

IRÁNYELVEK

IRÁNYELV A SZIFILISZ LABORATÓRIUMI DIAGNOSZTIZÁLÁSÁRA A KELET-EURÓPAI ORSZÁGOKBAN, I. RÉSZ

GUIDELINES FOR THE LABORATORY DIAGNOSIS OF
SYPHILIS IN EAST-EUROPEAN COUNTRIES, PART 1

LEVELEZÉSI CÍM

Dr. Deák Judit
Szegedi Tudományegyetem
Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ
Klinikai Mikrobiológiai
Diagnosztikai Intézet
6725 Szeged, Semmelweis u. 6.
Fax: (06-62) 545-959
E-mail: deak@mlab.szote.u-szeged.hu

Angolból fordította: Rátkay Csilla PhD
A fordítást lektorálta: Deák Judit MD, PhD

EVGENIJ SOKOLOVSKY¹, NATALIA FRIGO², SERGEI ROTANOV², ALEVTINA SAVICHEVA³,
OLGA DOLIA², NATALIA KITAJEVA², ANDERS HALLÉN⁴, MAGNUS UNEMO⁵, MARIUS
DOMEIKA⁶, RON BALLARD⁷ ÉS A EE SRH NETWORK: KAREN BABAYAN, MARINE
AZNAURYAN (Örményország), RASHID ISMAILOV (Azerbajdzsan), ALEXANDER NAVROTSKI,
VALENTIN PANCRATOV, NATALYA SIARHEICHYK, LARISA ZHURUSKAYA (Belorusszia),
KRASIMIRA CHUDOMIROVA (Bulgária), TATJANA BRILJENE (Észtország), GEORGE GALDAVA,
OLEG KVLIVIDZE (Grúzia), ANDRIS RUBINS, ILZE JACOBSONE, JUDITE PIRSKO (Lettország),
VESTA KUCINSKIENE, ALGIRDAS GRISKEVICIUS (Litvánia), SERGEY SIDORENKO (Oroszország),
ABBOS KASIMOV, OLIM KASIMOV (Tadzsikisztán), GENNADIJ MAVROV, NATALYA
KOCHETOVA (Ukrajna), JUDITH DEÁK (Magyarország)

¹Department of Dermatology and Venereology, Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russia; ²Microbiology Laboratory, Central Institute for Skin and Venereal Diseases, Moscow, Russia; ³Microbiology Laboratory, DO Ott Institute for Obstetrics and Gynecology RAMS, St. Petersburg, Russia; ⁴Department of Dermatology and Venereology, Uppsala University Hospital, Uppsala, Sweden; ⁵Department of Clinical Microbiology, Örebro University Hospital, Örebro, Sweden; ⁶Department of Medical Sciences, Uppsala University, Uppsala, Sweden; ⁷National Center for HIV, STD and TB prevention, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, USA

ÖSSZEFOGLALÁS

Jelen útmutató célja a szifilisz, mint szexuálisan terjedő betegség diagnosztizálásához szükséges, átfogó és pontos információk biztosítása a Kelet-Európai országok laboratóriumi számára. Ezen ajánlások hasznos információkkal szolgálnak a szexuálisan terjedő betegségekkel és/vagy azokhoz kapcsolódó problémákkal foglalkozó laboratóriumok személyzete számára. Az egyes Kelet-Európai országokban ezen útmutatók módosításaira is szükség lehet, amennyiben nem rendelkeznek az útmutatóban leírt reagensekkel, felszerelésekkel.

KULCSSZAVAK: szifilisz, laboratóriumi diagnózis, útmutató, Kelet-Európa

SUMMARY

The present guidelines aim to provide comprehensive and precise information regarding the sexually transmitted infection (STI) syphilis and the laboratory diagnosis of the disease in East-European countries. These recommendations contain important information for both physicians and laboratory staff working with STIs and/or STI-related issues. Individual East-European countries may be required to make minor national adjustments to these guidelines as a result of lack of accessibility to some reagents or equipment, or laws in a specific country.

KEY WORDS: syphilis, laboratory diagnosis, guideline, East-Europe

BEVEZETÉS

A szifilisz a *Treponema pallidum* által okozott kezelés nélkül krónikus stádiumokban zajló fertőző betegség. A betegség elsősorban nemi érintkezéssel terjed. Le-

folyását és a betegek fertőző képességét is figyelembe véve korai fertőző (Elsődleges syphilis, másodlagos szifilisz, korai tünetmentes szeropozitív szifilisz) és a késői szifilisz (tercier kardiovaszkuláris, neuroszifilisz, késői

tünetmentes latens) különböztethetünk meg. A betegség lehet szerzett vagy kongenitális (1. táblázat).

A SZERZETT SZIFILISZ KLINIKAI JELLEMZŐI ELSŐDLEGES SZIFILISZ

A betegség lappangási ideje általában 9–90 nap. Az első tünet – klasszikus esetben – a fertőzést követően 3 hét múlva jelenik meg a behatolás helyén. A betegek először egy fájdalommentes tömött tapintatú papulát észlelnek, melynek felszíne erodálódva képezi az elsődleges fekélyt.

A primer fekély többnyire soliter, fájdalommentes, alapja nem purulens, színe „sonkaszzerű”, jól körülhatárolható. A regionális nyirokcsomók megnagyobbodnak, ez lehet kétoldali vagy egyoldali, de mindig fájdalommentes.

- Az elsődleges fekély leggyakrabban a sulcus coronariusban, a glans szélén, a frenulum mellett jelenik meg, de képződhet a penis törzsén, mons pubison is. Nőknél a sanker helye a hátsó commissura, a kis ajkak területe, képződhet tükröszerűen is. Természetesen az aktus módjától függően találhatunk elsődleges fekélyt extragenitálisan, ajkak, ajkaszögök, nyelv, torok, vagy perianálisan, az anus nyílásban is.
- Az elsődleges léziók néha észrevétlenek maradnak, ha a rectumban, vagy a intravaginálisan, a portion jelennek meg.
- Az elsődleges fekélyek, ha felülfertőződnek, atípusos klinikai képet mutathatnak.
- Férfiaknál az elsődleges tünet balanitis specifica Follmann formájában is jelentkezhet,
- Az elsődleges fekélyek 3–8 héten belül spontán, kezelés nélkül általában heg nélkül gyógyulnak.
- A generalizált lymphadenopatia számos esetben a betegség első fázisának végén alakul ki.

MÁSODLAGOS SZIFILISZ

A betegség második szakaszában a haematogen disszemináció következtében jelennek meg a bőrön és a nyálkahártyákon a kiütések, amelyekre jellemző, hogy

- általában nem viszkető, foltok (roseolak), papulák, de megjelenhetnek hólyagocskák, pustulák formájában is. A papulák széli részén hámló gallért figyelhetünk meg. Többnyire disszemináltan jelentkeznek rendkívüli polimorfizmussal, azonban felléphetnek egy-egy testtájékon lokalizáltan is (pl. tenyerek és a talpak).
- A kiütések általában az elsődleges fekély eltűnése után kb. 6 héttel később jelennek meg.
- Meleg, nedves helyeken (pl. a vulva környéke, vagy a perianális régió, kis- és nagyhajlatok) a kiütések lapos, nedvező szemölcsöket, ún. szifiliszos condylomákat hoznak létre.

1. táblázat. A szifilisz osztályozása (ICD 10, 2007), átdolgozás (2)
(Classification of syphilis (ICD 10, 2007) revision)

A50. Kongenitális szifilisz	A50.0 Korai, kongenitális szifilisz, szimptomatikus A50.1 Korai, látens kongenitális szifilisz A50.2 Korai kongenitális szifilisz, nem meghatározható A50.3 Késői kongenitális szifilitikus oculopathiával A50.4 Késői kongenitális neuroszifilisz [gyermekkori] A50.5 Egyéb késői kongenitális szifilisz, szimptomatikus A50.6 Késői kongenitális látens szifilisz A50.7 Késői kongenitális szifilisz, nem meghatározható A50.9 Kongenitális szifilisz, nem meghatározható
A51. Korai szifilisz	A51.0 Elsődleges genitális szifilisz A51.1 Elsődleges anális szifilisz A51.2 Elsődleges szifilisz egyéb lokalizációban A51.3 Bőr- és nyálkahártya másodlagos szifilisz A51.4 Egyéb másodlagos szifilisz A51.5 Korai látens szifilisz A51.9 Korai szifilisz, nem meghatározható
A52. Késői szifilisz	A52.0+ Kardiovaszkuláris szifilisz A52.1 Szimptomatikus neuroszifilisz A52.2 Aszimptomatikus neuroszifilisz A52.3 Nem-meghatározható neuroszifilisz. A késői szifilisz egyéb tünetei A52.7 Egyéb szimptomatikus késői szifilisz A52.8 Késői látens szifilisz A52.9 Késői szifilisz, nem meghatározható
A53. Egyéb és nem meghatározható szifilisz kórformák	A53.0 Késői szifilisz, nem meghatározható korai vagy késői A53.9 Késői szifilisz, nem meghatározható

Lásd még az ICD szerinti osztályozás 76.2 pontját álpozitív nontreponema szerológiai teszt esetén.

- A száj nyálkahártyáján szürkés-fehér alapú enanthemák alakulhatnak ki. Ezek gyakran egymással összefüggően kanyargós felszínes fekélyeket hoznak létre.
- A másodlagos szifilisz bőr- és nyálkahártya léziói erősen fertőzőek. Bármilyen kontaktus a bőrlézió és egy sérült hámfelület között a betegség terjedését jelenti, jelentheti.
- Általában elmondható, hogy a kiütések kezelés nélkül néhány hét vagy hónap alatt eltűnnek, majd hetek hónapok múlva kiújulnak, a kiütéses szakasz recidívái akár 3–5 év múlva is megfigyelhetőek.
- a kiütések mellett előfordulhat fokális vagy diffúz alopecia, a kiütések regressziója után csökkent pigmentáció (leukoderma syphiliticum).

A másodlagos szifilisz során nem ritka a belső szervek, így a központi idegrendszer érintettsége különböző tünetekkel, láz, rossz közérzet, fejfájás, látászavar, hallás zavara és generalizált lymphadenopathia. A tünetek lehetnek enyhék vagy súlyosak, és az elsődleges szifiliszhez hasonlóan kezelés nélkül megszűnnek.

LÁTENS SZIFILISZ

A kezeletlen szifilisz kórlefolyásában a tünetmentes szerológiai pozitivitást elsőként az elsődleges tünetek regressziója és a szekunder stádium klinikai megjelenése között észlelhetjük. Ha a beteg kezelésére a másodlagos szifilisz szakaszában sem kerül sor, akkor a betegnél számolhatunk a korai látens szifilisz állapotával. Gyakran a betegek első észlelése ebben a stádiumban történik. A betegek fertőzőek, azonban a fertőzőképesség az idő múlásával egyre kevésbé lesz jelentős. Általában azt modhatjuk, hogy korai tünetmentes látens szifiliszről beszélünk, ha a fertőzöttség feltételezett időtartama nem haladja meg a 2 évet és szifilisz latens tardáról (késői lappangó szifilisz), ha a fertőzöttség >2 éve áll fenn (Magyarországon a stádiumok beosztásánál a késői lappangó, szeropozitív szifilisz = *Syphilis latens tarda* alkalmazzuk). A betegek fertőzőképessége szexuális transzmisszió szempontjából csökken és a beteg belép az ún. látens szifilisz szakaszába. Ekkor már lehetetlen megállapítani a fertőződés időpontját.

HARMADLAGOS SZIFILISZ

Amennyiben a betegség kezeletlen marad, néhány tünetmentes év után a betegség legdestruktívabb fázisa, a harmadlagos szifilisz következik. Klinikailag a betegség ezen fázisára a papulózus-ulcerosus-serpiginosus és gummatózus léziók a jellemzőek. A gummák a kedvelt helyei a bőr, szájpad, nyelv, torok, csontok, de létrejöhetnek a belső szervekben is (szív, máj, idegrendszer, vázizomrendszer) súlyos tüneteket, akár a beteg halálát is okozva. A kardiovaszkuláris granulomatosus, hegesedéssel járó folyamat főleg az arcus aortae és az aorta ascendens területét érinti, mesaortitist eredményezhetnek, mely sok esetben tünetmentes, de okozhat koronaria-szűkületet, az aorta-billentyűk elégtelenségét, aorta-aneurizmát, főleg az aorta felszálló ágában.

A neuroszifilisz lehet aszimptomatikus, de jelentkezhet meningovaszkuláris szifilisz, tabes dorsalis vagy paralysis progressiva formájában.

SZIFILISZ TERHESSÉGBEN

A terhesség alatti kezeletlen szifilisz során a baktériumok a placentán átjutva megfertőzik a magzatot. Az esetek körülbelül 25%-ában az újszülött meghal, vagy

már halva születik, a fennmaradó 40-70%-ban a csecsemők kongenitális szifilisszel jönnek a világra, mely szimptomatikus vagy aszimptomatikus lehet.

A terhes nők szerológiai szűrése szükséges a terhesség korai szakaszában, mely szűrést a terhesség későbbi szakaszában, a második vagy harmadik trimeszterben meg kell ismételni. Nem gondozott terhesek esetében a szűrést a szülés alatt kell elvégezni. Az újszülöttet ilyen esetben nem szabad a kórházból elbocsátani addig, amíg a szűrés eredménye meg nem érkezik, különösen olyan esetekben, amikor az anya szerológiai eredményei nem ismertek.

A KONGENITÁLIS SZIFILISZ KLINIKAI JELLEMZŐI

A kongenitális szifilisz a magzat méhen belüli fertőződése a fertőzött anyától. Az infekció mindig a terhesség 4–5. hónapjában következik be. A *Treponema pallidum* a magzatba elsősorban hematogen úton jut be a köldökvénán keresztül. A magzat szempontjából az infekció kimenetele attól függ, hogy sok vagy kevesebb treponemával fertőződik, ez pedig szorososan korrelál az anya fertőzöttségi stádiumával.

A fertőződés következménye halvaszületés, vagy súlyos klinikai tünetekkel életképtelen koraszülés, vagy időre szülés súlyos tünetekkel vagy látszólag ép újszülött, a klinikai tünetek később jelentkeznek.

A szerzett szifilisszel együtt a kongenitális szifilisz is lehet korai vagy késői. Néhány esetben a korai kongenitális szifiliszben szenvedő csecsemők már a szüléskor is rendelkeznek tünetekkel, de a betegség jelei általában a szülést követő néhány héttől három hónapig terjedő időszakban jelentkeznek. Néhány újszülött aszimptomatikus maradhat. A kongenitális szifilisz első jelei a korai tünetek megjelenése: maculopapulosus exanthemák, infiltrációk előszeretettel a testnyílások környékén, rhinitis, jellegzetes kiütések (szifilisz pemphigus, diffúz papulosus kiütések), szürkés-sárga ráncos bőr. A korai kongenitális szifilisz egyéb tünetei az osteochondritis, láz, máj és lép megnagyobbodása, anaemia és számos egyéb veleszületett rendellenesség.

Később (1 éves korban vagy még később) a késői kongenitális szifilisz jelei, ún. stigmáknak felelnek meg (csontok, fogak, szem, hallószervek és az agy). Jellemző az ún. *Hutchinson*-triász tünetegyüttes kialakulása, mely parenchimatózus keratitist, süketséget és a Hutchinson hordó alakú fogak kialakulását jelenti.

A szifilisz laboratóriumi diagnosztizálására vonatkozó szabályokat a **2. táblázat** foglalja össze.

2. táblázat. A szifilisz laboratóriumi diagnosztizálásához szükséges kritériumok (3, 4) (Laboratory criteria for the diagnosis of syphilis)

DIAGNÓZIS	AZ ALKALMAZOTT MÓDSZER*
Definitív	A <i>T. pallidum</i> kimutatása klinikai mintákból sötétlátóteres mikroszkópos vizsgálattal, DFA-TP-vel, validált NAAT-tal, vagy ezekkel megegyező módszerekkel.
Preszumptív	Léhetőleg két különböző szerológiai módszert alkalmazva.
	Egy pozitív non-treponema teszt (pl.: RPR, VDRL) és egy pozitív treponema teszt (pl.: TPHA, TP-PA, ELISA, MPR mikroprecipitációs reakció, FTA-ABS).

* DFA-TP, direkt fluoreszcens *Treponema pallidum*-antitest; NAAT, nukleinsav amplifikációs teszt; RPR, rapid plazma reagin teszt; MPR, mikroprecipitációs reakció; VDRL, Venereal Disease Research Laboratory teszt; TPHA, *T. pallidum* hemagglutinációs teszt; TP-PA, *T. pallidum* passzív partikula agglutinációs teszt; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FTA-ABS, fluoreszcens treponema antitest-abszorpció

VIZSGÁLATI ANYAGOK GYŰJTÉSE A TREPONEMÁK KÖZVETLEN KIMUTATÁSÁRA

Sötétlátóteres mikroszkópos, illetve direkt immunfluoreszcens (DFA) vizsgálatokhoz a következő minták alkalmasak: szerosus sebváladék a fekélyek, eróziók alapjáról, macerált felületről vagy mesterségesen le-dörzsölt papulák felszínéről.

A vizsgálati anyagokat a bőrléziók felszínének fiziológiás sóoldattal megnedvesített géztamponnal elvégzett alapos tisztítása után kell venni. A tisztítás a kommenzális spirális baktériumok illetve egyéb mikrobák eltávolítása miatt szükséges, melyek a vizsgálatot befolyásolhatják. Fontos, hogy ne sértsük meg a területet, ne okozunk vérzést. A leukocyták, sejtörmelékek, erythrocyták jelenléte a mintában zavarhatja a vizsgálatot.

Számos módszer segítségével nyerhetünk megfelelő szövetnedvet:

PROVOKÁCIÓS MÓDSZER: alaposan tisztítsuk meg a vizsgálni kívánt felületet (fekélyek, nedvező papulák, szifiliszos condylomák) egy steril, fiziológiás sóoldattal megnedvesített tamponnal. Ezután egy steril Volkmann-kanál vagy egy ehhez hasonló eszköz segítségével óvatosan dörzsölgetjük az elváltozások felszínét. Egy kis idő elteltével a felület nedvessé válik a szövetnedv szivárgása miatt, mely általában tiszta, vagy kissé opálos. Ha a seb vérezni kezd, a vérzést egy steril tampon segítségével állítsuk el. A mintában egy kis mennyiségű vér még megengedett.

KOMPRESSZIÓS MÓDSZER: tisztítás után a fekélyt, vagy erodált condylomát két ujjunk közé fogva megnyomkodjuk gumikesztyűs kézzel (vagy csipesszel), így nyerhetünk tiszta ingersavót. A váladékot e seb felszínéről kaccsal, vagy egy üveg tárgylemez segítségével távolíthatjuk el. A mintára cseppentsünk fiziológiás sóoldatot fedőlemezzel lefedve mikroszkóposan vizsgálhatjuk.

SKARIFIKÁCIÓS MÓDSZER: a száraz, nem erodált felszínű bőrtünetek (papulák, epitelizált eróziók) vizsgálatára alkalmas módszer. A vizsgálni kívánt területen bemetszést ejtünk. Ha kapillaris vérzést észlelünk, nyomással próbáljuk meg elállítani. Ezután a bemetszett felületről az előbbieken leírt módon a provokációs módszer segítségével nyerhetünk mintát. A száraz felszínű papulákból gyakran igen nehéz a treponemák detektálása.

Felületi fertőtlenítő szerek alkalmazása, antibiotikum szedés, illetve másodlagos bakteriális felülfertőzések álnegatív eredményhez vezethetnek. Ha az első vizsgálat eredménytelen volt, akkor steril fiziológiás sóoldattal és steril gézzel történő sebkezelés után, a mintavétel ismétlése javasolt a következő napon. Mikroszkópos vizsgálatra egy megnagyobbodott nyirokcsomóból (általában az inguinálisból) származó minta is alkalmas.

NYIROKCSOMÓ PUNKCIÓ: denz, tömött nyirokcsomó, mely nem mutatja a fluktuáció jeleit. A bőrfelületet jóddal tisztítsuk meg, a nyirokcsomót két ujjunkkal fogjuk meg, és egy kis mennyiségű steril fiziológiás sóoldatot fecskendezzünk be a csomóba. A tűt a mirigy egyik végénél vezessük be a nyirokcsomóba, majd hosszanti irányban vezessük a másik pólus felé. Közben a sóoldatot lassan injektáljuk a csomóba. Ezután a tűt húzzuk kifelé a csomóból, közben a fecskendő dugattyúját kifelé húzva nyerhetünk váladékot. A mintában lévő lymphocyták jelzik, hogy a punkció eredményes volt.

VÉRMENTÁK TÁROLÁSA ÉS SZÁLLÍTÁSA

A vérmintákat tartalmazó csöveket egy zárt edényben szobahőmérsékleten szállítsuk a laboratóriumba. A minták azonnali feldolgozása nem szükséges, 4–8 °C-on tárolhatók. Ideális esetben hagyjuk a vért megalvadni szobahőmérsékleten vagy 37 °C-on, majd 30 percig 4 °C-on az alvadékot hagyjuk összehúzódní. A laboratóriumban a vért tartalmazó csöveket 10 percig 3000 rpm fordulatszámon kell centrifugálni. Ha a cső sejt-szeparátorokat tartalmaz, a cső alján található gél fel fog emelkedni az alvadék fölé, és elválasztja azt a szérumtól.

Ha a vérsavót tárolni kellene, 0,5–1 ml-es adagokban Eppendorf csövekben fagyasztva tárolható -18 és -20 °C között 1–1,5 hónapig, míg -65 és -80 °C között korlátlan ideig. A minták fagyasztása és újraolvasztása kerülendő, ha a vizsgálat megismétlése szükséges, egy ugyanattól a páciens-től származó másik cső mintára van szükség.

A vizsgálni kívánt savót szobahőmérsékleten olvasszuk fel. Az olvasztást követően a cső tartalmát alaposan keverjük össze. A vizsgálat előtt minden savómintát hőkezeléssel inaktíváljunk 56 °C-on 30 percig. A vizsgálatokat még aznap végezzük el.

Ha a vizsgálandó anyag vérplazma, az antikoaguláns tartalmú vérmintákat szobahőmérsékleten néhány percig állni hagyjuk. Amennyiben a vizsgálat nagyon sürgős, 1000-1500 rpm fordulatszámon 7-10 percig centrifugáljuk le a mintát, és a plazmát Pasteur vagy mikropipetta segítségével gyűjtjük. A vizsgálatot még aznap végezzük el.

CEREBROSPINÁLIS FOLYADÉK VIZSGÁLATA

A CEREBROSPINÁLIS FOLYADÉK TULAJDONSÁGAI

Normál esetben a cerebrospinális folyadék (CSF) színtelen és tiszta. Ha bármilyen változás következik be a folyadék színében vagy tisztaságában, az valószínűleg valamilyen patológiai folyamat következménye.

Egy kis eltérés a folyadék tisztaságában, ha gyengén opálos, az általában a fehérjesszint emelkedésével magyarázható, mely könnyen precipitálható frakciót alkot. Ha a cerebrospinális folyadékot levegőn állni hagyjuk, ugyanilyen változást tapasztalhatunk a folyadék tisztaságában. A cerebrospinális folyadékot egy ugyanolyan, desztillált vizet tartalmazó csővel összehasonlítva az opaleszcencia könnyen vizsgálható.

A folyadék turbiditása a benne lévő erythrocyták, leukocyták és/vagy mikrobák jelenlétének köszönhető. A mintában esetlegesen jelen lévő vér a mintavétel során, az epidurális régióban lévő vénák sérülése következtében kerülhet a mintába.

CSF MINTA VÉTELE

Mikrobiológiai vizsgálat céljából a liquor mintát minden esetben neurológusnak kell vennie. A következő tünetek indokolhatják a lumbalpunkciót:

- a szifilisz bármely stádiumában neurológiai tünetek megléte;
- szem- vagy cardiovascularis vizsgálatok esetén a szifilisz tüneteinek észlelése;
- bizonyított kongenitális vagy harmadlagos szifilisz.

Minden páciens esetében szükséges a CSF minta vétele, akik:

- szifilisz szeropozitívak és egyidejűleg HIV-fertőzöttek;
- neurológiai tüneteket mutatnak.

A CSF mintákat a következő vizsgálatoknak kell alávetni:

- citológiai vizsgálatok;
- fehérjesszint-mérés;
- szerológiai vizsgálatok (mikroprecipitáció (MPR), „Venereal Disease Research Laboratory test” (VDRL) vagy treponemák fluoreszcens antitest-abszorpciós vizsgálata (FTA-ABS)).

A CSF MINTÁK SZÁLLÍTÁSA ÉS TÁROLÁSA

A CSF mintákat tartalmazó csövek szállítása a laboratóriumba nagy körültekintést igényel, ahol a citológiai vizsgálatok és a fehérjesszint meghatározás általában még aznap megtörténik. A szerológiai vizsgálatokat, mint a MPR/VDRL vagy a FTA-ABS későbbre lehet halasztani, de a mintát nem szabad újra fagyasztani és olvasztani.

A DEFINITÍV DIAGNÓZIS FELÁLLÍTÁSÁHOZ SZÜKSÉGES MÓDSZEREK

A kórokozó – *T. pallidum* – direkt kimutatása elengedhetetlen feltétele a szifilisz diagnózis felállításának (5-8). A *T. pallidum* a korai szifiliszben szenvedő páciens bőrlézióiból, fertőzött nyiroksomóiból a következő módszerekkel detektálható:

- sötétlátóteres mikroszkóvizsgálás;
- direkt immunfluoreszcencia (DFA);
- nukleinsav amplifikáción alapuló tesztek (NAAT), például polimeráz láncreakció (PCR) (9-10).

SÖTÉTLÁTÓTERES MIKROSKÓPIZÁLÁS

ÁLTALÁNOSÁGBAN

A *T. pallidum* detektálása egy sötétlátóter-kondenzátorral ellátott, standard mikroszkóppal történik. A módszer a Tyndall-jelenségen alapszik, mely azon a megfigyelésen alapul, hogy a porszemcsék képesek foszforeszkálni egy ferde fénysugár jelenlétében, mely egy keskeny nyíláson áthaladva éri el a sötét látóteret. A vizsgálathoz egy standard mikroszkóp kondenzátorát egy speciális kondenzátorral kell helyettesíteni, ahol is a középső rész a sötét látóter, a fénysugár pedig egy keskeny nyíláson át halad. Az ilyen oldalirányú megvilágítás eredményezi a megvilágított részecskék lumineszcenciáját, beleértve a treponemákat is, melyek fényes spirális baktériumokként tűnnek ki a sötét háttérből. A sötét látóteres mikroszkópizáshoz egy erős fényforrásra és jó minőségű objektívekre van szükség.

A VIZSGÁLAT ALKALMAZÁSA

A sötét látóteres mikroszkópizáshoz a szexuális úton szerzett szifilisz, valamint a kongenitális szifilisz ese-

tén az elsődleges és másodlagos bőrléziók diagnosztizálására alkalmazható, valamint ritkábban másodlagos szifilisz esetében (az utóbbi esetben akkor alkalmazható a vizsgálat, ha a mintát az infiltrátum alsó részéből veszik). A vizsgálat elvégezhető még a helyi nyirokcsomó-aspirátumból, cerebroszpinális folyadékból, valamint magzatvízből is. A nem patogén treponemák (*T. refringers*, *T. phagedenis (reiteri)* az urogenitális rendszerben, valamint a *T. denticola* a szájüregben) jelenléte bőrléziókban, szájüregből illetve rectumból származó minták esetén a vizsgálat értékelését bonyolulttá és pontatlanná teheti, mivel ezen baktériumok morfológiailag teljesen megegyeznek a *T. pallidum*-mal (11, 12). Ha a fent említett minták valamelyikének vizsgálata szükséges, DFA vagy NAAT vizsgálatok alkalmazása javasolt.

MINTAVÉTEL

Lásd: Vizsgálati anyagok gyűjtése a treponemák közvetlen kimutatására.

A MINTÁK ELŐKÉSZÍTÉSE

- A bőrlézióból származó mintát szobahőmérsékleten egy csepp fiziológiás sóoldattal keverjük össze egy tárgylemezen,
- fedőlemezzel fedjük le, majd mikroszkóppal vizsgáljuk.

Megjegyzés: a nyirokcsomókból származó mintákat nem szükséges hígítani.

MIKROSKÓPIZÁLÁS

- Cseppentsünk egy csepp immerziós olajat a sötét látótér kondenzátor felszínére,
- helyezzük a mintát a tárgyasztalra,
- emeljük meg a kondenzort úgy, hogy lehetőleg elkerüljük a buborékok képződését, homogén közeget biztosítva ezzel a kondenzátor és a minta alsó felülete között, mely megakadályozza fénynyaláb elhajlását,
- vizsgáljuk a mintát 40x-es objektív és 10-12x-es okulár segítségével.

AZ EREDMÉNYEK KIÉRTÉKELÉSE

A treponemák a sötét látótérben törékeny, mozgó spirillumok, gyengén foszforeszkáló mikrobák, ezüstös fényt bocsátanak ki. A teljes látótérben apró foszforeszkáló pontokat kell látnunk, folyamatos Brown-mozgásban.

A háttérből a következőknek kell kitűnni:

- neutrophil leukocytáknak, melyek erősen fénylő, kerek, szemcsés testek,

- lymphocytáknak, melyek sötét-szürke, gyengén világító sejtek,
- epithél sejteknek, melyek kerek vagy szabálytalan alakú, erősen fénylő, a leukocytáknál sokkal nagyobb sejtek,
- erythrocytáknak, melyek sötét, kerek formák, világító udvarral. A leukocytáknál valamivel kisebbek.

Megjegyzés: ha a minta túl sok vörösvértestet tartalmaz, a látótér túl világossá válhat, melyben a treponemákat nem lehet felismerni. Ebben az esetben újabb mintát kell venni a betegtől.

A treponemák felismeréséhez, melyek 6-20 μm hosszú, 0,13-0,15 μm széles, általában 10-13, 0,5-0,7 μm mélységű kanyarulattal ellátott spirillumok képében tűnnek fel, igen nagy gyakorlat szükséges, mivel könnyen összetéveszthetők egyéb, kommenzális mikrobákkal.

A *T. pallidum*-nak igen jellegzetes mozgása van, általában közepén meghajlik, majd kiegyenesedik. Ez a mozgás az alakbeli sajátosságokkal együtt az alapja a *T. pallidum* diagnosztizálásának.

Megjegyzés: Ha nem látunk treponemákat az első vizsgálati anyagban, a léziókat mossuk le fiziológiás sóoldattal, és vegyünk újabb mintát. Viszont számos negatív eredmény után sem zárhatjuk ki a szifilisz diagnózist. Általában szerológiai vizsgálatok elvégzése szükséges.

MINŐSÉGELENŐRZÉS

A beteganyag vizsgálatának kivitelezése előtt vegyünk mintát egy egészséges ember szájüregéből, mely jó eséllyel tartalmaz apathogén spirillumokat. A mintát keverjük el egy csepp fiziológiás sóoldatban, és vizsgáljuk 400x-os nagyítással. Ha a minta tartalmaz spirális baktériumokat, a mikroszkóp beállításai optimalizálhatók.

DIREKT IMMUNFLUORESCENCIA (DFA)

ÁLTALÁNOSÁGBAN

A direkt immunfluoreszcencián alapuló módszer lényege a *T. pallidum* kimutatása fluoreszcens festékkel megjelölt specifikus monoklonális antitestek segítségével.

A módszer előnye a sötét látóteres mikroszkóp használatával szemben, hogy a *T. pallidum* nem téveszthető össze apathogén treponemákkal a szájüregből, rectumból származó nyálkahártya léziók vizsgálata során, valamint, hogy a betegtől származó kenetet fixálva lehet a laboratóriumba küldeni. Biopszia, illetve boncolás során vett minták szintén alkalmasak a vizsgálat elvégzésére.

MINTAVÉTEL

Lásd: vizsgálati anyagok gyűjtése a treponemák közvetlen kimutatására.

ANYAGOK

A sötét látóterű mikroszkópizáláshoz szükséges felszerelések mellett a következőkre van szükség:

- aceton vagy metanol a minta fixálásához,
- FITC-hez kötött *T. pallidum* monoklonális ellenanyag,
- fluoreszcens mikroszkóp,
- megfelelő fixálóanyagok az immunfluoreszcenciához.

A TESZT KIVITELEZÉSE:

- a vizsgálni kívánt kenetet metanollal vagy hűtött acetonnal fixáljuk 5-10 percig. A minta így akár 1 hónapig is tárolható -20 °C-on, mielőtt megfestenénk,
- 30 µl előkészített monoklonális ellenanyagot melegítsünk fel szobahőmérsékletűre, vigyük fel a mintát tartalmazó tárgylemezre, majd inkubáljuk a lemezt 20-25 °C-on 15 percig,
- a festést követően mossuk a mintákat foszfát pufferrel 10 másodpercig, majd levegőn szárítsuk,
- cseppentsünk egy csepp fixáló folyadékot a mintára, majd fedjük le fedőlemezzel. A minta készen áll a mikroszkópos vizsgálatra.

AZ EREDMÉNYEK KIÉRTÉKELÉSE

A mintákat fluoreszcens mikroszkóppal, 200x-os, 400x-os, majd 1000x-es nagyításban vizsgáljuk. A mintában található sejtek pirosas-sárga vagy sárga színűek, míg a *T. pallidum* világoszöld színű spirillumok képeben látható.

MINŐSÉGELLENŐRZÉS

Sem negatív, sem pozitív eredményt adó klinikai minták nem használhatók kontrollként. Pozitív kontrollként mesterségesen fertőzött nyúlból származó szuszpenzió használható.

Megjegyzés: Kelet-Európában ez a módszer még nem terjedt el, mivel a szükséges reagensek, például a FITC-jelölt monoklonális ellenanyag kereskedelemben nem kaphatók.

NUKLEINSAV KIMUTATÁSON ALAPULÓ TESZTEK**ÁLTALÁNOSÁGBAN**

A nukleinsav kimutatáson alapuló tesztek (NAAT), például a polimeráz láncreakció (PCR) képesek egy kórokozó DNS-ének specifikus szakaszát detektálni sok millió egyéb molekula közül. Jelenleg nincs olyan, kereskedelmi forgalomban kapható teszt, mely a *T. pallidum* DNS specifikus detektálására alkalmas. Ugyanakkor lehetőség van házilag tervezett vizsgál-

latok kivitelezésére, mely módszerek validálhatók tíz szeropozitív és tíz szeronegatív kontroll segítségével, melyek a sötétlátóterű mikroszkóppal vizsgálva pozitívak, illetve negatívak.

VIZSGÁLANDÓ KLINIKAI MINTÁK

Elsődleges vagy másodlagos léziókból származó minták (fekélyek, papulák, condylomák), CSF, magzatvíz, vér és szérum minták használhatók a *T. pallidum* specifikus DNS PCR-rel történő kimutatására.

MINŐSÉGELLENŐRZÉS

Minden PCR kivitelezésekor szükség van pozitív és negatív kontrollok használatára. Például, *T. pallidum*-mal fertőzött kísérleti nyúlból származó minta, mely hígítás után körülbelül 100 treponemát tartalmaz ml-enként, használható, mint pozitív kontroll, míg egy nem-fertőzött állatból származó minta hasonlóképpen előkészítve használható negatív kontrollként.

Megjegyzés: a PCR-en alapuló vizsgálatok különösen akkor hasznosak, amikor a vizsgálni kívánt klinikai mintában a treponemák kis számban vannak jelen. Habár a módszer még kísérleti stádiumban van, igen specifikus, szenzitív, és megismételhető, amennyiben a kivitelezés korrekt volt. Más, nem amplifikáción alapuló nukleinsav kimutatáson alapuló módszerek, mint például a nukleinsav-hibridizáció, vagy a dot hibridizációs módszerek használata szintén nem túl elterjedt. Ezen módszerek szenzitivitása alulmarad az amplifikáción alapuló módszerektől, használatuk főleg a kutatásra korlátozódik.

MÓDSZEREK PRESZUMPTÍV DIAGNOSZTIZÁLÁSHOZ**ÁLTALÁNOSÁGBAN**

Ellenanyagválaszok alakulása nem kezelt szifilisz esetében. A *T. pallidum* fertőzéskor bekövetkező első humorális immunválasz az IgM termelés megindulása. Az IgM molekulák termelődése a fertőzést követő 10-14. napon indul meg, és specifikusak a *T. pallidum* egyes fehérjéire. A non-treponema vizsgálati módszerek esetében nem reaktívak. A treponema-specifikus ellenanyagok jelenléte a szifilisz korai diagnosztizálását teszi lehetővé, akár már a lappangási idő alatt is. Később, non-treponema, lipoid-antigének elleni IgM antitestek jelennek meg a vérben.

Körülbelül négy héttel a fertőzést követően specifikus IgG antitestek jelennek meg, míg az IgM molekulák szintje a vérben a 6-8. héten csökkenni kezd, amennyiben a betegséget nem kezelik.

A következő hat hónap alatt az IgM termelés csökken, de az IgM antitestek alacsony koncentrációban jelenhetnek a nem kezelt páciensek vérében évekig, akár évtizedekig is.

Az IgG ellenanyagválasz mértéke változó az egyes páciensek esetében. Kezelés nélkül az ellenanyag szint fokozatosan növekszik, a maximumot körülbelül 1-2 évvel a fertőzés után éri el. Ezután a szintje lassan csökkenni kezd, de megmarad relatíve magas koncentrációban a vérben akár évtizedekig.

AZ ELLENANYAGVÁLASZ ALAKULÁSA A SZIFILISZ KEZELÉSE UTÁN

A korai szifilisz kezelésének hatékonyságát a vérben jelen lévő, non-treponema antitestek szintjének folyamatos csökkenése jelzi, melyet non-treponema szerológiai tesztekkel mérhetünk (RPR, VDRL).

A kezelés sikeresnek mondható, ha fent említett tesztekkel a non-treponema antitestek szintje legalább negyedére csökken (minimum két hígításban) a vérben egy éven belül, a kezelés befejezését követően.

Ha a kezelés befejezését követően 12 hónappal a RPR/VDRL tesztek még mindig pozitívak, az ellenanyagok szintje a vérben szignifikáns csökkenést nem mutat, a kezelést újra meg kell indítani. Habár, egyes betegeknél megfigyelték, hogy a non-treponema tesztek éveken keresztül a sikeres terápia után is gyengén pozitívak lehetnek.

Megjegyzés: Mivel az IgM az első antitest, mely megjelenik a vérben a *T. pallidum*-mal való fertőzést követően, az IgM megjelenése újszülöttekben kongenitális szifiliszre utal. Számos kelet-európai országban az IgM kimutatását használják a kongenitális infekció, illetve a friss fertőzés kimutatására. Ezek a tesztek azonban gyakran nem elég specifikusak, mivel az antigén-kötő helyre aspecifikusan egyéb nagy molekulák is bekötődhetnek. Ráadásul, az IgG és IgM molekulák közti versengés eredményeképpen fals-negatív eredményt adhatnak, hiszen az IgM molekulák nem képesek bekötődni a megfelelő helyre. Ezen okokból kifolyólag, hacsak lehetséges, a 19S-IgM-FTA teszt használata a javasolt. Sajnos azonban, a szérum egyes frakcióinak elválasztására szolgáló oszlop nem minden központban kapható. Az IgM tesztek eredményeit tehát kellő óvatossággal kell interpretálni.

Sikeres kezelést követően a betegek vérében a specifikus anti-treponema ellenanyagok még éveken, akár évtizedekkel később is detektálhatók. Az ellenanyagok jelenléte tehát nem jelenti a kezelés sikertelenségét. A terápia hatékonyságának megítélésénél tehát a következőket kell figyelembe venni:

- a kezelést követő egy éven belül a szérum szeronegativává válik, vagy legalább négyszeres titercsökkenés tapasztalható az RPR/VDRL tesztekben.
- A WHO ajánlásainak megfelelően a következő tényezők fennállása esetén tekinthető az alkalmazott terápia sikertelennek:
- a szifilisz klinikai tünetei megmaradtak vagy visszatértek,

- négyszeres vagy magasabb titeremelkedés az RPR/VDRL tesztekben a kiindulási állapothoz képest.

NON-TREPONEMA TESZTEK

ÁLTALÁNOSÁGBAN

A non-treponema tesztek esetében használt antigénkeverék cardiolipin, lecitin és koleszterol keverékéből áll. Ezek a tesztek nagy számú szérumminta vizsgálatára, a terápia hatékonyságának monitorozására, valamint az újrafertőződés detektálására alkalmasak.

Ezek a tesztek általában flokkulációs tesztek (a reakció eredménye precipitáció, flokkuláció, vagyis rögzéződés). Ezekben a tesztekben a heterofil IgG és IgM antitestek kötődése detektálható a szöveti károsodásból származó, valamint a *T. pallidum* sejtfalában található lipid antigénekhez. Ezen antitestek körülbelül egy héttel az elsődleges fekélyek kialakulása után jelennek meg a vérben.

A non-treponema tesztek előnye, hogy viszonylag olcsók, egyszerű a kivitelezésük, és az eredmények gyorsan megvannak. Az ellenanyag szint egyidejű meghatározásával a vizsgálat kvantitatív, jól használható a terápia hatékonyságának, valamint az esetleges reinfekció/relapszus bekövetkeztének meghatározására.

A módszer hátránya, hogy nem elég specifikus, és gyakoriak az ál-pozitív eredmények az alacsony prevalenciájú populációk vizsgálatakor.

A leggyakrabban használt non-treponema tesztek, az RPR, VDRL, valamint egy kevésbé gyakran használt teszt, a TRUST („toluidine red unheated serum test”) jellemzőit a 3. táblázat mutatja (3).

MIKROPRECIPITÁCIÓS TESZT (MPR)

QUALITATÍV MPR TESZT

ÁLTALÁNOSÁGBAN

- Az MPR tesztekhez vérplazma vagy inaktivált savó használható. Ha Pangborn antigén emulziót (koleszterol-kardiopilin-lecitin komplex) adunk a szifiliszben szenvedő beteg vérplazmájához, szérumához vagy liquorához, agglutinációt tapasztalunk, az antigén-antitest komplexek fehér pelyhek formájában kicsapódnak.
- A kereskedelmi forgalomban kapható MPR tesztek tartalmazzák a Pangborn antigén alkoholos oldatát (koleszterol, 0,98%; kardiopilin, 0,03%; lecitin, 0,27% abszolút etanolban).
- Az MPR tesztet egy makrotitrációs lemez sekély mélyedésében, vagy egy szerves üvegből (plexiüveg) készült tálca 0,8-1,0 cm széles, csiszolt mélyedéseiben kell végrehajtani.

3. táblázat. A non-treponema tesztek szenzitivitása és specificitása a szifilisz szerológiai diagnosztizálására (Sensitivity and specificity of non-treponemal tests for the serological diagnosis of syphilis)

NON-TREPONEMA TESZTEK	SZENZITIVITÁS (%) A BETEGSÉG KÜLÖNBÖZŐ FÁZISAIBAN				SPECIFICITÁS (%)
	ELSŐDLEGES SZIFILISZ	MÁSODLAGOS SZIFILISZ	KORAI LÁTENS SZIFILISZ	KÉSŐI SZIFILISZ	
MPR	81 (70-90)	91	94 (88-100)	70 (57-80)	98 (93-99)
RPR	86 (77-100)	100	98 (95-100)	73 (57-85)	98 (93-99)
VDRL	78 (59-87)	100	95 (88-100)	71 (37-94)	98 (96-99)
TRUST	85 (77-86)	100	98 (95-100)	—	99 (98-99)

MPR, mikroprecipitációs reakción alapuló teszt; RPR, rapid plazma reagin teszt; VDRL, Venereal Disease Research Laboratory teszt; TRUST, toluidine red unheated szérum teszt

- A lemezek, tálcák mélyedéseit jelöljük meg, mielőtt a szérum, plazma illetve antigén szuszpenziókat felvisszük.
- A reakció kialakulását kézzel, vagy rázógéppel történő keveréssel segíthetjük. Ha a vizsgált mintában nincsenek antitestek, a reakcióközeg változatlan, opálos marad.

A VIZSGÁLAT ELŐKÉSZÍTÉSE

- Az antigén emulziót a vizsgálat kivitelezésének napján, illetve a kit használata előtt el kell készíteni. Ellenőrizzük az antigén oldat tisztaságát. Ha kicsapódást észlelünk, melyeket koleszterol-kristályok okoznak, az oldatot 37 °C-ra melegítve oldjuk fel azokat,
- 2 ml Pangborn antigén oldathoz adjunk ugyanolyan mennyiségű fiziológiás sóoldatot, majd keverjük össze alaposan. Eközben az oldat zavarossá válik, fehér csapadékképződést tapasztalhatunk. Ha az antigént nem a cső falára csöpögtetjük, hanem közvetlenül a fiziológiás sóoldatra, homogénebb csapadékot kapunk;
- az antigén oldatot tartalmazó csövet 30 percig szobahőmérsékleten állni hagyjuk, majd 1500 g-vel 10-15 percig centrifugáljuk. A felülúszó eltávolítása után a pelletet 7 ml 10%-os choline-klorid oldatban szuszpendáljuk fel;
- 10% choline-klorid előállításához a 70%-os koncentrátumot 6 térfogatnyi, frissen előállított 0,9 %-os NaCl₂ oldattal hígítjuk. A 10%-os oldat +4 °C-on, dugóval ellátott üvegben tárolható a lejárati dátumig;
- az elkészített antigén oldatot egy ismert pozitív, illetve negatív szérummal ellenőrizzük. A használatra kész oldatot egy „MPR teszthez szükséges Pangborn antigén emulzió” felirattal, és dátummal ellátott csőben tároljuk;
- ha az emulzióból nagy mennyiséget állítunk elő, azt ne egy nagy csőben, hanem inkább több kicsiben készítsük el, melyek egyenként 2 ml antigént tartalmaznak. Ezzel a módszerrel az antigén oldódása

optimális, és elkerülhető az oldat kontaminálódása, miközben a vizsgálatához szükséges mennyiséget kivesszük a csőből. Viszont, minden egyes oldat mennyiségét külön kell ellenőrizni;

- az elkészített emulziót sötétben tároljuk (például alufóliába, vagy fekete papírba tekerve a csövet) +4 °C-on legfeljebb egy hétig. A vizsgálat napján a kívánt mennyiségű oldatot 30 perc alatt szobahőmérsékletűre melegítsük;
- az egy csőben található Pangborn emulzió (~7 ml) 130-140 minta tesztelésére alkalmas. Az elvégezhető tesztek száma függ a tesztelni kívánt szérum, és az antigén mennyiségétől, valamint a pipetta diszpenzer átmérőjétől.

A TESZT KIVITELEZÉSE

- 3 csepp (90 µl) szérum, vagy plazma mintát pipetta segítségével cseppentsünk a makrotitrációs lemez egy mélyedésébe;
- a pipettahegyben maradt szérum az eredeti csőbe kerüljön vissza; minden mintához új tipet használjunk;
- ezután a tipet egy fertőtlenítő oldatot tartalmazó edénybe dobjuk ki;
- miután minden vizsgálni kívánt szérumot, a pozitív illetve a negatív kontrollokat szétosztottuk, cseppentsünk egy csepp (30 µl) jól felszuszpendált Pangborn antigén emulziót minden vályulatba;
- a lemezt ezután helyezük egy rázógép vízszintes felületére, és rázassuk 8-10 percig folyamatosan;
- 10 perc elteltével cseppentsünk 3, csepp (90 µl) fiziológiás sóoldatot minden vályulatba, és óvatosan keverjük össze a tartalmát vigyázva, hogy a reagens ne cseppenjen a szomszédos vályulatba. A keveredést 1-1,5 perces rázatással elősegíthetjük;
- a lemezt ezután 3-5 percig állni hagyjuk.

AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

A mintában található antitestek jelenlétére a csapadékképződés utal, a különböző méretű pelyhek kialakulá-

GYNO7/003



GYNOFLOR

hüvelytabletta



MEDICO UNO

sa mellett a reakcióközeg feltisztulását tapasztalhatjuk. A partikulumok méretéből a mintában jelen lévő antitestek mennyiségére következtethetünk, szemikvantitatív módon a tesztet 1+-tól 4+-ig értékelhetjük (**4. táblázat**). Ha a reakciót a maximális 4+-re értékeljük, a mintában található antitestek mennyiségét a minta hígításával (titrálással) határozhatjuk meg.

4. táblázat. A mikroprecipitációs (MPR) teszt eredményeinek kiértékelése (Evaluation of results of microprecipitation reaction (MPR) test)

EREDMÉNY	A LÁTOTTAK LEÍRÁSA
Erősen reaktív (4+)	Csapadékképződés nagy, fehér pelyhek formájában, melyek a vályulat egészében, vagy annak fala körül alakulnak ki, a reakcióközeg teljes feltisztulása mellett.
Reaktív (3+)	Közepes méretű csapadék képződik a mélyedés egészében, a reakcióközeg színe fehéres árnyalatú.
Gyengén reaktív (2+ és 1+)	Kisméretű csapadék képződik a mélyedés egészében, a reakcióközeg színe fehéres árnyalatú.
Nem értékelhető (±)	Igen kisméretű pelyhek képződnek, a csapadékképződés nem megítélhető. A lemez forgatásával az antigén láthatóvá válik gyöngyszerű partikulumok formájában a reakcióközegben. Ebben az esetben ajánlott a mintát újratestelni hígítatlanul és hígítva is (a „prozone” jelenség kizárása miatt), valamint 7-10 nappal később egy új mintát is megvizsgálni a szerokonverzió megítélése érdekében.
Negatív	Nincs csapadékképződés, a reakcióközeg opálos, a lemez forgatásával az antigén partikulumok a mélyedés közepére kerülnek.

A vizsgálatok eredményét a lemez oldalirányú megvilágításánál olvassuk le. A lemezt a kezünkben tartva lassan forgassuk. A jobb láthatóság érdekében a lemez alá fekete papírt helyezünk, és a csapadékképződést nagyítóval (2x-es nagyítással) vizsgáljuk.

MINŐSÉGELLENŐRZÉS

- A vizsgálatok eredményének becslése a pozitív, gyengén pozitív, illetve a negatív kontrollok értékelése után történik;
 - amennyiben erőteljes csapadékképződést tapasztalunk a pozitív és gyengén pozitív kontrollok esetében, valamint nem kapunk csapadékot a negatív kontrollal, az aktuális tesztet érvényesnek minősíthetjük;
 - ha a kontrollokkal nem kapunk megfelelő eredményt, a tesztet invalidnak kell tekintenünk, és meg kell ismételnünk;
- ha nagy mennyiségű mintát kell tesztelnünk, minden 100. minta után érdemes egy kontrollt is használni annak érdekében, hogy a teszt megbízhatóságát ellenőrizhessük.

QUANTITATÍV MPR TESZT

ÁLTALÁNOSÁGBAN

Minden, screening módszerrel pozitív mintát kvantitatív módon is le kell tesztelni.

A bizonytalan vagy negatív eredményt adó mintákat ajánlott titrálással újrazvizsgálni, különösen azokat, melyeknél a MPR teszt eltérő eredményt adott más, szifilisz diagnosztizálására alkalmas szerológiai módszer eredményétől, illetve ha a klinikus kéri.

A kvantitatív, non-treponema tesztek a betegség nyomon követésére, illetve a terápia hatékonyságának megítélésére alkalmasak.

Az egyes betegek esetében a szerológiai tesztek ugyanazon módszerrel kell kivitelezni, lehetőleg ugyanabban a laboratóriumban, hiszen két különböző kvantitatív teszt eredménye egymással nem hasonlítható össze, például az RPR teszt értéke általában picit magasabb, mint a VDRL teszté.

A TESZT KIVITELEZÉSE

- A vizsgálni kívánt minták mindegyikéből egy kétszeres hígítási sorozatot kell készítenünk. A vizsgálat kivitelezése előtt a reagenseket a standard módszer szerint elkészítjük, szobahőmérsékletűre melegítjük (30 perc);
- 3 csepp (90 µl) frissen elkészített fiziológiás sóoldatot cseppentünk a makrotitrációs lemez vályulataiba, amelyben a hígítási sorozatot szeretnénk elkészíteni;
- 3 csepp (90 µl) szérumot cseppentsünk az első és második mélyedésbe, amelyben a fiziológiás sóoldatot már belecseppentettük. A második vályulat tartalmát jól keverjük el, majd ebből (1:2) cseppentsünk 3 cseppet (90 µl) a következő, sóoldatot tartalmazó mélyedésbe;
- ezt a műveletet ismételjük addig, amíg 8, illetve 10 tagú hígítási sorozatot nem kapunk (1:2, 1:4, ...1:128, illetve 1:512), az utolsó 90 µl hígított szérumot dobjuk el;
- ezután cseppentsünk egy csepp (30 µl) reszuszpendált Pangborn reagenst minden mélyedésbe, a lemezt 8-10 percen át rázassuk, majd végül adjunk 3 csepp (90 µl) fiziológiás sóoldatot minden vályulatba, és 5 perc elteltével olvassuk le a teszt eredményét.

GYNO7/003



GYNOFLOR

hüvelytabletta



MEDICO BNO

AZ EREDMÉNYEK KIÉRTÉKELÉSE

Az eredményeket a fent leírt módon olvassuk, értékeljük. A titrálás esetén a legmagasabb hígítás, melynél még tapasztalható csapadékképződés, megfelel a mintában található ellenanyag mennyiségének.

MINŐSÉGELLENŐRZÉS

Lásd: Qualitatív MPR teszt.

A LEHETSÉGES HIBÁK FORRÁSAI

- Kontrollsavók, különösen a gyengén pozitív savó használatának elmulasztása;
- nem egységes antigén koncentráció a teszt során, mely akkor fordul elő, ha használat előtt elmulasztjuk a reagens alapos felkeverését;
- az emulzió baktériumokkal történő kontaminációja;
- lejárt szavatossági idejű reagensek használata, illetve a szérum, vagy plazma minták nem megfelelő tárolása;
- kontaminált csövek, pipetták, lemezek illetve oldatok használata.

"RAPID PLASMA REAGIN" (RPR) TESZT

ÁLTALÁNOSÁGBAN

Ha egy szifiliszben szenvedő betegből származó szérumot vagy plazmát összekeverünk a szénszemcsékhez kötött Pangborn antigén-emulzióval, az antigén-antitest komplexek kialakulásának köszönhetően a szénszemcsék összezsapódnak. A reakció szabad szemmel is jól látható.

Az RPR tesztet egy speciális, eldobható műanyag kártyán kell végezni, mely kártya egy 18 mm átmérőjű, kör alakú reakciófelülettel rendelkezik. A kártyákra a vizsgálat elvégzése előtt tollal vagy ceruzával tüntessük fel a vizsgált minta számát. Az antigén szuszpenziót és a szérumot, vagy plazmát a kártya kör alakú felületére cseppentsük, majd 8 percig szobahőmérsékleten rázassuk annak érdekében, hogy az antigén-antitest komplexek kialakulhassanak.

Ha a vizsgált minta nem tartalmaz antitestet, a reakcióközeg homogenitása nem változik, röggképződés nem látható.

A kereskedelmi forgalomban kapható RPR kitek a következő reagenseket tartalmazzák:

- szénszemcsékhez kötött, kész Pangborn antigén-suszpenziót,
- pozitív és negatív kontrollokat (stabilizált, inaktívált humán szérum),
- műanyag kártyák egy 18 mm-es, kör alakú reakciófelülettel,

- egy cserélhető tűvel ellátott adagoló, mely az anti-gén reagens adagolására szolgál.

QUALITATÍV RPR TESZT

A TESZT KIVITELEZÉSE

- Cseppentsünk 50 µl szérum vagy plazmamintát egy kártya kör alakú reakciófelületére,
- terítsük szét a szérumot a kártya kör alakú felszínén egy tippel, vagy egy műanyag, vagy fapálcika segítségével, amely a kitben található,
- a tipeket és a pálcikákat egy dezinficienszt tartalmazó edénybe dobjuk használat után,
- cseppentsünk 16 µl Pangborn antigént a szérum-mintához,
- helyezzük a kártyát egy rázógépfelületére, és 150 rpm sebességgel, 8 percig hagyjuk a szérumot és az antigén szuszpenziót elkeveredni,
- az eredményt 8 perc elteltével olvassuk le.

AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

Az eredményt jól megvilágított helyen, a műanyag kártyát az asztalra helyezve, vagy a kezünkben óvatosan forgatva kell leolvasni.

Ha a vizsgált minta tartalmaz antitesteket, a kártyán különböző méretű röggképződését tapasztalhatjuk, míg a röggöket körülvevő médium feltisztul (5. táblázat).

5. táblázat. A kvalitatív rapid plazma reagin (RPR) teszttel kapott eredmények értékelése (Evaluation of results of qualitative rapid plasma reagin (RPR) test)

EREDMÉNY	A TAPASZTALT REAKCIÓ
Reaktív teszt	Nagy vagy közepes méretű, fekete szénszemcsék láthatók a kör alakú terület teljes felületén, vagy inkább a szélén. Ugyanakkor a reakcióközeg szinte teljesen feltisztul.
Gyengén reaktív	Kevés számú, közepes méretű szénszemcsék láthatók a kör alakú terület szélén a reakcióközeg homogén marad.
Negatív	A mintában nem láthatók széncsemcsék. A reakcióközeg homogén, a szén-részecskék a kör közepén, egy fekete foltot formálnak.

MINŐSÉGELLENŐRZÉS

- Az eredményeket mindig a pozitív és a negatív kontrollok tesztelésével egyidőben kell értékelni, mely kontrollokat a kit tartalmazza,
- ha valamelyik kontroll nem ad megfelelő reakciót, a vizsgálatot minden szérummintával meg kell ismételni,
- azon szérum vagy plazma mintákat, melyek pozitív vagy gyengén pozitív reakciót adnak, hígítás után kvantitatívan is tesztelni kell,

GYNOFLOR
hüvelytabletta

M
MEDICO UNO

- néhány olyan beteg esetében, akik vérében nagy mennyiségű antitest található, előfordulhat, hogy a teszt csak gyengén pozitív reakciót mutat. A jelenleg azzal magyarázható, hogy a nagy mennyiségű antitest megakadályozza a nagyobb rögek képződését. Ilyen esetekben a szérum hígítása után szép rögeképződést tapasztalhatunk.

QUANTITATÍV RPR TESZT

ÁLTALÁNOSÁGBAN

A teszt kivitelezésére (titrálásra) a következő esetekben van szükség:

- A screening során pozitív a reakció,
- ha az RPR teszt negatív, de más tesztek pozitív reakciót adnak,
- ha a kezelőorvos indokoltnak látja.

A TESZT KIVITELEZÉSE:

- A vizsgálat megkezdése előtt minden reagenst melegítsünk szobahőmérsékletűre (25-30 percig),
- 50 µl frissen előkészített, izotóniás NaCl₂ oldatot cseppentsünk a megszámozott kártyák felületére 2-10-ig,
- cseppentsünk 50 µl szérumot az első, illetve a második kártya felületére,
- a második kártyán pipettázással óvatosan keverjük el a szérumot a sóoldattal. Próbáljuk meg elkerülni a buborékképződést,
- a második kártyáról (amely 1:2 hígítása az eredetinek) 50 µl-nyi mennyiséget pipettázunk a harmadik kártyára,
- ismételjük meg az előző lépéseket felező hígítási sorozatot készítve,
- az utolsó lemezről a felesleges mennyiséget (50 µl-t) távolítsuk el (így egy kétszeres hígítási sorozatot kapunk, mely sorozat első tagja a nem hígított, a második 1:2, a harmadik 1:4, stb., az ötödik 1:16, míg a tizedik 1:512 arányban tartalmazza az eredeti szérumot),
- adjunk 16 µl-nyi jól elszuszpendált Pangborn antigént minden kártyára, és rázassuk a kártyákat 8 percig.

AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

A teszt értékelésénél ugyanúgy járunk el, mint az eredeti RPR screening tesztnél. A legmagasabb hígítás, amely még pozitív, a szérum antitest-koncentrációjának tekinthető.

MINŐSÉGELLENŐRZÉS

Lásd: Qualitatív RPR teszt.

Megjegyzés: Mivel a kelet-európai országokban különböző cégek által gyártott tesztek kaphatók, melyeknél eltérő lehet az eredmények értékelése, a gyártó utasításait mindig tartsuk be.

EGYÉB, NON-TREPONEMA TESZTEK

Az RPR teszt után széles körben használt non-treponem tesztek a következők:

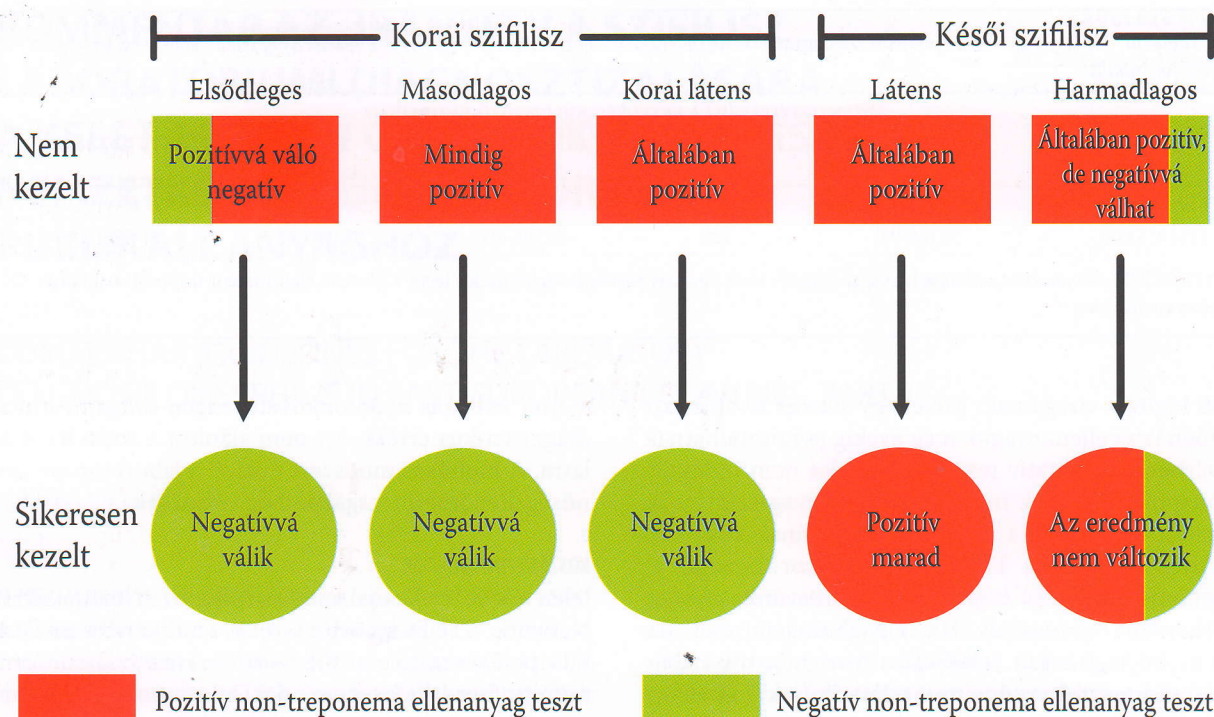
- „Venereal Disease Research Laboratory test” (VDRL). Az inaktivált szérummintát és az antigént egy üveg tárgylemez felületén mechanikusan keverjük el, majd mikroszkóp alatt vizsgálva keressük a pozitív reakciót jelző, pálcá-alakú struktúrákat.
- „Toluidine red unheated serum test” (TRUST). A teszt során hővel kezeletlen savót, valamint toluidin-vöröst, mint indikátort használunk. A módszer lényege, hogy a szénszemcsék helyett az antigént toluidin-vörös festékszemcsékhez kötik. A reagensek nem igényelnek fagyasztást.
- „Reagin screening test” (RST). Az antigént Sudanfekete festékhez kötik.
- „Unheated serum reagin test” (USR). Az antigént EDTA és choline-klorid hozzáadásával stabilizálják. Ennél a módszernél nem kell az antigén oldatot frissen elkészíteni. Hővel nem kezelt szérumot kell használni. Az eredmények kiértékeléséhez mikroszkóp szükséges.

A NON-TREPONEMA TESZTEK DIAGNOSZTIKUS ÉRTÉKÉNEK BECSLÉSE

Mivel ezen módszerek mindegyike a cardiolipin ellen termelődött antitesteket detektálja, egyik sem specifikus a szifiliszre. A reagin antitestek átmenetileg egyéb betegségekben szenvedő páciensek vérében is jelen lehetnek, mint például létfontosságú szervek (máj, vese, tüdő) szisztémás megbetegedéseiben, myocardialis infekcióban, arteriosclerosisban, akut virális infekcióban, beleértve a hepatitist, bárányhimlőt, kanyarót; maláriában, immunizálást követően és terhesség alatt is. Ezzel szemben viszont bebizonyosodott, hogy a krónikus az álpozitív (több, mint hat hónapig fennálló) eredmények összefüggésben lehetnek kötőszöveti rendellenességekkel, leprával, malignus folyamatokkal, intravénás droghasználattal valamint a beteg korával.

Elméletileg tehát, ha a non-treponema tesztek gyengén pozitív eredményt adnak (<1:8), a vizsgálatot meg kell ismételni egy treponema-specifikus teszttel, mint a FTA-ABS, ELISA, *T. pallidum* haemagglutinációs teszt (TPHA), *T. pallidum* passzív partikulum agglutinációs teszt (TP-PA), vagy a *T. pallidum* immobilizációs teszt/reakció (TPI vagy TPR).

A non-treponema tesztek csak a fertőzést követő hatodik héten válnak pozitívvá, így a sötétlátóteres mikroszkópizálással pozitív minták egy bizonyos hányada (akár 40%-a) is negatív lehet ezen tesztekkel. A kvantitatív reagin-tesztek a terápia hatékonyságának becslésére is alkalmasak, így egy sikeres, korai szifilisz-ellenes terápia



1. ábra. A non-treponema tesztek eredményeinek alakulása a szifilisz különböző fázisaiban, és a sikeres kezelést követően (Reactivity of non-treponemal serological tests by stage of syphilis and influence of successful treatment)

pia után a non-treponema tesztekben titercsökkenést, vagy teljesen negatívvá válást kellene tapasztalnunk. Viszont a szifilisz későbbi fázisában alkalmazott sikeres terápia esetén az antitestek perzisztálhatnak a vérben, szintjük csökkenhet, de sohasem emelkedik (1. ábra).

SPECIFIKUS TREPONEMA TESZTEK

ÁLTALÁNOSÁGBAN

Egész sejteket, fixált *T. pallidum* sejteket (az FTA-ABS tesztben), szonikálással feltárt, fixált *T. pallidum* sejteket (Nichols törzs, a TP-PA tesztben), élő treponemákat (TPI tesztben), vagy mesterségesen előállított rekombináns proteineket, szintetikus peptideket (ELISA-ban, TPHA-ban, és a módosított Western-blot és kromatográfiás strip-tesztben) használnak ezekben a vizsgálatokban.

Ezen specifikus tesztek elsősorban a non-treponema tesztek eredményeinek megerősítésére használják, ámbar azokon a területeken, ahol a betegség kis gyakorisággal fordul elő, használhatók screening vizsgálatokra is, hiszen az újabb ELISA tesztek teljesen automatizáltak.

A specifikus treponema tesztek a következők: ELISA, TPHA és ezek változatai, mint a mikrohaemagglutinációs teszt (MHA-TP), TP-PA teszt, úgy, mint a TPI/

TPIR, fluoreszcens treponema antitest teszt (FTA) és változatai, a módosított Western-blot, és kromatográfiás gyorsteszt.

A treponema tesztek előnye, hogy igen magas a szenzitivitásuk és főleg a specificitásuk (6. táblázat). Ráadásul a gyorsteszt a beteggyógy mellett is használható („point-of-care” (POC) tesztek) (13). Ezek a tesztek azonban nem alkalmasak a betegség lefolyásának, vagy a terápia hatékonyságának becslésére, hiszen még egy sikeres kezelést követően is, akár a beteg élete végéig pozitívak maradhatnak.

Mind a specifikus treponema-, mind a non-treponema tesztek pozitív eredményt adnak olyan betegek esetében, akik nem szexuális úton terjedő treponematózisban szenvednek, mint a frambózia (*T. pertenue*) és a pinta (*T. carateum*).

QUANTITATÍV TESZTEK

Néhány kelet-európai országban a kvantitatív tesztet a treponemák ellen termelődött ellenanyagok szintjének mérésére használják. Ezzel szemben a nyugat-európai útmutatók az eredményeket a következőképpen adják meg: reaktív, nem-reaktív, vagy gyengén reaktív, vagy a TPHA és a TP-PA tesztek esetében egy

GYN07/003

GYNOFLOR

hüvelytabletta

MEDICO BUD.

6. táblázat. Néhány treponema-specifikus szerológiai teszt specificitása és szenzitivitása (Sensitivity and specificity of some treponemal serological tests for syphilis)

TREPONEMA TESZT	SZENZITIVITÁS (%) A BETEGSÉG KÜLÖNBÖZŐ FÁZISAIBAN				SPECIFICITÁS (%)
	ELSŐDLEGES SZIFILISZ	MÁSODLAGOS SZIFILISZ	KORAI LÁTENS SZIFILISZ	KÉSŐI SZIFILISZ	
FTA-ABS	84 (70-100)	100	100	96 (93-100)	97 (94-100)
TPHA/TPPA	76 (64-90)	100	97 (94-100)	97 (94-100)	99 (98-100)

TPHA/TPPA *Treponema pallidum* hemagglutinációs teszt / passzív partikula agglutinációs teszt, FTA-ABS, fluoreszcens treponema antitest-abszorpciós teszt

1:80 hígítást vizsgálnak. Mivel egy sikeres terápiát követően is az ellenanyagok még évekig perzisztálhatnak a vérben, kvantitatív tesztek elvégzése nem indokolt. Hónapok vagy évek múltán az ellenanyag-szint csökkenhet, de ez nem a betegség lefolyásának következménye. Általában a TPHA tesztet akkor fogadjuk el pozitívnak, ha 1:80 hígításban a vörösvértestek agglutinációját tapasztaljuk. Ha az agglutinációt csak alacsonyabb hígításban észleljük, a teszt negatív. Habár az ELISA tesztek eredményei numerikusak, hiszen optikai denzitást mérünk, bármilyen változás az OD értékben is prediktív lehet a betegség lefolyását illetően.

A titer változás nyomonkövetése igen drága és nincs diagnosztikus értéke, így nem ajánlott a rutin használatra. A hígítós módszert inkább a laboratórium minőségellenőrzési vizsgálatához javasolják.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Jelen irányelv a Sexual and Reproductive Health (SRH) Network, STI Diagnostic Group, által készült az East Europe Committee of the Swedish Health Care Community, Swedish International Development Cooperation Agency (SIDA) támogatásával. Project koordinátor Marius Domeika.

GYN07/003



GYNOFLOR

hüvelytabletta

