

NAUČNO DRUŠTVO BOSNE I HERCEGOVINE

RADOVI

KNJIGA XXVII

ODJELJENJE MEDICINSKIH NAUKA

Knjiga 11.



Urednik

NEDO ZEC,
redovni član Naučnog društva BiH

SARAJEVO
1965

ERNEST I. GRIN i MIRA NADAŽDIN

PRIMJENA FLUORESCENTNOG TREPONEMA ANTIBODI-TESTA (FTA) U DIJAGNOSTICI SIFILISA

(Primljeno na sjednici Odjeljenja medicinskih nauka održanoj 11. II 1966. g.)

Klasične serološke reakcije za dijagnostiku sifilisa ne daju uvijek dovoljno pouzdane rezultate i broj lažno pozitivnih reakcija relativno je velik; stoga se godinama radilo da se pronade metoda sa većim stepenom specifičnosti.

1949. godine Neslon i Mayer uveli su test imobilizacije treponema (TPI) kao vrlo specifičnu i najpouzdaniju reakciju za diferencijaciju biološki lažno pozitivnih i stvarno pozitivnih u sero-dijagnozi sifilisa; ipak njezina upotreba nije mogla da bude općenito zavedena kao rutinska laboratorijska metoda zbog tehničkih i finansijskih teškoća te su nastavljena ispitivanja za pronalaženje jednostavnije i dovoljno specifične metode koja ne bi imala nedostatke TPI-testa.

Zahvaljujući saznanju da se antitijela mogu vezati sa fluorescentnim bojama a da pri tome ne gube imunohemijska svojstva i specifičnost vezivanja s odgovarajućim antigenom, Coons (2) je 1942. godine razradio imuno-fluorescentnu tehniku, koju je primijenio prvi put u histologiji da odredi lokalizaciju antigena u ćelijama. U tu svrhu Coons se koristio specifičnim antitijelima, koje je obilježio fluoresceinisocyanatom i na taj način dobio kompleks (antigen + specifična antitijela vezana sa fluorescentnom bojom) koji u ultravioletnom svjetlu fluorescira i postaje mikroskopski vidljiv. Ovo je direktna metoda fluorescentnog antibodi-testa, čiji je nedostatak što se za svaki antigen mora proizvesti odgovarajući antiserum, te je Coons ubrzo uveo indirektnu metodu, u kojoj specifična antitijela stupaju u reakciju s antigenom nebojadisana, a zatim se taj kompleks veže sa markiranim antitijelima, koja stvaraju fluorescenciju u ultravioletnom svjetlu.

Deacon (3) je 1957. godine prvi put primijenio fluorescentni treponema-antibodi-test (FTA) u serološkoj dijagnostici sifilisa. U toku sljedećih nekoliko godina pojavio se velik broj publikacija o tome testu i njegovoj vrijednosti.

MATERIJAL I METOD RADA

U našim ispitivanjima služili smo se indirektnom metodom, po kojoj smo obradili 244 seruma luetičnih pacijenata, 17 sa lažno pozitivnim serološkim reakcijama, 7 seruma pacijenata sa drugim dijagnozama i 27 seruma zdrave djece. Uporedo sa fluorescentnim testom izvodili smo i klasične serološke reakcije, i to reakciju vezanja komplementa po Kolmeru i VDRL sa kardiolipinskim antigenom (Serovakcinalni zavod, Zagreb), te reakciju bistrjenja po Meinickeu s lipoidnim ekstraktom (Zavod za zdravstvenu zaštitu NRS, Beograd).

Antigen

Kao antigen služila je suspenzija Nicholsovog soja treponeme palide. Treponeme se ekstrahiraju iz testisa inficiranih zečeva u 0,85% otopini NaCl, zatim se suspenzija centrifugira pet minuta (2.000 obrtaja) da se otklone fragmenti tkiva, eritrociti i spermatozoidi. Koncentracija se podesi na oko 35×10^6 treponema u jednom mililitru. Antigen pripremljen na ovaj način može se čuvati nekoliko nedjelja na temperaturi od $+4^{\circ}\text{C}$.

Konjugat

Za markiranje anti-antitijela upotrijebili smo fluorescein-isothiocyanate. Zečiji antihumani gama-globulin, koji služi za pripremanje konjugata, dobili smo iz fiziko-kemijskog odjeljenja Serum-instituta u Kopenhagenu. Konjugaciju smo vršili po metodi koju su opisali Borel i Durel (1) sa tom razlikom što otklanjanje suviška fluorescentne boje nismo vršili dijalizom, nego smo upotrijebili sephadex-stub G-25.

Serum koji se ispituje

Serum smo prethodno inaktivirali 30 minuta na 56°C i zatim razrijedili u fosfatnom puferu 1:200; ovo razrjeđenje se može smatrati standardnim (Deacon (4), Wilkinson (7), Nielsen (6)). Razblaživanjem seruma žele se izbjeći nespecifične reakcije jer se na taj način postojeća nespecifična antitijela u serumu nalaze u takvom razrjeđenju da ne izazivaju više fluorescenciju treponema.

Medij za uklapanje preparata načinjen je od jednog dijela fosfatnog pufera i devet dijelova kemijski čistog glicerina.

Tehnika izvođenja FTA-testa

U izvođenju fluorescentnog treponema-antibodi-testa primijenili smo metodu koju je opisao Nielsen (6), jer je jednostavna a rezultati su pouzdani.

a) U predmetno staklo dijamantnom olovkom ureže se krug u promjeru od 1 cm. Jedna kap antigena stavi se unutar kruga; razmaže i ostavi na sobnoj temperaturi da se osuši.

b) Stakla sa sasušanim antigenom stave se u aceton da se fiksiraju 10 minuta i zatim ponovno osuše na sobnoj temperaturi.

c) Ovako fiksiran razmaz antigena prelije se razrijeđenim serumom (1:200) i stavi 30 minuta u vlažnu komoru na sobnoj temperaturi.

- d) Izapere se puferom i obriše nježno filter papirom.
- e) Jedna kap konjugata razrijeđenog prema određenom titru stavi se na razmaz i inkubira u vlažnoj komori na sobnoj temperaturi 30 minuta.
- f) Izapere se puferom i jedna kap medija za uklapanje preparata stavi na razmaz i pokrije pokrovnim staklom.
- Rezultati se obilježavaju na sljedeći način:

ne fluorescira	—	negativan
vrlo slabo fluorescira	+	
jasna fluorescencija	++	pozitivan
jaka fluorescencija	+++	
vrlo jaka fluorescencija	++++	jako pozitivan

Za čitanje rezultata FTA-testa koristili smo se Reichertovim binokularnim mikroskopom, s izvorom ultravioletnog svjetla živine lampe HBO₂₀₀ firme Osram. Radili smo sa pobudnim filtrom E₂ UG 1/1,5 mm i zapornim filtrom GG 13/3+1 mm. Mikroskopirali smo sa povećanjem 500 puta.

REZULTATI I DISKUSIJA

Fluorescentna antitijela u slučaju luetične infekcije pojavljuje se vrlo rano i FTA postaje vrlo često ranije pozitivan negoli ostale reakcije. To također vrijedi i za TPI, u čemu je evidentna prednost FTA-testa.

Od 10 slučajeva neliječenog primarnog sifilisa raznog trajanja koje smo ispitali samo su dva pacijenta bila FTA-negativna. U oba slučaja bile su i klasične reakcije negativne, osim VDRL, koji je bio neodređen. U jednom slučaju FTA-test bio je jako pozitivan a MKR i VDRL neodređeni, dok je WaR-reakcija ostala negativna.

Ovi podaci pojedinih pregleda prikazani su na tab. I.

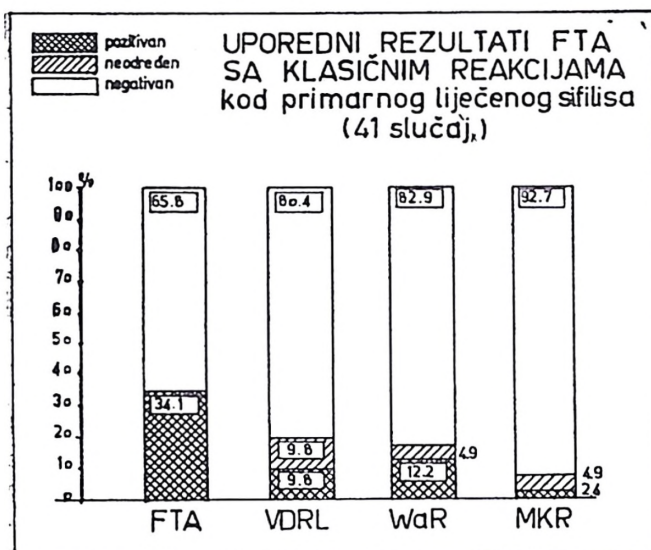
Tab. I

Rezultati FTA u slučaju neliječenog primarnog sifilisa (10)

Br. kartona	WaR	MKR	VDRL	FTA
16	++	++	++	++++
29	++	++	++	++++
55	++	++	++	++++
71	++	±	++	+++
129	—	—	±	—
153	—	±	±	+++
189	++	++	++	+++
211	++	+	++	+++
214	—	—	±	—
116	++	++	++	++++

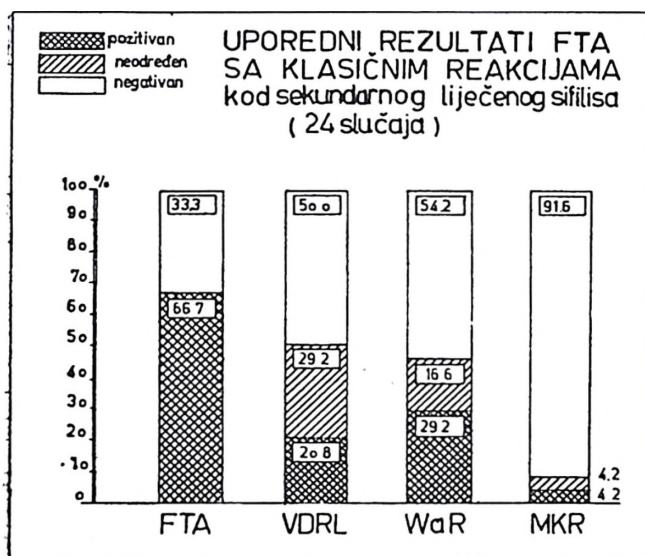
Ranije neodređena reakcija VDRL kod dva pacijenta u poređenju sa FTA pokazuje visoku osjetljivost te reakcije, ali bi se to moglo postići jačom koncentracijom seruma i u slučaju FTA. Međutim specifičnost i pouzdanost FTA-testa (1 : 200) kao izolirane reakcije je vrlo visoka, što se ne bi uvijek moglo reći za izolirani neodređeni nalaz VDRL.

Pregledani serum i 41 pacijenta sa liječenim primarnim seropozitivnim sifilisom pokazali su rezultate koji jasno ukazuju da se fluorescentna antitijela, koja dokazujemo FTA-testom, najduže zadržavaju u serumu liječenih pacijenata. Ovi rezultati prikazani su na grafikonu br. 1.



Grafikon 1.

Analogno stanje našli smo kod 24 pacijenta sa liječenim sekundarnim sifilisom (grafikon br. 2). U slučaju neliječnog klinički manifestnog



Grafikon 2.

sekundarnog sifilisa (tab. II), kako se moglo i očekivati, sve izvedene serološke reakcije dale su pozitivne nalaze.

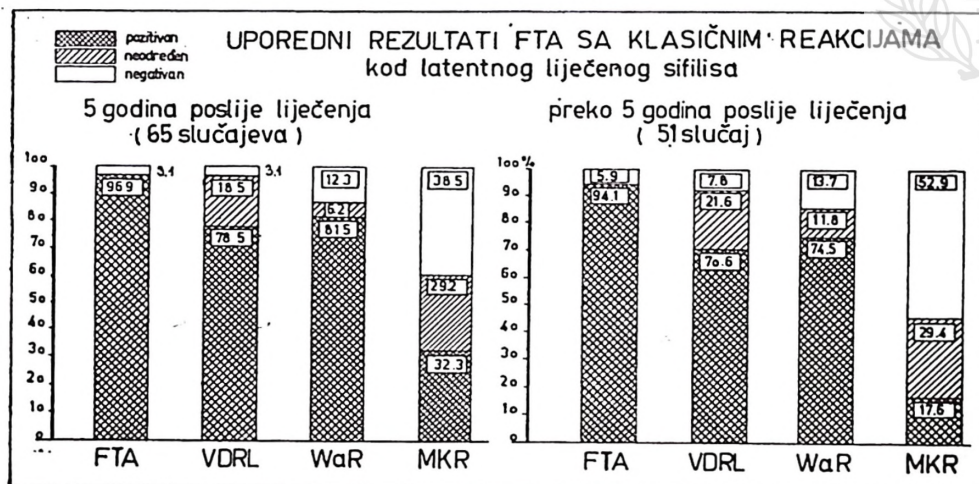
Tab. II

Rezultati FTA u slučaju neliječnog sekundarnog sifilisa (10)

Br. kartona	WaR	MKR	VDRL	FTA
12	++	++	++	++++
17	++	++	++	++++
100	++	+	++	+++
104	++	++	++	+++
134	++	++	++	++++
141	++	++	++	++++
264	++	++	++	++++
265	++	++	++	++++
203	++	++	++	++++
183	++	++	++	++++

Da fluorescentna antitijela najkasnije nestaju iz seruma pacijenata zaraženih sifilisom u poređenju s izvedenim klasičnim reakcijama, moglo se utvrditi i u slučaju latentnog sifilisa.

Rezultate pacijenata koji su imali latentni sifilis nepoznatog trajanja razdijelili smo u dvije skupine. Jednu sačinjavaju oni kod kojih je proteklo manje od pet godina poslije liječenja (65), a drugom su obuhvaćeni oni kod kojih je prošlo više od pet godina poslije liječenja (51). Rezultati su prikazani na grafikonu br. 3. Procenat pozitivnih u svim reakcijama

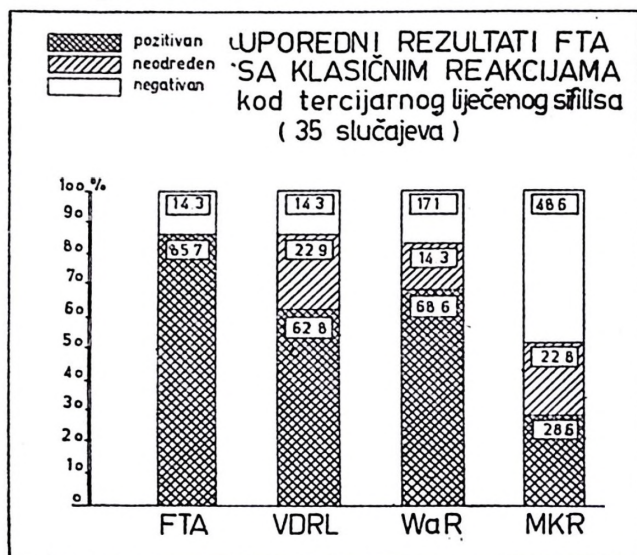


Grafikon 3.

nešto je manji u skupini sa dužim periodom proteklom poslije liječenja, zbog spontanog iščezavanja antitijela.

Međutim najmanja razlika u tome pogledu postoji u slučaju FTA-testa, kod kojeg se i residualna specifična antitijela u poređenju sa klasičnim reakcijama najduže zadržavaju u serumu.

Prilikom pregleda seruma 35 bolesnika sa tercijarnim liječenim sifilisom (grafikon br. 4) zastupljen je isti princip najvećeg procenta pozi-



Grafikon 4.

tivnih nalaza sa FTA-testom. Najbliže FTA-rezultatima stoji VDRL ako se uzmu u obzir i neodređeni nalazi. I ovdje, kao i u ostalim grupama liječenog sifilisa različitih stadija, fluorescentna antitijela su najstabilnija.

Nadalje smo ispitali 17 seruma pacijenata koji su zbog konstantno pozitivnih seroloških reakcija u manjem ili većem stepenu bili tretirani kao slučajevi latentnog luesa, iako bez anamnestičkih podataka ili kliničkih simptoma koji bi govorili da se u tim slučajevima stvarno radi o luetičnim infekcijama. U svih ovih 17 problematičnih slučajeva FTA-test je pokazao negativnu reakciju i prema tome klasične seropozitivne reakcije treba smatrati nespecifičnim (tab. III).

Tab. III
*Rezultati FTA u 17 pacijenata sa lažno pozitivnim
klasičnim serološkim reakcijama*

Br. kartona	WaR	MKR	VDRL	FTA
6	++	+	++	—
34	+	—	±	—
52	+	—	±	—
61	+	—	+	—
105	++	—	+	—
124	++	±	++	—
137	—	—	±	—
139	—	—	±	—
192	+	—	+	—
200	++	±	+	—
224	+	+	+	—
239	—	—	±	—
257	++	—	+	—
277	—	±	+	—
301	+	—	±	—
258	++	—	+	—
251	++	—	+	—

Pored ove skupine, visoka specifičnost FTA-testa pokazala se i u skupini od 7 slučajeva sa raznim dermatozama, među kojima su kod 6 pacijenata serološke klasične reakcije u većem ili manjem intenzitetu bile pozitivne.

U svim ovim problematičnim slučajevima u pogledu specifičnosti nalaza FTA-test bio je negativan (tab. IV).

Tab. IV

Rezultati ispitivanja seruma 7 pacijenata sa raznim dermatozama

Br. kartona	Dijagnoza	WaR	MKR	VDRL	FTA
82	Psoriasis generalisata	—	—	—	—
110	Dermatitis alergica	±	—	±	—
142	Pyodermia	±	—	±	—
145	Pityriasis versicolor	+	—	+	—
290	Erythrodermia	++	++	++	—
643	Herpes zoster	++	+	++	—
166	Pityriasis versicolor	+	—	+	—

U skupini utvrđenog kongenitalnog sifilisa (8 slučajeva) rezultati FTA-testa u cijelosti su se podudarali sa rezultatima klasičnih reakcija, kojima smo se koristili za dijagnozu sifilisa (tab. V).

Tab. V

Rezultati FTA u slučaju utvrđenog liječenog kongenitalnog sifilisa (8)

Br. kartona	WaR	MKR	VDRL	FTA
3	++	—	+	++
40	++	+	+	+++
41	++	+	++	+++
101	++	++	++	++
147	++	+	+	++++
152	++	++	++	++++
304	++	+	++	++
283	++	+	++	++++

To je u skladu sa poznatom činjenicom o upornosti pozitivnih seroloških nalaza u slučaju kongenitalnog sifilisa i u slučaju klasičnih reakcija.

U skupini ispitivane zdrave djece (27) u svim slučajevima FTA je bio negativan, što također govori o visokoj specifičnosti ove reakcije.

Korelacija između antitijela koja stupaju u reakciju FTA-testa i antitijela koja prouzrokuju imobilizaciju i aglutinaciju treponema još nije poznata. Međutim poznato je da antigeni koji su odgovorni za FTA-reakciju nisu identični sa lipoidnim antigenom *T. pallidum*.

Nismo bili u mogućnosti da obradimo TPI-test komparativno sa FTA-reakcijom, ali prema podacima iz literature vidi se da su mišljenja autora podijeljena. Dok, s jedne strane, Borel i Durel (1), te Fife i saradnici (5) tvrde da je FTA-test osjetljiviji od TPI-testa, Nielsen (6) zaključuje da je FTA-test nešto manje osjetljiv od TPI-testa, osim u slučaju primarnog sifilisa. Do kontradiktornih rezultata u vezi s osjetljivošću FTA-testa došlo je uslijed toga što se nije uvijek radilo sa istim razrjeđenjem ispitivanih seruma. Veću osjetljivost FTA-testa utvrdili su oni autori koji su radili sa koncentrovanijim serumima.

Imuno-fluorescentni test je jednostavan, osjetljiv i specifičan. Postupak izvođenja nije toliko skup kao postupak u slučaju TPI-testa, a visoka specifičnost fluorescentnog testa zavisi od kvaliteta antigena. Naša zapažanja su pokazala da svježe pripremljen antigen ne daje nespecifično pozitivne rezultate, dok se, ukoliko duže stoji, antigen mijenja i nakon 4 do 5 nedjelja pojavljuju se nespecifično pozitivni rezultati.

ZAKLJUČAK

FTA-test je vrlo osjetljiva reakcija za otkrivanje i malih količina treponemnih antitijela i jasno pokazuje veću specifičnost od klasičnih seroloških reakcija.

Visoka specifičnost i osjetljivost FTA-testa (1:200) utvrđena je u svim ispitivanim slučajevima neliječnog i liječenog sifilisa te sifilisa u liječenju.

FTA-test u pravilu postaje reaktivan prije klasičnih seroloških reakcija obuhvaćenih ovim radom (WaR, VDRL i MKR). Od klasičnih reakcija koje smo izvodili najosjetljiviji je bio VDRL, ali se u slučaju ove reakcije pojavljuje relativno visok postotak lažno pozitivnih nalaza, što se ne može reći za FTA.

U liječenih pacijenata FTA-test ostaje pozitivan duže nego sve klasične reakcije.

Visoku specifičnost FTA-testa dokazuju i nalazi u slučaju latentnog sifilisa i u problematičnim slučajevima sa lažno pozitivnim nalazima klasičnih reakcija. To se takođe odnosi na skupinu od 7 slučajeva raznih dermatoza.

APPLICATION OF FLUORESCENT ANTIBODY-TEST (FTA) IN SYPHILIS

SUMMARY

The FTA at 1:200 dilution was tested and compared with complement fixation test, the VDRL and MKR on 244 patients in different stages of the syphilitic infection (not yet treated, in treatment, after treatment), on 17 problem sera, 7 different skin disorders and 27 healthy children.

FTA test has proved to be highly sensitive, easily reproducible and specific.

In the untreated primary syphilis FTA was highly specific and slightly more sensible than standard serological tests.

In the treated patients the FTA persisted reactive for a longer time than any other classical serological test.

High specificity of the FTA test could be demonstrated especially in the group of latent syphilis and problem sera with biological false positive results.

LITERATURA

1. Borel, L. J. i Durel, P.: Immuno-fluorescence applied to the diagnosis of syphilis. WHO/VDT/SERO/92, 1959.
2. Coons, A. H., Creech, H. J., Jones, R. N. i Berliner, E.: The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody. *J. immunol.* 45, 159—170, 1942.
3. Deacon, W. E., Falcone, V. H. i Harris, A. d.: A fluorescent test for treponemal antibodies. *Proc. Soc. exp. biol. med.* 96, 477—480, 1957.
4. Deacon, W. E., Freeman, E. M. i Harris, A. d.: Fluorescent treponemal antibody test. Modification based on quantitation (FTA-200). *Proc. Soc. exp. biol. med.* 103, 827—829, 1960.
5. Fife, H. E., Bryan, M. B., Sanders, W. R. i Muschel, H. L.: Evaluation of the fluorescent treponemal antibody (FTA) test for syphilis. Comparison with *Treponema pallidum* immobilization (TPI) test. *Am. J. clin. path.* 36, 105—113, 1961.
6. Nielsen, H. A. i Idsoe, O.: Evaluation of the fluorescent treponemal antibody test (FTA). *Acta path. et microbiol. scandinav.* 57, 331—347, 1963.
7. Wilkinson, A. E.: Fluorescent treponemal antibody test. A preliminary report. *Brit. J. vener. Dis.* 37, 59—63, 1961.