тез. науч. работ. Юбилейная науч.-пр. конф. дерматовенерол. и косметол., посвящ. 75-летию дерматовенерол. Службы Челябинской обл. Челябинск, 2012: 99-100.
4. Ротанов С.В. Методы выявления антител класса М к антигенам *T. pallidum* для ранней диагностики сифилиса. / С.В. Ротанов, Р.Н. Чупров-Неточин, **Ф.А. Эрматова** // Вестник дерматологии и венерологии 2013; 1: 14-20.
5. **Эрматова Ф.А.** Информативность непрямой реакции иммунофлюоресценции для выявления антител класса М к антигенам *T. pallidum* у больных сифилисом. / Ф.А. Эрматова // Вестник РГМУ 2013; Спец. выпуск 1: 52-53. Материалы VIII Международной (XVII Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых, 2013.
6. Ротанов С.В. Информативность трепонемоспецифических антител класса М при диагностике сифилиса. / С.В. Ротанов, **Ф.А. Эрматова** // Вестник дерматологии и венерологии 2013; 3: 48-55.
7. Ротанов С.В. Выявление антител классов М и G к антигенам *T. pallidum* у больных первичным сифилисом. / С.В. Ротанов, **Ф.А. Эрматова** // Вестник дерматологии и венерологии 2013; 4: 63-72.
8. Ротанов С.В. О применении тестов для определения антител класса М к *T. pallidum* при диагностике сифилиса в Российской Федерации. / С.В. Ротанов, **Ф.А. Эрматова** // V всероссийский конгресс дерматовенерологов и косметологов: Тезисы научных работ. Казань, 17-20 сентября 2013: 49.
9. Ротанов С.В. Эффективность определения трепонемоспецифических IgM у больных ранними формами сифилиса методом иммуноблоттинга с использованием коммерческих наборов реагентов. / С.В. Ротанов, **Ф.А. Эрматова** // V всероссийский конгресс дерматовенерологов и косметологов: Тезисы научных работ. Казань, 17-20 сентября 2013: 49-50.

### Список использованных сокращений

- БЛПР** – биологически ложноположительные результаты исследования в иммунохимических (серологических) реакциях для диагностики сифилитической инфекции;
- ДЭ** – диагностическая эффективность лабораторного исследования;
- ИБ** – иммуноблоттинг (модификации метода **ИБ-IgG** и **ИБ-IgM**);
- ИФА** – иммуноферментный анализ (модификации метода **ИФА<sub>IgM+IgG+IgA</sub>**, **ИФА<sub>IgG</sub>** и **ИФА<sub>IgM</sub>**);
- ИХЛ** - иммунохемилюминесцентные исследования
- КС** – клиническая специфичность лабораторного исследования;
- КЧ** – клиническая чувствительность лабораторного исследования;
- ПЦ<sup>+</sup> и ПЦ<sup>-</sup>** - предсказательная ценность положительных и отрицательных результатов лабораторного исследования;
- РИТ** - реакция иммобилизации бледных трепонем
- РИФ** - реакция непрямой иммунофлюоресценции (модификации метода **РИФ<sub>200</sub>**, **РИФ<sub>абс</sub>(IgG)**, **РИФ<sub>абс</sub>-IgM**);
- РМП** - реакция микропреципитации
- РПР** - быстрый плазмареагиновый тест
- РПГА** – реакция пассивной гемагглютинации;
- РСК** - реакция связывания комплемента (модификации **РСК<sub>к</sub>** - с кардиолипидным и **РСК<sub>т</sub>** - трепонемным антигенами)
- РУ** - регистрационное удостоверение для медицинских изделий на право применения в медицинских организациях России;
- ФО** – Федеральные округа Российской Федерации (**СЗФО** - Северо-западный, **ЦФО** - Центральный, **ЮФО** - Южный, **СКФО** - Северокавказский, **ПрФО** - Приволжский, **УФО** - Уральский, **СФО** - Сибирский, **ДВФО** – дальневосточный);
- Ig** - immunoglobulin's, иммуноглобулины - фракция белков крови, содержащая антитела;
- T. pallidum*** – *Treponema pallidum*, бледная трепонема.

Заказ № 000000000000000000

Подписано в печать 00.04.2012 г.

Тираж 100 экз. Усл.п.л. 00

Наименование организации

