

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ имени Н.И. Пирогова
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(ГБОУ ВПО РНИМУ имени Н.И. Пирогова Минздрава России)

На правах рукописи

ЭРМАТОВА Фотима Абдужалиловна

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ
КЛАССА М ДЛЯ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ СИФИЛИСА
(клинико-лабораторное исследование)**

(14.01.10 – кожные и венерические болезни)

Диссертация
на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук С.В. Ротанов

Москва - 2014

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	16
1.1. Особенности гуморального иммунитета при заражении сифилисом	16
1.2. Современные иммунохимические (серологические) методы исследования для диагностики сифилиса	21
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	34
2.1. Дизайн исследования	34
2.2. Материалы исследования	40
2.3. Методы исследования	42
2.3.1 Социологический опрос	42
2.3.2 Лабораторные методы исследования	42
2.3.3 Оценка показателей клинической информативности методов диагностических исследований	47
2.3.4 Статистическая обработка результатов исследований ...	49
 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	
ГЛАВА 3. ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТРЕПОНЕМО- СПЕЦИФИЧЕСКИХ IgM ПРИ ДИАГНОСТИКЕ СИФИЛИСА В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ	50
ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ КЛИНИЧЕСКОЙ ИНФОРМАТИВНОСТИ IgM МОДИФИКАЦИИ РЕАКЦИИ НЕПРЯМОЙ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ ПРИ РАЗНЫХ ФОРМАХ СИФИЛИСА	65
4.1. Клиническая характеристика групп пациентов	65
4.2. Результаты аттестации образцов сыворотки крови опытной и контрольной групп на содержание трепонемоспецифических антител в ИФА _{IgG+IgM+IgA} и РИФ _{abc} (IgG)	70

4.3. Результаты исследования образцов сыворотки крови в ИФА с определением специфических антител класса М к антигенам бледной трепонемы	74
4.4. Результаты исследования образцов сыворотки крови методом РИФ _{abc} -IgM с определением специфических антител к антигенам бледной трепонемы	83
ГЛАВА 5. РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ КЛАССА М И G К АНТИГЕНАМ <i>Treponema pallidum</i> МЕТОДОМ ИММУНОБЛОТТИНГА У БОЛЬНЫХ СИФИЛИСОМ ПЕРВИЧНЫМ	92
5.1. Определение трепонемоспецифических антител класса М (к антигенам TrN15, TrN17, TmpA и TrN47)	92
5.2. Определение содержания антител класса М к антигену TrN37	103
5.3. Определение трепонемоспецифических антител класса G (к антигенам TrN15, TrN17, TmpA и TrN47)	106
ГЛАВА 6. РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СРОКОВ ЦИРКУЛЯЦИИ СПЕЦИФИЧЕСКИХ IgM В КРОВИ БОЛЬНЫХ ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ	117
ГЛАВА 7. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ МЕТОДИК, ОСНОВАННЫХ НА ОПРЕДЕЛЕНИИ АНТИТЕЛ КЛАССА М, ПРИ ДИАГНОСТИКЕ РАННИХ КЛИНИЧЕСКИХ ФОРМ СИФИЛИСА	124
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	136
ВЫВОДЫ	149
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	151
ПРИЛОЖЕНИЕ	169
Приложение 1. В опросы анкеты об использовании современных иммунологических методов исследования для ранней	

	диагностики клинических форм сифилиса в медицинских организациях субъектов Российской Федерации по профилю дерматовенерология	169
Приложение 2.	Данные о числе вновь выявленных случаев заболевания ранними формами сифилиса и количестве проведенных лабораторных исследований для диагностики сифилиса в медицинских организациях дерматовенерологического профиля субъектов России в 2012 году	173
Приложение 3.	Медицинское изделие «Набор реагентов «Антипаллидум- Флюороген-IgM/IgG»	179
Приложение 4.	Инструкция по применению медицинского изделия «Набора реагентов «Антипаллидум-Флюороген-IgM/IgG», комплект 1: «Антипаллидум-Флюороген IgM»	181
Приложение 5.	Инструкция по применению медицинского изделия «Набор реагентов «Антипаллидум-Флюороген-IgM/IgG»; комплект 2: «Антипаллидум-Флюороген IgG»	185
Приложение 6.	Регистрационное удостоверение на медицинское изделие «Набор реагентов «Антипаллидум- Флюороген-IgM/IgG»	189
Приложение 7.	Медицинское изделие «Набор реагентов "Лайн-Блот- Сифилис"	190
Приложение 8.	Инструкция по применению медицинского изделия «Набор реагентов "Лайн-Блот-Сифилис"; комплект 1: "Лайн-Блот-Сифилис-IgM"	192
Приложение 9.	Протокол результатов исследования образцов в ИБ-IgM с «Набором реагентов "Лайн-Блот-Сифилис-IgM"	196
Приложение 10.	Регистрационное удостоверение на медицинское изделие «Набор реагентов "Лайн-Блот-Сифилис-IgM"	198

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- БЛПР** – биологически ложноположительные результаты исследования в иммунологических (серологических) реакциях на сифилитическую инфекцию;
- ДЭ** – диагностическая эффективность;
- ИБ** – иммуноблоттинг (**ИБ-IgM** и **ИБ-IgG** – модификации исследования с дифференцированным определением антител соответственно класса М или G);
- ИППП** – инфекции, передаваемые половым путём;
- ИФА** – иммуноферментный анализ;
- КДЛ** – клиническая диагностическая лаборатория;
- КС** – клиническая специфичность;
- КЧ** – клиническая чувствительность;
- ППР⁺** и **ППР⁻** - отношение правдоподобия соответственно положительных и отрицательных результатов лабораторного исследования;
- ПЦ⁺** и **ПЦ⁻** – предсказательная ценность положительных и отрицательных результатов исследования;
- ОП** – оптическая плотность, спектрофотометрический показатель оценки интенсивности окрашивания раствора в реакционной лунке при ИФА (**ОП_і** – значение ОП в реакционной лунке с исследуемым образцом; **ОП_{к-}** и **ОП_{к+}** - значения ОП соответственно с отрицательным и положительным контрольными образцами; **ОП_{cut off}** - значение ОП критическое, соответствующее уровню аналитической чувствительности метода исследования);
- РИФ** – реакция непрямой иммунофлюоресценции (**РИФ_{абс/200}** - модификации теста для повышения специфичности исследования путем абсорбции неспецифических антител или разведением в 200 раз; **РИФ_{IgM}** и **РИФ_{IgG}** - модификации исследования с дифференцированным определением антител соответственно класса М или G);
- РПГА** – реакция пассивной гемагглютинации;

- РУ** – регистрационное удостоверение медицинских изделий, дающее разрешение к их применению в медицинских учреждениях Российской Федерации;
- ФО** – Федеральные округа Российской Федерации (**СЗФО** - Северо-западный, **ЦФО** - Центральный, **ЮФО** - Южный, **СКФО** - Северокавказский, **ПрФО** - Приволжский, **УФО** - Уральский, **СФО** - Сибирский, **ДВФО** – дальневосточный);
- F_{ab}** – fragment antigen binding, антигенсвязывающий фрагмент в структуре иммуноглобулина;
- F_c** – fragment crystallizable, фрагмент иммуноглобулина, способный к кристаллизации;
- FTA** – Fluorescent Treponemal Antibody Test (зарубежный аналог реакция иммунофлюоресценции, РИФ);
- Ig** – Immunoglobulin, иммуноглобулины;
- kDa** – килодальтон, единица измерения молекулярной массы;
- STI** – Sexual Transmitted Infections - инфекции, передаваемые половым путем;
- T. pallidum*** – *Treponema pallidum*, бледная трепонема - возбудитель сифилиса.

ВВЕДЕНИЕ

Характер работы: клинико-лабораторный.

Аннотация:

Сифилитическая инфекция является антропонозным заболеванием, вызываемым - *Treponema pallidum*. При этой инфекции происходит преимущественно половой путь передачи инфекционного агента от больного человека здоровому. Возможны также: вертикальный путь - в результате внутриутробного инфицирования плода от больной сифилисом матери (врождённый сифилис) и гемотрансфузионный путь - заражение реципиента при переливании ему инфицированной донорской крови (Овчинников Н.М., 1956; Аковбян В.А. и др., 1998, 2007; Скрипкин Ю.К. и др. 1999; Goh B.T. et al., 2001; UK National Guidelines, 2008).

Сифилис характеризуется длительным хроническим течением с постепенным вовлечением в патологический процесс различных систем органов и развитием тяжелых осложнений (Скрипкин Ю.К. и др. 1999; Лосева О.К. и др., 2002; Аковбян В.А. и др., 2007; Соколовский Е.В. и др., 2008).

Уровни заболеваемости населения Российской Федерации сифилисом продолжают сохраняться высокими. По данным официальной государственной статистической отчетности 2013 года интенсивные показатели заболеваемости сифилисом по федеральным округам варьировали от 13,8 до 53,5 случаев на 100 000 населения, средний показатель по Российской Федерации составлял 28,9 случаев на 100 000 населения (Кубанова А.А. и др., 2014). В то же время уровни заболеваемости указанной инфекцией в большинстве развитых стран Западной Европы колеблются в пределах 3-10 случаев на 100 000 населения (European CDC: STI in Europe, 2012).

Для своевременного выявления больных сифилитической инфекцией определяющее значение играют результаты лабораторных исследований и, в первую очередь, иммунохимическими методами, позволяющими определять в крови факторы гуморального иммунного ответа, направленные против специфических антигенов возбудителя заболевания (Масеткин И.П. и др., 1997;

Овчинников Н.М. и др., 1987; Дмитриев Г.А., 2004; Петришина С.В., 2004; Фриго Н.В., 2006; Соколовский Е.В. и др., 2008, 2009; Китаева Н.В. и др., 2008; Eglstone S.I. et al., 2000; Larsen S.A. et al., 1995, 2006; Ratnam S., 2005; Young H., 1992, 2000).

Одним из наиболее ранних факторов гуморального иммунитета при инфекционном процессе является выработка специфических иммуноглобулинов класса М (IgM). Специфические антитела класса М способны выявляться в крови пациентов, инфицированных *T. pallidum*, на самых ранних этапах развития инфекции: уже через 1,5-2 недели после заражения, что клинически соответствует скрытому инкубационному периоду заболевания. При сифилисе первичном и вторичном содержание указанных антител в крови больных быстро нарастает и сохраняется на высоком уровне. По мере разрешения клинических проявлений вторичного периода уровень специфических IgM постепенно понижается. Развитие иммунного ответа на антигенную стимуляцию в организме больного сифилисом сопровождается постепенным переключением с синтеза антител класса М на продукцию более мелких молекул иммуноглобулинов класса G (Кашкин К.П., 2004; Новиков В.В. и др., 2005; Ярилин А.А., 2010; Хаитов Р.М., 2009).

Современные иммунохимические методы лабораторных исследований, такие как: иммуноферментный анализ (ИФА), реакция пассивной гемагглютинации (РПГА), иммунохемилюминесцентные исследования (ИХЛ), непрямая реакция иммунофлюоресценции (РИФ-200 и РИФ-абс), позволяют с высокой степенью клинической информативности определять в крови или спинномозговой жидкости больного присутствие иммуноглобулинов (Ig), направленных против наиболее специфичных антигенов возбудителя заболевания. При этом применяемые в практическом здравоохранении лабораторные технологии направлены, в большинстве случаев, на определение специфических Ig класса G или суммарного пула антител классов G, М и А. Лишь для ИФА при диагностике сифилиса разработаны и выпускаются наборы реагентов для дифференцированного выявления специфических IgM

(Приказ МЗ РФ №87 от 26.03.2001; Государственный реестр медицинских изделий и организаций, осуществляющих производство и изготовление медицинских изделий, 2014).

В то же время в последние годы зарубежными и отечественными производителями медицинских изделий были разработаны новые диагностические наборы реагентов для лабораторных исследований методами иммуноблоттинга (ИБ) и реакция иммунофлюоресценции, направленные на диагностику ранних форм сифилиса путём выявления специфических иммуноглобулинов класса М (Марданлы С.Г. и др., 2012, 2013, 2014).

Раннее определение специфических IgM также может быть применено для своевременного выявления случаев сифилиса раннего врождённого (определение специфических IgM в крови новорожденных) или случаев реинфекции у пациентов, ранее перенесших сифилис.

Научных исследований по оценке клинической информативности медицинских технологий определения специфических IgM к антигенам *T. pallidum* в последние годы проводилось недостаточно, подтверждением чего служит незначительное количество научных публикаций по обсуждаемому вопросу. Всё перечисленное явилось основанием для планирования и выполнения настоящего исследования.

Цель исследования:

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

Для выполнения этой цели нами были разработаны следующие задачи.

Задачи исследования:

1. Оценить частоту применения современных иммунохимических методов исследования для ранней диагностики сифилиса в медицинских организациях дерматовенерологического профиля субъектов Российской Федерации.
2. Изучить клиническую информативность иммуноферментного ана-

лиза, реакции непрямой иммунофлюоресценции и линейного иммуноблоттинга для определения трепонемоспецифических иммуноглобулинов класса М у больных сифилисом (по ГОСТ Р 53022.3-2008) на примере наборов реагентов для этих методов российского производства.

3. Изучить особенности содержания антител классов М и G к антигенам *T. pallidum*, определяемых у больных сифилисом первичным с использованием метода линейного иммуноблоттинга.

4. Изучить длительность циркуляции трепонемоспецифических иммуноглобулинов класса М в крови больных после окончания специфического лечения по поводу ранних клинических форм сифилиса.

5. Разработать порядок обследования пациентов при диагностике ранних форм сифилиса с использованием современных иммунохимических методов исследования на основе определения IgM к иммунодоминантным антигенам *T. pallidum*.

Научная новизна исследований

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

Впервые проведено исследование показателей клинической информативности (клиническая чувствительность и специфичность, диагностическая эффективность, а также предсказательная ценность положительных и отрицательных результатов) современных иммунохимических методов исследования (ИФА, РИФ и ИБ) путём определения специфических IgM к антигенам *T. pallidum* у больных разными клиническими формами сифилиса в соответствии с требованиями ГОСТ Р 53022.3-2008 и ГОСТ Р 51352-99 на примере наборов реагентов российских производителей.

Впервые установлено, что на начальных этапах развития сифилитиче-

ской инфекции у больных преобладает гуморальный ответ только на один из антигенов *T. pallidum* (TrN15, TrN17, TmpA и TrN47), применяемых для лабораторных исследований, и определена частота развития разных профилей иммунологической реактивности.

Впервые разработан порядок обследования пациентов лабораторными иммунохимическими методами с определением трепонемоспецифических антител класса М для диагностики ранних клинических форм сифилиса; разработанный порядок предложен к применению в специализированных медицинских организациях дерматовенерологического профиля России.

Практическая значимость работы

Установленная в исследовании показатели клинической информативности современных иммунохимических исследований с выявлением специфических IgM к антигенам *T. pallidum* (ИФА, РИФ и ИБ) позволяют осуществлять обоснованный выбор необходимого метода исследования для диагностики ранних клинических форм сифилиса.

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

Установленные профили иммунологической реактивности к разным антигенам бледной трепонемы (TrN15, TrN17, TmpA и TrN47) должны учитываться при конструировании иммуносорбентов в составе новых наборов реагентов для иммунохимических методов исследования при диагностике сифилиса.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Установлено недостаточное использование современных иммунохимических лабораторных исследований, основанных на выявлении специфических антител класса М к антигенам *T. pallidum*, при диагностике ранних клинических форм сифилиса в специализированных медицинских организа-

циях дерматовенерологического профиля субъектов Российской Федерации.

2. Определена клиническая информативности применения современных иммунохимических тестов для диагностики сифилиса (ИФА_{IgM}, РИФ_{abc}-IgM и ИБ-IgM) в соответствии с требованиями ГОСТ Р 53022.3-2008 и ГОСТ Р 51352-99, включающими оценку показателей клинической чувствительности и специфичности, диагностической эффективности, предсказательной ценности положительных и отрицательных результатов исследования, на примере отечественных наборов реагентов для соответствующих лабораторных методов, как разрешенных к применению, так и проходивших процедуру государственной регистрации в Российской Федерации.

3. У больных сифилисом первичным установлены разные профили иммунологической реактивности к основным иммунодоминантным антигенам бледной трепонемы (TrN15, TrN17, TrpA и TrN47), используемым при диагностике сифилиса методами ИБ-IgM и ИБ-IgG.

4. У больных, получивших адекватное антибактериальное лечение по поводу ранних 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 порядок обследования больных с начальными формами сифилиса с применением современных методов лабораторного исследования путём определения в крови антител класса М к иммунодоминантным антигенам *T. pallidum*.

Внедрение результатов исследования:

Результаты проведенных исследований по применению современных иммунохимических тестов с определением 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 иммунохимического исследования путём определения специфических антител класса М к антигенам *T. pallidum* применяют в Консультативном диагностическом центре ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России при установлении пациентам диагноза ранних клинических форм сифилиса.

Апробация материалов диссертации

Материалы диссертации были доложены и обсуждены на Региональной научно-практической конференции, организованной Минздравом Республики Башкортостан (г. Уфа, 20.09.2012 г.), V Всероссийском конгрессе дерматовенерологов и косметологов (г. Казань, 17-20.09.2013 г.), VIII Международной (XVII Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых (г. Москва, 21.03.2013 г.), Научно-практической конференции врачей клинической лабораторной диагностики и дерматовенерологов Ярославской области (г. Ярославль, 18.12.2013 г.).

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.

Публикации

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

Личный вклад автора в проведенное исследование

Автором самостоятельно подготовлен обзор данных отечественных и

зарубежных источников научной литературы и разработан дизайн проведения исследования; разработана анкета, проведен опрос и изучение данных, предоставленных из специализированных медицинских дерматовенерологических организаций субъектов Российской Федерации. Осуществлен отбор пациентов в опытную и контрольную группы исследования; получение от пациентов (в соответствии с информированным согласием) образцов крови, выделение сыворотки крови, её аликвотирование и хранение. Автором лично исследованы образцы сыворотки крови опытной и контрольной групп в ИФА, РИФ и ИБ для диагностики сифилиса, проведена систематика полученных данных, их анализ и интерпретация, осуществлены расчеты и сравнительная оценка клинической информативности изучавшихся лабораторных методов. Разработан порядок обследования пациентов с целью ранней диагностики сифилиса с использованием технологий, основанных на выявлении трепонемоспецифических антител класса М.

Диссертантом сформулированы выводы и практические рекомендации, установлены новизна и практическая значимость результатов проведенных научных исследований.

Практические рекомендации

1. Иммунохимические исследования, основанные на определении специфических антител класса М к антигенам *T. pallidum* (ИФА_{IgM}, РИФ_{abc}-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_{IgM}, РИФ_{abc}-IgM и ИБ-IgM) показано для обследования пациентов с целью выявления раннего сифилиса: в первую очередь - сифилиса первичного, а также сифилиса вторичного и нецелесообразно при сифилисе скрытом раннем ввиду низкой клинической чувствительности.

3. Для постановки IgM исследований (ИФА_{IgM}, РИФ_{abc}-IgM и ИБ-IgM)

в клинических диагностических лабораториях медицинских организаций рекомендуется применять только наборы реагентов, разрешенные к применению в Российской Федерации.

4. Обследование пациентов с целью своевременной диагностики ранних клинических форм сифилиса рекомендуется проводить в соответствии с разработанным для этого порядком, основанном на применении современных иммунохимических тестов, позволяющих определять в крови трепонемоспецифические антитела класса М (ИФА_{IgM}, РИФ_{абс-IgM} и ИБ-IgM), разработанном с учётом их клинической информативности по ГОСТ Р 53022.3-2008 (включающей: клиническую чувствительность и специфичность, диагностическую эффективность, предсказательную ценность положительных и отрицательных результатов исследования), а также особенностей развития иммунологической реактивности у больных начальными формами сифилиса (сифилис первичный) к иммунодоминантным антигенам *T. pallidum* (TrN15, TrN17, TmpA и TrN47), входящим в состав иммуносорбентов в наборы реагентов для соответствующих лабораторных методов исследования.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. ОСОБЕННОСТИ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ЗАРАЖЕНИИ СИФИЛИСОМ

При заражении сифилисом проникновение, персистенция и последующее размножение возбудителя заболевания, *Treponema pallidum*, в организме человека приводят к активации комплекса защитных механизмов как врождённого неспецифического, так и адаптивного, антиген-опосредованного иммунитета. В реализации иммунного ответа макроорганизма на инфекционный агент принимает участие множество разнообразных медиаторов клеточного обмена (провоспалительные и регуляторные интерлейкины, факторы роста и другие олигопептиды), повышенное содержание которых может определяться локально в первичном очаге развития инфекции (твердый шанкр) или в циркулирующей крови. Содержание указанных пептидов отражает выраженность защитной реакции макроорганизма, однако показатели их качественного и количественного содержания не являются характерными маркерами по отношению к специфическим антигенам возбудителя, вследствие чего они не могут служить для целей его идентификации или дифференциальной диагностики разных инфекционных заболеваний (Ройт А. и др., 2000; Кашкин К.П., 2004; Новиков В.В. и др., 2005; Ярилин А.А., 2010).

В то же время, изучение уровня целого ряда провоспалительных и противовоспалительных цитокинов (IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, IL-17, TNF- α и других) у больных с воспалительными дерматозами и инфекциями, передаваемыми половым путем, в разные клинические периоды развития заболевания позволяет лучше понимать патогенез инфекционного процесса, оценивать его активность, определять терапевтическую тактику и прогнозировать её эффективность (Нураденова Г.Р. и др., 2001; Кашкин К.П., 2004; Скуинь Л. М., 2004; Новиков В.В. и др., 2005; Иванов А.М. и др., 2005 а, 2005 б, 2007; Ярилин А.А., 2010; Сердюцкая М.В. и др., 2009; Кубанова А.А. и др., 2010-а; Новиков Ю.А. и др., 2012; Плахова К.И. и др., 2012; Verm B. et al., 2012).

Эффекторные механизмы адаптивного (приобретенного) иммунного

ответа макроорганизма на антигенную стимуляцию при инфекционных заболеваниях включают в себя гуморальное и клеточное звенья, соотношение этих элементов в протективном иммунитете при этом во многом зависит от биологических свойств возбудителя заболевания (Гариб Ф.Ю., 1987; Кашкин К.П., 2004; Скуинь Л.М., 2004; Ярилин А.А., 2010; Хаитов Р.М., 2009).

Сифилис, вызываемый *Treponema pallidum ssp. pallidum*, относится к бактериальным инфекциям; реакции адаптивного иммунитета при этом заболевании осуществляются с выраженным преобладанием гуморального звена, проявлением чего является выработка плазматическими клетками организма хозяина специфических антител, направленных против соответствующих антигенов возбудителя (Масеткин И.П. и др., 1977; Овчинников Н.М. и др., 1987; Петришина С.В., 2004; Кашкин К.П., 2004; Черешнев В.А. и др., 2006; Фриго Н.В., 2006, 2009; Соколовский Е.В. и др., 2008; 2009; Ярилин А.А., 2010; Кубанова А.А. и др., 2010-б, 2011; Фахретдинова Х.С. и др., 2010; Young H., 1992, 2000; Larsen S. et al., 1995, 1998; Egglestone S.I., Turner A.J.L., 2000; Goh B.T., van Voorst Vader P.C., 2001; STI: UK Guidelines, 2006).

В соответствии с современными представлениями гуморальный ответ при сифилисе дебютирует появлением в жидких средах макроорганизма (в том числе в сыворотке циркулирующей периферической крови) иммуноглобулинов класса М против наиболее иммуногенных и специфичных антигенов возбудителя (Красносельских Т.В. и Соколовский Е.А., 2010; Young H., 1992, 2000; Schmidt B.L. et al., 1994; Larsen S.A. et al., 1995, 1998; Luger A. 1998; Egglestone S.I., Turner A.J.L., 2000; Goh B.T., 2001, 2005; UK National Guidelines, 2008).

Антитела класса М имеют молекулярную массу порядка 970 кДа; по своей природе молекула IgM представляет собою пентамер, состоящий из 5 одинаковых субъединиц, каждая из которых сформирована двумя тяжёлыми (μ) и двумя лёгкими (κ или λ) аминокислотными цепями (рис. 1).

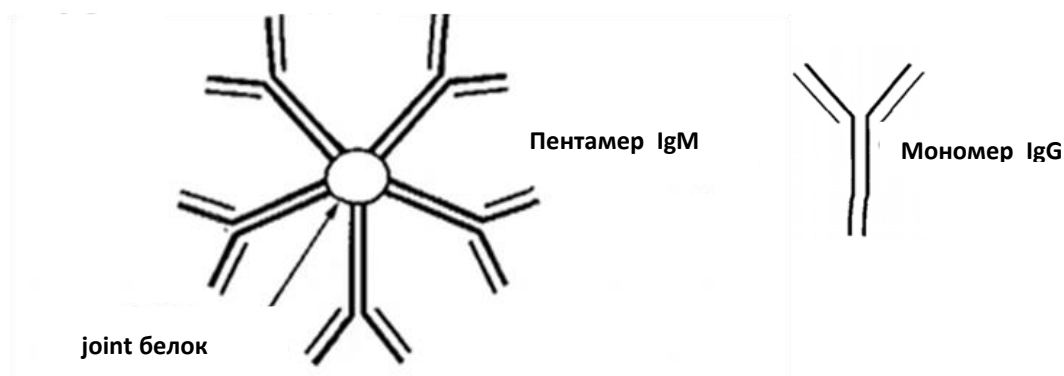


Рис. 1. Структура иммуноглобулинов классов М и G человека (цит. по А.А. Ярилину, 2010).

На одном конце каждой субъединицы иммуноглобулина М имеется по два антиген-распознающих Fab-фрагмента, способных за счет особой последовательности аминокислот своего варибельного участка специфически распознавать и связывать определенный антиген, против которого он синтезирован. Другой конец субъединицы IgM имеет Fc-участок, благодаря которому 5 радиально расположенных субъединиц объединяются в единую функциональную структуру особым joint-белком (Гариб Ф.Ю., 1987; Новиков В.В. и др., 2005; Ярилин А.А., 2010; Хаитов Р.М., 2009; Hemmings W.A., 1975; Baker-Zander S.A. et al., 1986).

Эволюционно антитела класса М относятся к наиболее древнему классу защитных антител. В сыворотке крови IgM составляют до 5-10% от общего количества иммуноглобулинов; их биологическая функция состоит в максимальном связывании чужеродного антигена и подготовке его для последующего удаления из организма с привлечением фагоцитирующих клеток. Благодаря своему строению каждая структурная молекула IgM может связывать до 10 молекул антигена одновременно (Гариб Ф.Ю., 1987; Кашкин К.П., 2004; Новиков В.В. и др., 2005; Ярилин А.А., 2010; Хаитов Р.М., 2009). При этом крупная величина молекулы и особенности структуры Fc-участков (его блокирование joint-белком) препятствуют проникновению IgM через тканевые барьеры и сосудистые мембраны (в том числе от матери через плаценту в кровотоки плода) (Аковбян В.А. и др., 2007; Красносельских Т.В. и др.,

2010; Hemmings W.A., 1975; Baker-Zander S.A. et al., 1986).

Иммуноглобулины класса М определяются в сыворотке крови уже на 10-14 день после проникновения *T. pallidum* в организм человека, максимальное же их содержание у больных сифилисом приходится на 6-9 неделю активного течения заболевания (Ляхов В.Ф., 1990; Сердюцкая М.В. и др., 2007; Красносельских Т.В. и др., 2010; Kern A., 1979; Luger A., 1998).

После успешного лечения антибактериальными препаратами специфические IgM у больных ранними клиническими формами сифилиса относительно быстро (через 3-12 месяцев) элиминируют из кровотока (O'Neill P. et al., 1972; Wilkinson A.E. et al., 1976; Merlin S. et al., 1985; Baker-Zander S.A. et al., 1986; Isinaga M., Sasaki E., 1990).

При отсутствии лечения содержание специфических IgM в крови больных сифилисом постепенно начинает понижаться, и происходит так называемое переключение с синтеза IgM на выработку антител класса G (Кашкин К.П., 2004; Ткачев В.К. и Вяткина Т.Г., 2005; Ярилин А.А., 2009; Moskophidis M. et al., 1984, 1989; Miyakawa H. et al., 2001).

Иммуноглобулины класса G в сравнении с IgM являются более мелкими белками с молекулярной массой 150 kDa. По своему строению они соответствуют одной из субъединиц IgM, в которой тяжелые цепи в структуре молекулы представлены γ -формами. Каждая молекула IgG способна связывать по две молекулы антигена. За счет меньшей величины и свободного Fc-фрагмента иммуноглобулины класса G являются более мобильными, они хорошо проникают через сосудистые мембраны, некоторые тканевые барьеры и плаценту (Аковбян В.А. и др., 2007; Hemmings W.A., 1975).

IgG составляют до 75% общего пула иммуноглобулинов сыворотки циркулирующей крови, их биологическая функция заключается в специфическом связывании антигена в труднодоступных для других крупных молекул иммуноглобулинов участках макроорганизма (Гариб Ф.Ю., 1987; Кашкин К.П., 2004; Новиков В.В. и др., 2005; Ярилин А.А., 2010; Хаитов Р.М., 2009).

Специфические IgG в кровотоке больных сифилисом появляются более поздно по сравнению с IgM - в конце 3 или на 4 неделе после инфицирования. Содержание специфических IgG в жидких средах макроорганизма постепенно увеличивается, достигает максимальной выраженности через 1-1,5 года, после чего несколько понижается, подвергаясь волнообразным колебаниям в зависимости от активности инфекционного процесса (обострения или стихания клинического течения заболевания) (Ляхов В.Ф., 1990; Ткачев В.К. и Вяткина Т.Г., 2005; Красносельских Т.В. и др., 2010; Baker-Zander S.A. et al., 1986).

Количество специфических IgG в циркулирующей крови больных после адекватно проведенного антибактериального лечения снижается медленно; они продолжают определяться в течение десятков лет или пожизненно (Ткачев В.К. и Вяткина Т.Г., 2005; O'Naill P. et al., 1972; Wilkinson A.E. et al., 1976; Merlin S. et al., 1985; Isinaga M. et al., 1990; Larsen S. et al., 1995).

Кроме перечисленных видов антител, в гуморальном иммунитете при сифилисе принимают участие иммуноглобулины класса А, которые могут быть представлены в виде мономеров и димеров (соединенных между собою двух субъединиц, напоминающих IgG), в которых тяжелые цепи представлены α -формами. В сыворотке крови содержание IgA может достигать 15-20% от общего пула иммуноглобулинов, в основном в виде двухвалентных мономеров. Антитела класса А секретируются на поверхности слизистых оболочек пищеварительного тракта, дыхательных, половых и мочевыделительных путей в виде четырехвалентных димеров; их присутствие в структуре слизи усиливает защитные барьерные функции слизистых оболочек вышеперечисленных систем органов (Новиков В.В. и др., 2005; Ярилин А.А., 2010; Хаитов Р.М., 2009).

Имуноглобулины класса А в форме димеров не способны проникать в кровотоки ребенка через систему плацентарного кровообращения и теоретически, также как и IgM, могут быть использованы для диагностики и дифференциальной диагностики врожденного сифилиса и случаев реинфекции

(Ярилин А.А., 2009; Baker-Zander S.A. et al., 1986; Pedersen N.S. et al., 1989; Schmitz J.L. et al., 1994).

Таким образом, иммунная защитная реакция после внедрения во внутреннюю среду макроорганизма возбудителя сифилиса характеризуется гуморальным ответом в виде выработки антител - иммуноглобулинов классов М, G и А. Гуморальный иммунитет у больных сифилитической инфекцией начинается синтезом антител класса М с последующим подключением (или переключением) на синтез антител класса G, а также образованием антител класса А. Биологические свойства и функции иммуноглобулинов разных классов существенно различаются между собою.

При этом пул иммуноглобулинов каждого класса включает в себя антитела, направленные к разным антигенным детерминантам *T. pallidum*, что может быть использовано в определенной степени для дифференциальной диагностики клинических форм заболевания и оценки активности течения инфекционного процесса.

1.2. СОВРЕМЕННЫЕ ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ (СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ) МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ СИФИЛИСА

Безусловно, абсолютным приоритетом при постановке этиологического диагноза является прямое выявление и идентификация инфекционного агента в биологическом материале, полученном от обследуемого пациента. Однако особенности клинического течения сифилитической инфекции не позволяют во всех случаях получать от пациента необходимые биологические образцы для исследования, а сами методы, применяемые для детекции *T. pallidum*, имеют свои пределы аналитической чувствительности (Аковбян В.А. и др., 2007; Китаева Н.В. и др., 2008; Соколовский Е.В. и др., 2009; Фриго Н.В. и др., 2009, 2012; Бондарева В.П. и др., 2010; Young Н., 1992, 2000; Larsen S. et al., 1995, 1998; Goh B.T. et al., 2001; Casal C.A.D. et al., 2011).

Для выявления сифилиса при рутинном скрининговом обследовании

населения, а также установлении клинической формы заболевания в настоящее время широко используются непрямые иммунологические (или серологические) методы лабораторного исследования, основанные на выявлении в жидких средах макроорганизма (крови или цереброспинальной жидкости) специфических иммуноглобулинов, направленных против характерных для возбудителя заболевания антигенных детерминант.

Используемые современные лабораторные методы позволяют выявлять специфические антитела классов М, G и А в виде суммарного пула или дифференцированно антитела класса G или М (Ломоносов К.С., 2002; Фриго Н.В., 2006, 2009; Аковбян В.А., 2007; Кубанова А.А. и др., 2010, 2011, 2012; Фахретдинова Х.С. и др., 2010; Moskophidis M. et al., 1989; Young H., 1992, 2000; Larsen S. et al., 1995, 1998; Egglestone S.I. et Turner A.J.L., 2000; Schmidt B.L. et al., 2000; Goh B.T. et van Voorst Vader P.C., 2001; STI: UK Guidelines, 2006; Ho E.L., Lukehart S.A., 2011).

Для определения пула специфических антител (суммарно IgM+IgG+IgA) при сифилисе применяют такие лабораторные методы как: иммуноферментный анализ (ИФА), реакции пассивной гемагглютинации (РПГА) и непрямой иммунофлюоресценции (РИФ), иммуноблоттинг (ИБ), иммунохроматографические (ИХГИ) и иммунохемилюминесцентные (ИХЛИ) исследования (Приказ Минздрава России №87 от 26.03.2001; Фриго Н.В., 2006, 2009; Китаева Н.В. и др. 2008; Бондарева В.П. и др., 2010; Кубанова А.А. и др., 2012; Larsen S. et al., 1995, 1998; Goh B.T. et van Voorst Vader P.C., 2001; STI: UK Guidelines, 2006, 2008). Клиническая информативность указанных методов исследования при диагностике сифилиса в XX веке была подтверждена значительным количеством научных работ (Рассказов Н.И. и др., 1990, 1991; Обрядина А.П., 1991; Чернова Т.А. и др., 2005; Чепурченко Н.В. и др., 2006; Фриго Н.В. и др., 2006 а, 2006 б, 2012; Muller F., Hagedorn H.J., 1998; McElborough D.J., 2001; Rostopira N. et al., 2003; Wang L.N. et al., 2007; McGill M.A. et al., 2010; Ly T.D. et al., 2010).

Дифференцированное определение содержания трепонемоспецифиче-

ских антител класса G или M в биологических жидкостях больного сифилисом стало возможным благодаря развитию технологии получения на лабораторных животных высокоспецифичных моноклональных антител, сенсibilизированных к несвязанному Fc-фрагменту молекулы IgG или к μ -форме тяжелой аминокислотной цепи, характерной для IgM (Ляхов В.Ф. и др., 1990; Сидорова Е.В. и др., 1995; Ткачев В.К. и Вяткина Т.Г., 2005; Moskophidis M. et al., 1989). Указанные моноклональные антитела применяются в наборах реагентов для ИФА и ИБ (Киселёва Г.А. и др., 2000; Китаева Н.В. и др., 2007; Moskophidis M., 1984).

Диагностическая информативность выявления при сифилисе специфических IgG разными методами изучена в большей степени (Фриго Н.В. и др., 2000; Дмитриев Г.А., Фриго Н.В., 2004; Young H., 1992; Miyakawa H. et al., 2001; Wang L.N. et al., 2007), что обусловлено более ранней разработкой технологии получения моноклональных антител против иммуноглобулинов класса G. Исследования по изучению клинической информативности выявления IgM при сифилисе в научной литературе представлены в существенно меньшей степени, что связано с проблемами разработки высокочувствительных лабораторных технологий определения антител указанного класса, при том, что содержание их в сыворотке крови человека значительно уступает содержанию антител класса G.

Иммуноферментный анализ для обследования больных сифилисом был разработан Е. Engvall и Р. Perlman (1972). В качестве иммуносорбента (антигенов на твердой фазе) в ИФА используют рекомбинантные химерные белки, являющиеся биотехнологическими аналогами липопротеинов *T. pallidum* (Tr 15, Tr17, Tr 47 и TmpA) (Беднова В.Н. и др., 1995; Корогодин Д.В. и др., 2005, 2007; Иванов А.М. и др., 2005; Чепурченко Н.В. и др., 2006; Ротанов С.В. и Османова С.Р., 2011-а, 2011-б; Ротанов С.В. и др., 2012-б; Schmidt V. L. et al., 2000; Brinkman M.V. et al., 2006). В последние годы производители наборов реагентов применяют для нанесения на иммуносорбент для ИФА не более двух-трех антигенов одновременно, комбинируя их в раз-

ных сочетаниях (Корогодин Д.В. и др., 2005, 2007; Чепурченко Н.В. и др., 2006; Ротанов С.В. и др., 2012-а, 2012-б; Brinkman M.B. et al., 2006).

При разработке диагностических наборов реагентов (тест-систем) для выявления IgM на основе ИФА традиционно используют два подхода. Первый из них (классическая «сэндвич»-технология) заключается в связывании иммуносорбентом (рекомбинантными или нативными антигенами *T. pallidum*, фиксированными на твердой фазе) специфических Ig всех классов, содержащихся в исследуемом образце больного сифилисом, с последующим выявлением среди них IgM с помощью конъюгата на основе моноклональных сывороток против μ -формы тяжелой цепи (Ляхов В.Ф., 1990; Ткачёв В.К., Вяткина Т.Г., 2005; Zrein M. et al., 1995).

Недостаточно высокая для клинических целей чувствительность описанной методики определения специфических IgM обусловлена высокой конкуренцией между антителами разных классов за специфические сайты связывания антигеном на твердой фазе, более низким содержанием в крови и невысокой мобильностью крупных антител класса M по сравнению с небольшими антителами классов G и A (Schmidt B.L. et al., 1994; 2000; McMillan A., Young H., 2008; McGill M.A. et al., 2010).

Другой методический подход проведения ИФА состоит в связывании на первом этапе исследования моноклональными сыворотками, специфичными к μ -форме тяжелой цепи, сорбированными на твердой фазе, всех иммуноглобулинов класса M из исследуемого биологического образца (технология «ловушки для антител», antibody capture ELISA) с последующим выявлением среди иммобилизованного пула специфических антител к антигенам возбудителя сифилиса. Это более чувствительный метод определения, но и при нём имеются трудности обеспечения высокой чувствительности исследования, обусловленные количественным соотношением антител различной специфичности в общем пуле IgM (Ляхов В.Ф., 1990; Рассказов Н.И. и др., 1990; Киселёва Г.А., 2000; Петришина С.В., 2004; Сердюцкая М.В. и др., 2007; Schmidt B.L. et al., 2000; Miyakawa H. et al., 2001; McMillan A. et

Young H., 2008).

В ряде исследований в сравнительном аспекте была изучена клиническая информативность определения IgM методом ИФА. Так В.Ф. Ляховым и соавт. (1990) при обследовании 73 больных разными клиническими формами сифилиса с применением разработанных авторами оригинальных наборов реагентов для ИФА_{IgM} и ИФА_{IgG} было показано, что в крови больных первичным сифилисом наблюдается максимальное содержание IgM при минимальном уровне IgG. При массовой диссеминации бледных трепонем, наблюдаемой в конце стадии первичного и при вторичном сифилисе, авторами установлено снижение содержания в крови IgM и значительное нарастание специфических IgG. Авторы также отметили, что на начальных этапах развития инфекционного иммунитета при сифилисе происходит образование антител к видоспецифическим белковым антигенам *T. pallidum*, а затем вырабатываются антитела к группо- и типоспецифическим детерминантам; то есть сначала появляются антитрепонемные, а затем антилипоидные антитела (Ляхов В.Ф. и др., 1990).

В исследовании Н.В. Чепурченко и соавт. (2001) была показана разная чувствительность ИФА_{IgM} при диагностике отдельных клинических форм у 190 больных сифилисом: при первичном – 78,8%, вторичном – 51%, скрытых формах – 24,3%; при этом клиническая чувствительность в ИФА_{IgG} составила 78,8; 100 и 100% соответственно. Специфичность результатов исследования в ИФА_{IgM} составила 100%, а ИФА_{IgG} – 99,4% (Чепурченко Н.В. и др., 2001).

Несколько более высокие показатели клинической чувствительности были получены в исследовании, проведенном при изучении 304 образцов сыворотки крови, полученных от больных сифилисом первичным – 89,1%, сифилисом вторичным – 82,4%, всеми скрытыми формами сифилиса – 15,4-34,4% (Китаева Н.В. и др., 2007).

С представленными данными согласуются результаты исследования 52 образцов сыворотки крови больных сифилисом первичным, показавшими отрицательные результаты исследования в реакции микроагглютинации к

антигенам *T. pallidum* (МНА-ТР), являющейся основным отборочным тестом в ряде стран Европы. Исследование указанных образцов крови продемонстрировало положительные результаты в ИФА_{IgG} с двумя наборами реагентов разного производства - в 22,6 и 63,4%, в ИФА_{IgG+IgM} с шестью разными наборами реагентов - в 48,5 - 76,9%, в ИФА_{IgM} с одним набором реагентов - в 86,5%. При этом авторы указали на ограничение использования ИФА_{IgM} в качестве отборочного теста для скрининга на сифилис ввиду недостаточно высокой клинической специфичности его результатов - 91% (Schmidt V.L. et al., 2000)

Отличающиеся результаты диагностической информативности ИФА_{IgM} были получены в исследовании Г.А. Киселёвой и соавт. (2000) при сравнительных клинических испытаниях эффективности применения 3 наборов реагентов разных производителей для ИФА_{IgM} с целью выявления антител к антигенам возбудителя сифилиса. Авторами была показана более высокая клиническая чувствительность ИФА_{IgM} при ранних клинических формах заболевания: при сифилисе первичном - 80-100%, при вторичном - 88,9-100%, при сифилисе скрытом раннем - 48,3-92,9%, при всех формах активного сифилиса и у больных после окончания антибактериальной терапии - 52,9-75,8%. При этом установлены достаточно высокие показатели клинической специфичности ИФА_{IgM} исследований - 82-100% (Киселёва Г.А. и др., 2000).

При обсуждении современных методов исследования, применяемых для диагностики сифилиса, зарубежные и отечественные исследователи характеризуют чувствительность ИФА_{IgM} при сифилисе первичном на уровне 78-93%, при вторичном – 51-85%, при скрытых формах – 24,3-64% (Киселёва Г.А. и др., 2000; Куляш Г.Ю., 2002; Китаева Н.В. и др., 2007; Moskophidis M. et al., 1984, 1989; Goh B.T., 2005; Seña A.C. et al., 2010).

После успешно проведенного лечения больных ранними формами сифилиса отрицательные результаты в ИФА_{IgM} определяются через 6 и 12 месяцев в 71 и 92% случаев соответственно (Young H., et al., 1998), при этом некоторые авторы отмечают персистенцию в крови антител указанного

класса до 18 месяцев после окончания терапии (Muller F., 1984).

Рядом исследователей в своих работах обсуждается значимость выявления в крови пациентов IgM к *T. pallidum* в качестве маркера присутствия в макроорганизме жизнеспособного возбудителя у больных, получивших адекватное лечение по поводу сифилиса, лиц с реинфекцией или с неудачами проведения антибактериальной терапии (Ляхов В.Ф. и др., 1990; Eggstone S.I. et Turner A.J.L., 2000; Castro R. et al., 2003; McMillan A., Young H., 2008).

Недостаточно высокая клиническая информативность (чувствительность и специфичность) отечественных наборов реагентов для ИФА_{IgM} вызывают неудовлетворение у клинических специалистов, использующих результаты указанных исследований для выявления и дифференциальной диагностики клинических форм сифилиса (Лосева О.К., 2000; Куляш Г.Ю., 2002; Чеботарёв В.В. и др., 2005, 2006; Китаева Н.В. и др., 2007).

По мнению же других авторов, применение при исследовании сывороток крови в ИФА_{IgM} для диагностики сифилиса диагностических наборов реагентов различного производственного выпуска показывало хорошую клиническую эффективность и воспроизводимость результатов лабораторных исследований (Киселёва Г.А. и др., 2000).

Реакция непрямой иммунофлюоресценции (РИФ) для выявления антител к *T. pallidum*, впервые была разработана W. Deacon и V. Falcone в 1957 году. В этом исследовании в качестве антигена используется весь набор антигенных детерминант, присущий цельной клетке патогенной бледной трепонемы, в связи с чем в сыворотке крови обследуемых пациентов могут выявляться неспецифические антитела к групповым антигенам сапрофитных трепонем и других бактерий. Обеспечение высокой специфичности исследований в РИФ при диагностике сифилиса достигается путем снижения уровня неспецифического сигнала при предварительном разведении исследуемых образцов в 200 раз (модификация РИФ₂₀₀) или связывании (абсорбции) групповых антител антигеном, приготовленным из культуральных трепонем штамма Reiter (РИФ_{абс}) (Овчинников Н.М. и др., 1987; Приказ Минздрава РФ

№87 от 26.03.2001).

Высокие показатели информативности результатов исследования в РИФ_{abc} (клинической чувствительности и специфичности) позволили отнести этот метод исследования к «золотому стандарту» иммунохимического (серологического) обследования при сифилисе (Дмитриев Г.А., 2004).

До последнего времени в России при диагностике сифилиса широко использовали методики исследования в РИФ, основанные только на выявлении суммарного пула специфических антител разных классов или IgG (Приказ МЗ РФ №87 от 26.03.2001; ЛюмиБест антипаллидум, 2012). В то же время разработаны лабораторные методики исследования в РИФ с определением трепонемоспецифических антител класса М, такие как: IgM-FTA-19S и IgM-FTA-abs (Schmidt B.L. et al., 1994, 2000; Binnicker M.J. et al., 2011) и РИФ_{IgM} (Гусева С.Н. и Данилов С.И., 2004).

Для осуществления 19S-IgM-FTA и IgM-FTA-abs (Fluorescent Treponemal Antibody Test) из исследуемого образца сыворотки крови либо выделяют 19S фракцию Ig (состоящую преимущественно из антител класса М), используя ионообменную хроматографию или ультрацентрифугирование в градиенте плотности (Lefevre J.-C. et al., 1990; Schmidt B.L. et al., 1994, 2000), либо удаляют фракцию IgG с применением специальных реагентов (Гусева С.Н. и Данилов С.И., 2004).

B.L. Schmidt и др. (1994) при сравнительном изучении разных методов выявления специфических IgM при сифилисе было убедительно показано преимущество применения 19S-IgM-FTA-abs: положительные результаты выявления IgM при использовании этого метода были получены в 100% случаев у пациентов с первичным и вторичным и в 96,0% - с ранним скрытым, в то время как в ИФА_{IgM} (Capture ELISA) наблюдали 100; 96,3 и 89,8% положительных результатов соответственно (Schmidt B.L. et al., 1994). В более поздней работе авторами была также подтверждена более высокая клиническая чувствительность при диагностике сифилиса 19S-IgM-FTA-abs (90,4%) по сравнению с методом FTA-abs (44%), позволяющем определять суммар-

ный пул специфических антител недифференцировано по классам иммуноглобулинов (Schmidt B.L. et al., 2000).

Также разная клиническая чувствительность исследований на сифилис была подтверждена при обследовании на сифилис в пренатальном периоде 33 беременных, у которых впоследствии наблюдали гибель плодов с признаками врожденного сифилиса. Положительные результаты определения специфических антител класса М к *T. pallidum*, свидетельствовавшие об активном течении сифилитической инфекции, в IgM FTA-Abs были получены у беременных только в 55,6% случаев, в то время как при исследовании в ИФА с детекцией IgG - в 94,4% (Casal C.A.D. et al., 2011).

В работе С.Н. Гусевой и С.И. Данилова (2004) методом IgM-РИФ_{abc} были исследованы образцы крови 55 беременных, у которых при первичном обследовании на сифилис были получены положительные результаты в одном из иммунологических тестов: стандартном комплексе серологических реакций (КСР), РИФ_{abc} или РИБТ. Для верификации положительных результатов первичного обследования авторами был предложен модифицированный способ определения специфических IgM: на подготовительном этапе из образцов сыворотки крови удаляли сывороточный IgG (до 95%) путем его осаждения на реагенте, содержащем сухой стафилококковый белок А. Последующее исследование полученных супернатантов в IgM-РИФ_{abc} позволило выявить положительные результаты в 14 (25%) случаев, что явилось основанием для постановки у обследованных женщин диагноза сифилис скрытый ранний. Авторы рекомендовали разработанный метод исследования для широкого применения в клинических лабораториях медицинских организаций (Старченко М.Е. и др., 1994; Гусева С.Н., Данилова С.И., 2004), однако до настоящего времени этот метод исследования широкого применения в практическом здравоохранении так и не получил.

Отечественным предприятием ЗАО «ЭКОлаб» (г. Электрогорск) была предложена методика РИФ_{abc}-IgM с предварительной обработкой образцов сыворотки крови RF-сорбентом (rheumatoid factor), представляющем собою

козьи антитела к IgG человека, удаляющие неспецифическое влияние на результаты исследования в РИФ_{abc} ревматоидного фактора сыворотки крови и предотвращающие вытеснение из иммунной реакции специфических антител класса М антителами класса G. При исследовании образцов сыворотки крови 144 больных сифилисом и 100 здоровых лиц в ИФА_{IgM} и РИФ_{abc}-IgM было получено полное совпадение положительных и отрицательных результатов (Марданлы С.Г. и др., 2012 а, 2012 б).

Простота и доступность предложенного метода исследования, а также организация промышленного производства разработанного для РИФ_{abc}-IgM диагностического набора реагентов (Антипаллидум-Флюороген-IgM/IgG, 2013; Марданлы С.Г. и др., 2012 а, 2012 б, 2014 а) позволили нам планировать проведение расширенных клинических исследований для оценки показателей его диагностической информативности в соответствии с регламентами, утвержденными в Российской Федерации (ГОСТ Р 53022.3-2008; ГОСТ Р 53434-2009; Приказ МЗСР РФ №735 от 30.10.2006; Приказ МЗСР РФ №708н от 23.08.2010).

Относительно новым методом иммунохимического исследования при диагностике сифилиса является линейный иммуноблоттинг или Western Blot, представляющий собой один из вариантов проведения ИФА, при котором используемые в исследовании специфические антигены *T. pallidum* дискретно фиксированы в виде параллельных линий на разных участках твердой фазы - полоске (стрипе) из нейтрального волокнистого материала (нейлона). В подавляющем большинстве наборов реагентов для ИБ при диагностике сифилиса используется известный комплекс из трех рекомбинантных белков (TrN47, TrN17 и TrN15) и одного синтетического пептида (TmrA), являющихся полными аналогами антигенов патогенной бледной трепонемы штамма Nichols; в редких случаях иммуносорбент дополняется рекомбинантным белком, аналогичным флагеллярному антигену TrN37-38. Раздельная иммобилизация антигенов на иммуносорбенте (стрипе) позволяет по окончании исследования полуколичественно определять в исследуемом образце нали-

чие антител к каждому из антигенов *T. pallidum*. (Кубанова А.А. и др., 2006; Фриго Н.В. и др., 2008; Сердюцкая М.В. и др., 2009; Lewis L.L. et al., 1990; Mayer M.P. et al., 1994; Kubanova A.A. et al., 2005; Maple P.A.C. et al., 2010; Binnicker M.J. et al., 2011).

Исследование образцов сыворотки крови больных с клиническими проявлениями врождённого сифилиса в относительно новой модификации метода исследования - иммуноблоттинге-IgM - показало высокую клиническую чувствительность выявления антител класса М - 92% (Lewis L.L. et al., 1990).

М.Р. Meyer с соавторами (1994) было проведено изучение в IgM иммуноблоттинге сывороток крови, полученных у новорожденных с сифилисом врождённым с клиническими проявлениями и без них, а также у детей без сифилиса, рождённых от перенесших сифилис серопозитивных и не болевших сифилисом матерей. Положительные результаты определения IgM к антигену TrN47 наблюдали в 92, 83, 10 и 0% случаев соответственно; кроме этого, у новорожденных была установлена различная частота выявления антител в отношении антигенов *T. pallidum* с разной молекулярной массой (от 15 до 110 кDa) (Mayer M.P. et al., 1994).

Отечественные наборы реагентов для исследования в формате иммуноблоттинга с определением IgM при диагностике сифилиса (ИБ-IgM) являются одними из последних разработок, внедренных в промышленное производство и разрешенных к применению в медицинских организациях Российской Федерации (Марданлы С.Г. и др., 2012 в, 2013, 2014 б).

В настоящее время зарубежными исследователями предложены новые мультипараметрические лабораторные методы исследования, соответствующее им наборы реагентов и аппаратное обеспечение для определения специфических IgM с целью диагностики сифилиса, в том числе с использованием технологии проточной флюорометрии (xMAP) и ИФА на основе белковых микробиочипов (Маркелов М.Л. и др., 2010; Кубанова А.А. и др., 2010-в; 2012-б; Ротанов С.В. и др., 2012 а; Ly T.D. et al., 2000; Binnicker M.J. et al., 2011; Но E.L., Lukehart S.A., 2011).

Используя наборы реагентов «BioPlex» (фирмы «Bio-Rad»), разработанные на основе калиброванных микросфер, E. Gomes с соавторами (2010) показали более высокую клиническую чувствительность иммунохимического выявления специфических IgM с регистрацией результатов лазерным проточным флуориметрическим датчиком в сравнении с методикой их определения в ИФА_{IgM} (Gomes E. et al., 2010). Однако технология проточной флуориметрии является весьма дорогостоящим исследованием, требующим оснащения клинических лабораторий дополнительным исследовательским оборудованием и реагентами, что снижает перспективу ближайшего внедрения этого метода в практику здравоохранения (Binnicker M.J. et al., 2011).

Технология исследования антител к разным антигенам *T. pallidum* на белковых микрочипах разработана в ФГБУ «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии» Минздрава России, однако промышленного выпуска наборов реагентов для этого метода в настоящее время ещё не осуществляется (Кубанова А.А. и др., 2010-в; 2012-б).

Таким образом, для раннего выявления больных инфекционными заболеваниями, в том числе и сифилисом, а также дифференциальной диагностики стадий или клинических форм заболевания, выявления случаев вертикальной передачи инфекции от больной матери плоду (сифилис врождённый) или реинфекции сифилиса показано проведение лабораторного исследования образцов крови пациентов с выявлением, в первую очередь, специфических иммуноглобулинов класса М. Для определения специфических IgM к антигенам *T. pallidum* разработаны разные методики лабораторного исследования, но их клиническая информативность в определенной степени зависит от стадии инфекционного процесса и качества используемых при этом диагностических наборов реагентов.

Применение результатов определения специфических антител класса М к антигенам *T. pallidum* при диагностике сифилиса регламентировано многочисленными алгоритмами обследования пациентов (Ломоносов К.С., 2002; Петришина С.В., 2004; Ткачев В.К., Вяткина Т.Г., 2005; Фриго Н.В.,

2006, 2009; Аковбян В.А. и др., 2007; Вагнер В.П. и др., 2007; Бондарева В.П. и др., 2010; Ткачёв В.К., 2012; Schmidt B.L. et al., 1994; Luger A. 1998; Но E.L., Lukehart S.A., 2011), а также действующими методическими и клиническими рекомендациями и стандартами (Приказ Минздрава РФ № 87 от 26.03.2001; Соколовский Е.В. и др., 2008, 2009; Кубанова А.А. и др., 2010, 2011, 2012; Young H., 1992, 2000; Egglestone S.I., Turner A.J.L. 2000; Goh. et al., 2001; STI UK Guidelines, 2006; Seña A.C., 2010).

Однако оптимизация современных методов лабораторного определения трепонемоспецифических IgM и появление новых разрешенных к применению в медицинских организациях Российской Федерации наборов реагентов для этих методов исследования требует проведения соответствующей клинической оценки их диагностической информативности на репрезентативной выборке пациентов в соответствии с действующими нормативными документами (Национальные стандарты: ГОСТ Р 51352-99; ГОСТ Р 53022.3-2008; ГОСТ Р 53434-2009; Приказ Минздравсоцразвития РФ №708н от 23.08.2010).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Дизайн исследования

Научная работа была выполнена в период 2012-2014 годов на кафедре дерматовенерологии лечебного факультета Государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования Российский научно-исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Министерства здравоохранения России (ГОУ ВПО РНИМУ имени Н.И. Пирогова Минздрава России), а также в отделении сифилидологии отдела инфекций, передаваемых половым путем, и серологической лаборатории лабораторного центра Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии» Министерства здравоохранения России (ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России).

Для выполнения задач и достижения цели научной работы нами были определены последовательность, содержание и необходимый объем проведения исследований, а также выбраны лабораторные методы исследования и соответствующие им наборы реагентов, разрешенные к применению в России или на момент начала исследований уже проходившие процедуру государственной регистрации в соответствии с установленными правилами.

***1 этап.** Изучение применения современных иммунохимических методов исследований для ранней диагностики разных клинических форм сифилиса в специализированных медицинских организациях дерматовенерологического профиля субъектов Российской Федерации (в том числе путём дифференцированного определения трепонемоспецифических IgM в ИФА, РИФ и иммуноблоттинге).*

Для выполнения указанной задачи нами была разработана анкета, содержащая перечень вопросов, позволявшая получать информацию об использовании современных иммунохимических методов исследования для диагностики сифилиса в клинических лабораториях медицинских организаций субъектов Российской Федерации по профилю дерматовенерология

(в том числе путём дифференцированного определения трепонемоспецифических IgM или IgG разными методами исследований: в ИФА, РИФ и иммуноблоттинге) (Приложение 1).

Разработанные анкеты в 2013 году были направлены руководителям 83 медицинских организаций по профилю дерматовенерология субъектов Российской Федерации всех 8 федеральных округов; полученные ответы были проанализированы.

2 этап. *Оценка клинической информативности определения трепонемоспецифических IgM в крови больных разными формами сифилиса в современных иммунохимических исследованиях: иммуноферментном анализе, реакции непрямой иммунофлюоресценции и линейном иммуноблоттинге.*

Для выполнения клиничко-лабораторного раздела исследования были изучены современные требования и нормативные документы, позволяющие проводить оценку клинической информативности наборов реагентов и методов лабораторного исследования, в том числе:

- Федеральный закон Российской Федерации № 323-ФЗ от 21 ноября 2011 года «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации»;
- Постановление Правительства Российской Федерации № 1416 от 27 декабря 2012 г. «Об утверждении правил государственной регистрации медицинских изделий»;
- Национальный стандарт ГОСТ Р 53022.3-2008 «Технологии лабораторные клинические. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов»;
- Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 53434-2009. «Принципы надлежащей лабораторной практики»;
- Приказ Минздравсоцразвития России №735 от 30.10.2006 г. «Об утверждении Административного регламента Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития по исполнению государственной функции по регистрации изделий медицинского назначения»;
- Приказ Минздравсоцразвития Российской Федерации № 708н от

23.08.2010 г. «Об утверждении Правил лабораторной практики».

Для проведения клинических лабораторных исследований был организован отбор пациентов с разными клиническими формами сифилиса (опытная группа), а также лиц без клинических, лабораторных и анамнестических указаний на наличие этого заболевания (контрольная группа сравнения). Особую подгруппу в группе сравнения составили пациенты без установленного клинического диагноза «сифилис», с образцами крови которых при скрининговом и/или последующем исследованиях были получены положительные результаты лабораторных тестов для диагностики сифилиса, расцененные как биологически ложные положительные результаты (БЛПР).

Базовыми критериями для отбора в опытную и контрольную группы в настоящем исследовании были определены следующие признаки:

- наличие в медицинской документации пациента письменного информированного согласия на проведение научных изысканий с образцами крови, предоставленными для проведения диагностических исследований;
- количество венозной крови в образце, достаточное для проведения запланированных иммунологических исследований на сифилис (не менее 0,8 мл сыворотки крови);
- качество образцов крови, соответствующее условиям проведения лабораторных иммунохимических исследований на сифилис (отсутствие в сыворотке крови визуальных признаков гиперлипидемии, гемолиза и/или бактериального пророста);
- репрезентативное количество образцов для проведения исследований в каждой группе пациентов, позволяющее получить оцениваемые показатели в процентах;
- отсутствие у пациента лабораторных указаний на наличие ВИЧ-инфекции.

Дополнительными критериями для включения в опытную группу являлись следующие:

- наличие у пациента впервые в жизни установленного клинического диаг-

ноза сифилитической инфекции;

- получение образцов венозной крови у пациентов до начала проведения антибактериальной терапии.

Дополнительные критерии для включения в контрольную группу:

- отсутствие у пациента установленного клинического диагноза сифилитической инфекции и указаний на перенесенное заболевание в анамнезе;
- получение образцов венозной крови у пациентов, не принимавших антибактериальные препараты за последние 1,5 месяца;
- для подгруппы образцов с БЛПР - получение положительных результатов в одном или нескольких тестах на сифилис, тем не менее не послуживших основанием для постановки клинического диагноза «сифилис».

Образцы сыворотки крови, включенные в опытную и контрольную группы, были исследованы в иммунохимических (серологических) тестах для диагностики сифилиса, основанных на дифференцированном определении трепонемоспецифических антител только класса М или класса G с применением технологии иммуноферментного анализа (ИФА_{IgM} или ИФА_{IgG}), реакции непрямой иммунофлюоресценции (РИФ_{абс}, РИФ₂₀₀ и РИФ-IgM), а также иммуноблоттинга (ИБ-IgG и ИБ-IgM).

Полученные в исследовании результаты были изучены и рассчитаны показатели клинической информативности их применения при диагностике сифилиса. Данные клинико-лабораторного исследования были проанализированы для определения приоритетов их использования при обследовании населения с целью выявления ранних форм сифилитической инфекции и последующей разработки соответствующих порядков их применения.

3 этап. *Изучение особенностей содержания специфических антител класса М и G к разным антигенам *Treponema pallidum* в крови больных сифилисом первичным методом иммуноблоттинга.*

Для проведения исследования были использованы образцы сыворотки крови опытной группы, полученные от пациентов с начальными формами сифилитической инфекции: впервые в жизни установленным диагнозом **си-**

филис первичный. Эти образцы были исследованы в ИБ с дифференцированным определением антител класса М и G к антигенам TrN15, TrN17, TrpA и TrN47; кроме этого, ограниченное количество образцов сыворотки крови также были изучены путем дифференцированного определения антител класса М к антигену TrN37 (ограничение количества исследований было обусловлено выявленной недостаточной чувствительностью этого теста и отсутствием отечественных наборов реагентов для этого).

Полученные данные были проанализированы с целью определения последовательности и силы иммунного ответа макроорганизма на отдельные антигены возбудителя заболевания, применяемые в составе иммуносорбентов диагностических наборов реагентов, и выработки порядков для интерпретации результатов исследований и диагностики указанной инфекции.

***4 этап.** Оценка длительности циркуляции трепонемоспецифических IgM в крови больных ранними формами сифилиса, получивших антибактериальное лечение по поводу сифилиса, с применением современного метода иммунохимического исследования (ИФА).*

Для выполнения указанного раздела исследования был осуществлен отбор образцов крови, полученных от пациентов с ранними формами сифилиса, в разные сроки клинико-серологического наблюдения после проведения им антибактериальной терапии (от 3 месяцев до 3 лет).

Базовыми критериями для отбора в указанную опытную группу явились следующие признаки:

- наличие в медицинской документации пациента письменного информированного согласия на проведение научных исследований с полученными от него образцами крови для проведения диагностических исследований;
- наличие данных о проведении пациенту полноценной антибактериальной терапии в соответствии с рекомендациями, утвержденными в Российской Федерации (Методические рекомендации Минздрава России, 1999; Кубанова А.А, 2010, 2012а; Федеральные клинические рекомендации ..., 2013) и сроках наблюдения;

- количество венозной крови в образце, достаточное для проведения запланированных иммунохимических исследований на сифилис (не менее 0,8 мл сыворотки крови);

Критерием исключения из исследования являлась непригодность образца крови для иммунохимического исследования: гиперлипидемия, гемолиз или бактериальный пророст.

Образцы сыворотки крови были исследованы в ИФА с определением трепонемоспецифических антител только класса М (ИФА_{IgM}).

Полученные в исследовании результаты были изучены и сопоставлены с учетом сроков клинико-серологического наблюдения после окончания антибактериальной терапии, а также использованного метода терапии.

5 этап. *Разработка порядков обследования населения с целью раннего выявления больных сифилисом с использованием современных иммунохимических методов определения IgM к иммунодоминантным антигенам *T. pallidum*.*

По результатам проведенных клинических лабораторных исследований, основанных на выявлении трепонемоспецифических антител класса М, с учётом установленных показателей клинической информативности изучавшихся лабораторных методов, очередности и интенсивности образования антител к отдельным антигенам возбудителя сифилиса у больных на начальных этапах развития инфекционного процесса был разработан порядок клинико-лабораторного обследования пациентов с целью раннего выявления сифилитической инфекции.

2.2. Материалы исследования

При выполнении данного научного исследования на разных этапах выполнения работы в качестве материалов и объектов изучения были использованы:

- ответы на вопросы 60 (72,3%) заполненных анкет, полученных нами в 2013 году при опросе врачей серологических лабораторий и клинических отделений специализированных медицинских организаций по профилю дерматовенерология 83 субъектов Российской Федерации (Приложение 1-2);

- данные официальной государственной статистической отчетности Минздрава России о заболеваемости населения России ранними клиническими формами сифилиса в 2012 году (Ресурсы и деятельность медицинских организаций дерматовенерологического профиля ... Статистические материалы, 2013) (Приложение 2);

- 492 образца венозной крови, полученные для лабораторных исследований от пациентов с впервые в жизни установленным диагнозом сифилитической инфекции до начала проведения им антибактериальной терапии (основная опытная группа); в том числе: 79 - с диагнозом сифилис первичный, 205 – сифилис вторичный, 114 – сифилис скрытый ранний, 62 – сифилис скрытый неуточнённый как ранний или поздний, 32 – сифилис скрытый поздний;

- 341 образец венозной крови, полученный для лабораторных исследований от больных ранними формами сифилиса (в том числе: сифилис первичный - 30, вторичный - 148 и скрытый ранний – 163) в различные сроки наблюдения (от 3 месяцев до 3 лет) после проведенного им антибактериального лечения (дополнительная опытная группа);

- 153 образца сыворотки венозной крови, полученные от лиц без клинических, анамнестических указаний на наличие активного или перенесенного ранее сифилиса (группа контроля); в том числе: 123 образца крови, полученные от активных доноров крови и показавшие отрицательные результаты лабораторных тестов для диагностики сифилиса, и 30 образцов, полу-

ченные от пациентов с биологически ложноположительными результатами лабораторных тестов для диагностики сифилиса.

Подготовку пациентов (больных сифилисом и здоровых лиц) к получению проб крови для исследования, процедуру взятия образцов венозной крови осуществляли в соответствии со стандартизованными условиями, разработанными в ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России: «Стандартными операционными процедурами: СОП № 001/01-02 СИФ и СОП № 002/01-02 СИФ (Кубанова А.А. и др., 2008) с использованием систем одноразового применения и вакуумированных пробирок. Полученные образцы крови подвергали первичному фракционированию на лабораторных центрифугах в течение 10 минут при скорости вращения ротора 3000 оборотов в минуту. Образцы сыворотки крови до начала лабораторных исследований сохраняли в замороженном состоянии при температуре минус 70-80 °С в виде отдельных аликвот по 150-200 мкл (в микропробирках типа эппендорф с крышками).

Все образцы крови получали маркировку в виде цифрового кода, соответствующего порядковому номеру получения биологического материала, размещаемого на хранение в морозильной камере, и не включавшего никаких дополнительных обозначений, указывающих на принадлежность образца к опытной или контрольной группам, а также на клиническую форму заболевания.

Перед началом исследования образцы сыворотки крови подвергали оттаиванию в неподвижном штативе при комнатной температуре в течение 30 минут. Оттаявшие образцы тщательно перемешивали путем 5-кратного переворачивания микропробирок с образцами. Образцы крови из одной пробирки исследовали в разных иммунохимических тестах в течение первых 3 дней после размораживания; в этот период времени пробы сохраняли в охлаждающей камере бытового холодильника при температуре + 4-8 °С; пробы повторно не замораживали. При необходимости проведения дополнительных исследований получали новую аликвоту из морозильной камеры. Для исследования каждого образца использовали одноразовые наконечники.

2.3. Методы исследования

2.3.1 Социологический метод (анкетный опрос)

Для изучения частоты использования в специализированных медицинских организациях по профилю дерматовенерология субъектов Российской Федерации современных иммунологических методов исследований для диагностики сифилиса был применен анкетный опрос врачей серологических лабораторий указанных медицинских учреждений. Специально разработанная анкета (Приложение 1), включала вопросы о количестве выполненных в каждом учреждении в 2012 году специфических лабораторных тестов для диагностики сифилиса вообще и каждым методом в отдельности, а также методах лабораторного обследования, применяемых клиническими специалистами для диагностики разных клинических форм заболевания.

2.3.2 Лабораторные методы исследования

Для исследования образцов крови пациентов опытной и контрольной групп были применены методы иммунохимического (серологического) исследования для диагностики сифилиса, регламентированные действующими нормативными и методическими документами (Приказ Минздрава России №87 от 26.03.2001 г.; Клинические рекомендации РОДВК, 2012, 2013):

- **ИФА** – иммуноферментный анализ (в модификациях определения пула трепонемоспецифических антител классов М, G и А суммарно или дифференцированного выявления антител класса М и G);
- **РИФ** – реакция непрямой иммунофлюоресценции (в модификации РИФ_{abc} с целью определения антител к *T. pallidum* классов G или M);
- **ИБ** – иммуноблоттинг, линейный иммуноферментный анализ, Western blot (в модификации ИБ-IgG и ИБ-IgM с целью отдельного определения антител к *T. pallidum* соответственно классов G и M).

Принцип выполнения указанных иммунологических исследований состоит в специфичном взаимодействии антител, содержащихся в образцах крови больных сифилисом, с антигенами *T. pallidum*, входящими в состав

иммуносорбентов диагностических наборов реагентов, с образованием иммунных комплексов и последующем выявлении этих иммунных комплексов за счет применения видоспецифических конъюгатов, сенсibiliзированных к иммуноглобулинам человека соответствующего класса.

В соответствии с принятыми в клинической лабораторной диагностике подходами и условиями оценки и интерпретации результатов исследований, изложенными в инструкциях по применению соответствующих наборов реагентов для вышеперечисленных диагностических методов, в настоящем исследовании были использованы следующие единицы учета содержания трепонемоспецифических антител в сыворотке крови:

- качественная оценка по дихотомической шкале (для **ИФА**, **РИФ** и **ИБ**): антитела «обнаружены» или «не обнаружены» (в соответствии с рекомендациями инструкций по применению соответствующих наборов реагентов);

- полуколичественная оценка:

для **ИФА** - по величине коэффициента позитивности (КП), представляющего собой частное от деления спектрофотометрического определения оптической плотности (ОП) окрашивания раствора в реакционной лунке с исследуемым образцом (ОП_i) на значение оптической плотности критической (ОП_{cut off}), которая рассчитывалась отдельно для каждой постановки исследования на основе значения ОП в лунках с отрицательным контролем в наборе (ОП_{к-}) и дополнительного коэффициента, рассчитанного производителями каждого набора с учетом возможного влияния случайных факторов:

$$КП_i = \frac{ОП_i}{ОП_{cut\ off}} \quad (1).$$

Значение КП $\geq 1,0$ интерпретировали как положительный результат, свидетельствующий о наличии антител в исследуемом образце; значение КП $< 1,0$ интерпретировали как отрицательный результат исследования, свидетельствующий об отсутствии антител в исследованном образце крови;

для **РИФ** – по интенсивности индуцированного ультрафиолетом све-

чения фиксированных на предметных стеклах клеток *T. pallidum*, учитываемого в условных единицах «плюсах»: свечение от «+» до «++++» - положительные результаты и отсутствию свечения «-» - отрицательные результаты;

для **ИБ** – по интенсивности окрашивания участков стрипов в местах сорбции соответствующего антигена *T. pallidum*: окраска от «±» до «++++» - положительные результаты, а «слабее ±» и отсутствие появления цвета «-» - отрицательные результаты.

Указанные единицы учета использовали для полуколичественной характеристики содержания антител к антигенам *T. pallidum* в исследуемых образцах.

В исследовании были использованы диагностические наборы реагентов для выявления специфических антител к *T. pallidum* при диагностике сифилитической инфекции, промышленного производства методами ИФА, РИФ и иммуноблоттинга, как разрешенные к применению в качестве медицинских изделий в учреждениях практического здравоохранения Российской Федерации при оказании медицинской помощи населению, так и на момент начала проведения настоящего исследования уже проходившие процедуру официальной регистрации в Министерстве здравоохранения Российской Федерации (таблица 1; Приложение 3-10).

Таблица 1.

Перечень медицинских изделий (наборов реагентов для иммунологических исследований), использованные при выполнении исследования

№ п/п	Метод исследования	Наименование диагностикумов или наборов реагентов	Спецификация производственного выпуска, № регистрационного удостоверения и наименование фирмы-производителя
1.	ИФА	«РекомбиБест антипаллидум - суммарные антитела» (набор реагентов для иммуноферментного выявления суммарных антител к <i>Treponema pallidum</i>), кат. № D-1854, D-1855 и D-1856	по ТУ 9398-069-23548172-2007, РУ № ФСР 2007/00614 от 17.08.2007; ЗАО «Вектор-Бест» (пос. Кольцово, Новосибирская обл., Россия)

2.	ИФА	«ИФА-АНТИ-ЛЮИС-М» (тест-система иммуноферментная для выявления антител класса М к возбудителю сифилиса), кат. № L-154 и № L-155	по ТУ 9398-201-0591003-2008; РУ № ФСР 2009/04818 от 06.05.2009; по ТУ 9398-201-05941003-2012; РУ № РЗН 2013/126 от 26.02.2013 г. ООО «НПО «Диагностические системы» (г. Н.Новгород, Россия)
3.	РИФ abc/200 IgG	«ЛюмиБест антипаллидум» (набор реагентов для выявления антител к <i>Treponema pallidum</i> методом иммунофлюоресценции), кат. № D-1812	по ТУ 9398-089-23548172-2007; РУ № ФСР 2007/13695 от 30.07.2012 г.; ЗАО «Вектор-Бест» (пос. Кольцово, Новосибирская обл., Россия)
4.	РИФ _{abc} -IgM	«Антипаллидум-Флюороген-IgM» (диагностикум для выявления антител класса М к <i>Treponema pallidum</i> в реакции иммунофлюоресценции), кат. № 03.04.02	по ТУ 9388-128-70423725-2011; РУ - № РЗН 2013/247 от 28.02.2013 г.; ЗАО «ЭКОлаб» (г. Электрогорск, Московская обл., Россия)
5.	Им- муно- блот- тинг IgG	«Лайн-Блот СИФИЛИС» (тест-система для выявления антител к отдельным антигенам возбудителя сифилиса методом иммунного блоттинга с использованием рекомбинантных антигенов); кат. № 03.22.1	по ТУ 9398-118-70423725-2009; РУ № ФСР 2010/06925 от 01.03.2010; ЗАО «ЭКОлаб» (г. Электрогорск, Московская обл., Россия)
6.	Им- муно- блот- тинг	«recomBlot Treponema IgM»	фирма «Mikrogen® GmbH» (Германия); дистрибьютер в России ЗАО «БиоХимМак» РУ №ФС 2006/2221 от 26.12.2006 г.
7.	Им- муно- блот- тинг IgG / IgM	«Лайн-Блот Сифилис» (тест-система для выявления антител к отдельным антигенам возбудителя сифилиса методом иммунного блоттинга с использованием рекомбинантных антигенов): <u>комплект № 1</u> : «Лайн-Блот-Сифилис-IgG» для выявления антител класса G к <i>T. pallidum</i> кат. № 03.22.2 и <u>комплект № 2</u> : «Лайн-Блот-Сифилис-IgM» для выявления антител класса М к <i>T. pallidum</i>) кат. № 03.22.3	по ТУ 9398-118-70423725-2012; № РЗН 2014/1657 от 05.06.2014 г.; ЗАО «ЭКОлаб» (г. Электрогорск, Московская обл., Россия)

8.	Контрольные сыворотки	«ЭП СИФИЛИС» (экспертная панель контрольных сывороток для серодиагностики сифилиса)	по ТУ 9398-001-01897647-2007; РУ № ФСР-2007/00695 от 18.09.2007; ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России (г. Москва, Россия)
----	-----------------------	---	---

При осуществлении клинических диагностических исследований с изучаемыми образцами сыворотки крови опытной и контрольной групп было использовано необходимое испытательное и измерительное оборудование, сертифицированное для применения в Российской Федерации; оно указано в таблице 2.

Таблица 2.

Список лабораторного и измерительного оборудования, применявшегося при проведении исследований с образцами клинического материала в составе опытной и контрольной групп

№ п/п	Наименование модели аппарата	Модель, фирма-производитель, страна
1.	Автоматический промыватель иммунологических планшетов (ИФА)	Модель «MiniLab® Washer» PW 40; фирма «BIO-RAD» (Франция)
2.	Автоматический спектрофотометр для учета результатов исследования в ИФА	Модель «Microplate reader PR 2100»; фирма «BIO-RAD» (Франция)
3.	Бытовые холодильники для хранения образцов биологического материала	Марка «Стинол-205» (Россия)
4.	Автоматический спектрофотометр для учета результатов исследования в ИФА	Модель «Multiscan Ascent SN354-90958»; фирма «Thermo Electron Corporation» (Финляндия-Китай)
5.	Бытовые холодильники для хранения наборов реагентов	Модель «INTER-800» (Белоруссия)
6.	Микроскоп лабораторный флуоресцентный	Модель Leica DM LS2 фирма «Leica Microsystems Wetzler GmbH» (Германия)
7.	Набор механических пипеточных дозаторов переменного объема от 5 до 5000 мкл	Модель «Колор»; фирма «Ленпипет» (г. С-Петербург, Россия)
8.	Термостат электрический суховоздушный	ТС-1/80 СПУ. Модель ПГИЖ:681 945.001 (Россия)

9.	Мульти центрифуги лабораторные	Модели СМ-6М и СМ-6.03; фирма «ELMI» (Латвия)
10.	Шейкер	Модели Shaker ST3 и S3.01; фирма «ELMI» (Латвия)
11.	Морозильники - кюльвенаторы	Модель MDF-U32V; фирма «Sanyo»
12.	Принтер для ИФА ридера	Модель Epson LX -1170/ LX-300+
13.	Установка для получения деионизированной воды	Модель Direct Q-5; фирма «Millipore» (США)

2.3.3 Оценка показателей клинической информативности методов диагностических исследований

На основании с требований, изложенных в действующих редакциях нормативных документов Российской Федерации, касающихся проведения клинических лабораторных исследований для диагностики инфекционных заболеваний и применения соответствующих наборов реагентов:

- Национальный стандарт **ГОСТ Р 51352-99** «Наборы реагентов для клинической лабораторной диагностики. Методы испытаний»;

- Национальный стандарт **ГОСТ Р 53022.3-2008** «Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов»;

- Национальный стандарт **ГОСТ Р 53434-2009**. «Принципы надлежащей лабораторной практики»;

- Приказ МЗСР РФ №708н от 23.08.2010 «Об утверждении Правил лабораторной практики»

была осуществлена оценка показателей, характеризующих клиническую информативность изучавшихся иммуносерологических тестов и соответствующих новых наборов реагентов для них.

Расчёт показателей диагностической информативности осуществлен по установленным в ГОСТ Р 53022.3-2008 формулам:

- клиническая чувствительность (КЧ):

$$\text{КЧ} = \frac{\text{ИП}}{\text{общее число образцов от больных сифилисом}} \times 100 \quad (2),$$

где **ИП** - «истинно положительные» результаты, полученные с образцами крови от больных сифилисом;

- клиническая специфичность (КС):

$$\text{КС} = \frac{\text{ИО}}{\text{общее число образцов от лиц без сифилитической инфекции}} \times 100 \quad (3),$$

где **ИО** - «истинно отрицательные» результаты, полученные с образцами крови лиц, без указаний на наличие сифилитической инфекции;

- диагностическая эффективность (ДЭ):

$$\text{ДЭ} = \frac{\text{ИП} + \text{ИО}}{\text{общее число образцов от больных сифилисом и лиц без сифилиса}} \times 100 \quad (4);$$

- предсказательная ценность положительных (ПЦ+) результатов:

$$\text{ПЦ}^+ = \frac{\text{ИП}}{\text{общее количество положительных результатов, полученных в группе больных сифилисом и лиц без сифилиса}} \times 100 \quad (5);$$

- предсказательная ценность отрицательных (ПЦ-) результатов:

$$\text{ПЦ}^- = \frac{\text{ИО}}{\text{общее количество отрицательных результатов, полученных в группе больных сифилисом и лиц без сифилиса}} \times 100 \quad (6).$$

2.3.4. Статистическая обработка результатов исследований

Для сопоставления результатов клинических лабораторных исследований осуществляли статистическую обработку полученных данных (ГОСТ Р 50779.10-2000; Сергиенко В.И., Бондарева И.Б., 2001) с помощью соответствующих приложений программы Microsoft Office Excel 2007 на персональном компьютере Pentium IV.

Исчисление величины средней ошибки среднего арифметического значения (m) проводилось по формуле Петерса с использованием табличных значений фактора Молденгауэра или константы k (Монцевичуте-Эрингене Е.В., 1964):

$$m = \pm \frac{\sum a}{n} \quad (7),$$

где m – средняя ошибка среднего арифметического,

$\sum a$ – сумма отклонений отдельных вариантов от среднего арифметического.

Оценку статистической достоверности различий, наблюдавшихся при сопоставлении данных, был применен метод непрямых разностей, для чего исчисляли разность между сопоставляемыми данными в формате средних арифметических величин: $(M_1 - M_2)$ и их среднеквадратических отклонений:

$$\left(\pm \frac{\sum a}{n} \right).$$

Коэффициент достоверности (t) различий устанавливали по формуле:

$$\frac{M_1 - M_2}{\frac{\sum a}{n}} \quad (8).$$

Значение показателя вероятности (p), свидетельствующее о статистической достоверности разницы показателей, наблюдавшихся в сопоставляемых группах измерений, получали из данных авторских таблиц, рассчитанных с учетом показателя коэффициента достоверности - t и значения степени свободы - L (по формуле):

$$L = (n_1 - 1) + (n_2 - 1) \quad (9),$$

где n_1 и n_2 – число наблюдений в сопоставляемых вариационных рядах.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ГЛАВА 3. ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТРЕПОНЕМОСПЕЦИФИЧЕСКИХ IgM ПРИ ДИАГНОСТИКЕ СИФИЛИСА В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

В Российской Федерации оказание специализированной медицинской помощи больным сифилисом (диагностика, лечение и последующее клинико-серологическое наблюдение) осуществляется в специализированных медицинских организациях дерматовенерологического профиля в соответствии с со стандартами оказания медицинской помощи населению (Приказ Минздрава РФ №327 от 25.07.2003; Приказ МЗСР № 829 от 08.12.2006; Приказ МЗСР № 830 от 08.12.2006; Приказ МЗСР № 860 от 18.12.2006; Приказ МЗСР № 43 от 17.01.2007). Лабораторное подтверждение клинического диагноза включает скрининг трепонемоспецифических антител такими методами как ИФА или РПГА (Приказ Минздрава России №87 от 26.03.2001, Кубанова А.А., 2012 б, 2013).

Медицинской технологией, позволяющей осуществлять раннее выявление сифилитической инфекции на начальных этапах после заражения, является дифференцированное определение специфических антител класса М в ИФА (Кубанова А.А., 2012 а). Применение для этой цели других лабораторных методик, таких как РИФ и ИБ, ограничивается отсутствием в Российской Федерации производственного выпуска соответствующих наборов реагентов отечественного производства. Для исследовательских целей в ряде случаев медицинские лаборатории применяют наборы реагентов зарубежного производства, как прошедшие регистрацию и одобренные органами здравоохранения к применению в медицинских организациях Российской Федерации, так и не имеющие подобного разрешения.

Нами была проведена работа по оценке использования технологий дифференцированного определения трепонемоспецифических антител класса М в специализированных медицинских организациях по профилю дерма-

товенерология субъектов Российской Федерации. На подготовительном этапе была разработана анкета, включавшая комплекс вопросов, касавшихся использования дифференцированного определения антител класса М к антигенам возбудителя сифилиса при обследовании пациентов с различными клиническими формами этого заболевания, лабораторного метода исследования, который при этом применялся, а также общего количества исследований, которое проводилось каждым методом в течение календарного года (в 2012 году). В соответствии со спецификой опроса все вопросы анкеты были разделены на два раздела: один – для врачей клинической лабораторной диагностики, применявших диагностические лабораторные технологии, другой – для врачей дерматовенерологов, осуществлявших приём соответствующих контингентов населения, назначавших необходимое обследование и использовавших результаты соответствующих клинических лабораторных исследований для постановки клинического диагноза (Приложение 1).

Указанные разработанные анкеты с необходимыми сопроводительными письмами в 2013 году были направлены руководителям 83 учреждений здравоохранения субъектов Российской Федерации, которые на период проведения исследования осуществляли оказание специализированной медицинской помощи населению по профилю «дерматовенерология» (Конституция Российской Федерации, 2009).

Ответы на вопросы анкет были получены всего из 60 (72,3%) медицинских организаций, представлявших все 8 федеральных округов Российской Федерации (таблица 3).

Представленные в таблице 3 данные, свидетельствуют, что из 7 федеральных округов ответы на вопросы анкеты были представлены от 54,5 до 85,7% медицинских организаций, что позволило нам считать результаты, полученные в ходе данного опроса, репрезентативными как для этих федеральных округов, так и Российской Федерации в целом.

Количество медицинских организаций Федеральных округов Российской Федерации, принявших участие в анкетном опросе в 2013 году

№ п/п	Федеральные округа Российской Федерации	Количество субъектов в соответствии с Конституцией России	Количество медицинских организаций субъектов РФ, предоставивших данные для исследования	
			абс.	в %
1	Центральный	18	15	83,3
2	Северо-западный	11	6	54,5
3	Южный	6	2	33,3
4	Северокавказский	7	6	85,7
5	Приволжский	14	11	78,6
6	Уральский	6	4	66,7
7	Сибирский	12	9	75,0
8	Дальневосточный	9	7	77,8
9	Всего по РФ	83	60	72,3

Аналитическое изучение предоставленных данных позволило установить общее количество иммунохимических (серологических) исследований для диагностики сифилиса, проведенных в лабораториях указанных медицинских организаций в течение 2012 года, а также количество и долю исследований, выполненных каждым лабораторным методом отдельно (таблица 4).

Полученные данные показали, что среди трепонемоспецифических тестов при диагностике сифилиса в серологических лабораториях специализированных медицинских организаций дерматовенерологического профиля наиболее часто исследования проводили в ИФА – в 23,08% и РСК_{треп} – в 10,70% случаев; несколько реже - в РПГА – в 6,75% и РИФ – в 1,36% случаев. Использование технологии определения антител к *T. pallidum* мето-

дом иммуноблоттинга не превышало 0,03% случаев.

Таблица 4.

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

№ п/п	Виды иммуносерологических лабораторных исследований	Количество исследований	
		абс.	в %
1	Реакция микропреципитации	5 617 399	43,57
2	Быстрый плазмареазиновый тест	454 902	3,53
3	Реакция связывания комплемента – кард.	1 397 290	10,84
4	Реакция связывания комплемента – треп.	1 379 151	10,70
5	Иммуноферментный анализ	2 976 273	23,08
6	Реакция пассивной гемагглютинации	869 706	6,75
7	Реакция иммунофлюоресценции	174 936	1,36
8	Иммуноблоттинг	3 663	0,03
9	Иммунохемилюминесценция	11 276	0,09
10	Реакция иммобилизации трепонем	9 394	0,07
11	Всего по РФ	12 893 990	100,00

При этом исследований, основанных на выявлении трепонемоспецифических IgM, предназначенных в основном для ранней диагностики сифилиса, было проведено 167 451 единиц, что составило 1,30% - очень небольшую часть от общего количества лабораторных диагностических тестов.

Сопоставление первично представленных лабораториями данных об абсолютном количестве исследований для диагностики сифилиса, выполненных в 2012 году, позволило установить, что в серологических лабораториях дерматовенерологических организаций субъектов Российской Федерации путём определения трепонемоспецифических антител класса М priori-

тет имели исследования в ИФА_{IgM} (162 879 анализов; 97,27%), в то время как абсолютное количество определений другими методами было существенно меньше: в РИФ-IgM – 3 355 (2,00%) и ИБ-IgM - 1 217 (0,73%) анализов (рисунок 1).

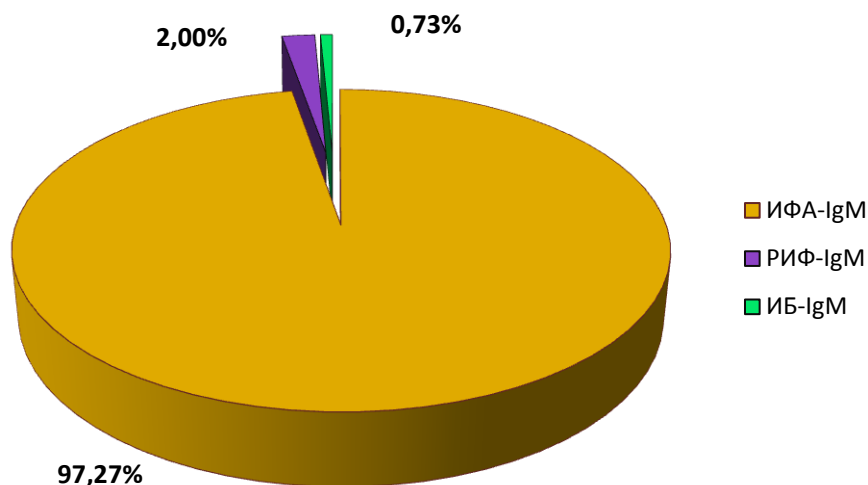


Рисунок 1. Соотношение количества определений антител класса М к *T. pallidum* разными серологическими методами в лабораториях дерматовенерологических организаций в 2012 году.

Предоставленные лабораториями данные о количестве проведенных в 2012 году исследований для диагностики сифилиса были также изучены путём расчета относительных показателей:

- из 2 976 273 (100%) исследований, выполненных методом ИФА, количество определений специфических к *T. pallidum* антител всех классов суммарно (G+M+A) составило 2 585 723 (86,88%), а дифференцированно антител только класса G – 227 671 (7,65%) и только класса М – 162 879 (5,47%);

- методом РИФ было проведено 174 936 (100%) исследований, в том числе РИФ_{IgG} (РИФ_{абс} и РИФ₂₀₀) – 171 581 (98,08%) и РИФ_{IgM} – 3 355 (1,92%).

- в иммунном блоттинге всего проведено 3 663 (100%) определений трепонемоспецифических антител, в том числе с выявлением Ig G – 2 446 (66,78%) и Ig M – 1 217 (33,22%) (рисунок 2).

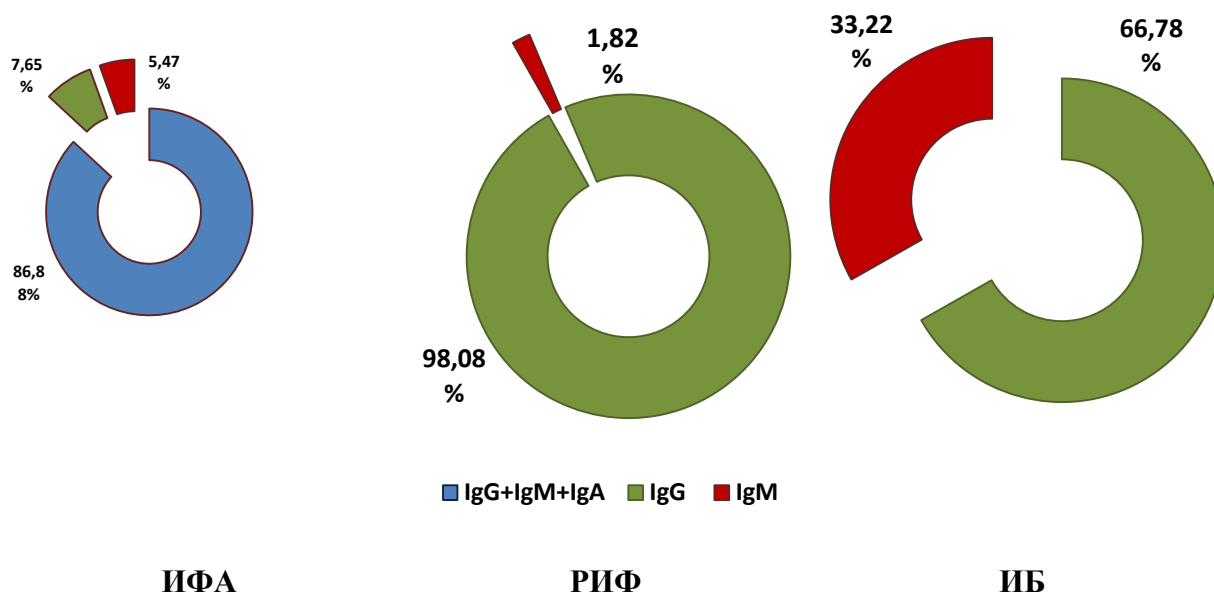


Рисунок 2. Соотношение количества определений антител разных классов к *T. pallidum* разными серологическими методами в лабораториях дерматовенерологических учреждений в 2012 году.

Анализ относительных показателей результатов анкетирования позволил установить, что определение антител класса М к *T. pallidum* методами ИФА и РИФ по сравнению с традиционными для этих методов выявлением специфических антител класса G или суммарно (IgG+IgM+IgA) не играло определяющей роли в диагностике клинических форм сифилиса (5,47 и 1,82% соответственно). Но при оценке интенсивности использования IgM-модификации метода иммуноблоттинга было выявлено, что частота его применения составила почти треть (33,22%) всех исследований осуществленных этим методом.

Значимость полученных в исследовании относительных показателей необходимо оценивать также с учетом показаний для постановки лабораторного обследования каждым из изучавшихся методов. Дело в том, что определение в ИФА антител разных классов к *T. pallidum* суммарно проводят как при первичном скрининге населения с целью выявления больных сифилисом (при этом обследованию подвергается значительные контингенты лиц, свободных от этой инфекции), а так же для верификации положитель-

ных результатов, полученных в других скрининговых тестах (таких как РПГА или тесты с кардиолипидным антигеном). Дифференцированное же определение в ИФА антител класса G или M в крови назначают с целью дифференциальной диагностики и уточнения клинической формы сифилиса или для оценки активности течения инфекционного процесса. В то время как исследования в РИФ и ИБ по определению являются диагностическими или дифференциально-диагностическими, показанными для назначения с целью уточнения и верификации положительных результатов, установленных при первичном скрининге с применением трепонемоспецифических тестов, а также в случаях получения дискордантных результатов в разных диагностических трепонемных тестах (например: в ИФА и в РПГА).

В процессе обработки ответов на вопросы анкет, нами было осуществлено изучение количества лабораторий, регулярно применявших соответствующие методы исследования для диагностики сифилиса.

Было установлено, что постановки ИФА для диагностики сифилиса систематически осуществляли в лабораториях всех 60 (100%) медицинских организаций, предоставивших данные о своей деятельности в 2012 году, в том числе: путём определения суммарного содержания антител класса M, G и A – 52 (86,67%), определения только антител класса G – 47 (78,33%) и класса M – 52 (86,67%) лабораторий.

Исследования в реакции непрямой иммунофлюоресценции (РИФ) при диагностике сифилиса проводились в 45 (75,00%) лабораториях изучавшихся специализированных медицинских организаций: с применением модификации РИФ_{abc} – в 44 (73,33%), модификации РИФ₂₀₀ – в 30 (50,00%), технологии РИФ-IgM – только в 4 (6,67%) лабораториях.

Дифференцированное определение антител к отдельным белкам возбудителя сифилиса в ИБ выполняли лаборатории 17 (28,33%) специализированных медицинских организаций дерматовенерологического профиля: с идентификацией IgG – в 17 (28,33%), IgM – в 11 (18,33%) случаях.

Анализ данных анкетного опроса по применению указанных методов в

разрезе федеральных округов Российской Федерации (таблицы 5-6) также показал, что наибольшее количество исследований для выявления IgM к антигенам *T. pallidum* во всех медицинских лабораториях проведено в 2012 году с использованием методики ИФА_{IgM}. Доля исследований в модификации ИФА_{IgM} среди всего объема исследований методом ИФА при обследовании на сифилис существенно различалась по разным округам: от 1,96% - в лабораториях медицинских организаций в ЮФО, до 13,06% - в соответствующих лабораториях в СКФО; в других федеральных округах показатели варьировали от 3,13 и 3,72% (в СЗФО и ЦФО соответственно), до 5,96 и 6,47% (в ПрФО и ДВФО соответственно) и до 7,65 и 7,99% (в УФО и СФО соответственно).

Исследование в РИФ-IgM при диагностике сифилиса не проводили в лабораториях в ЮФО, СКФО, УФО, СФО, и ДВФО; минимальную долю - 0,78% эта модификация занимала в общем объеме исследований методом РИФ в соответствующих лабораториях медицинских организаций в ЦФО и более существенную часть - 4,95 и 7,22% - в лабораториях в СЗФО и ПрФО соответственно.

Методику определения антител класса М в иммуноблоттинге при диагностике сифилиса не применяли в специализированных медицинских дерматовенерологических организациях в СЗФО и СКФО, небольшую долю от общего объема исследований в иммуноблоттинге - 1,29 и 8,84% - составляли исследования в ИБ-IgM в УФО и в ЦФО соответственно; несколько больше - 12,22; 15,55 и 19,11% - в СФО, ДВФО и ПрФО соответственно; максимальное соотношение - 50% - в лабораториях ЮФО. При этом необходимо обратить также внимание и на количество проведенных исследований в абсолютных значениях: по этому параметру лидером использования метода ИБ-IgM являлись медицинские организации ПрФО (1009 исследований).

Таблица 5.

Данные о количестве иммунохимических исследований, выполненных в лабораториях медицинских организаций дерматовенерологического профиля субъектов Российской Федерации в 2012 году

Федеральные округа России и число субъектов в исследовании (абс. и %)	Количество иммунохимических исследований для диагностики сифилиса, выполненных в лабораториях медицинских организаций субъектов соответствующего округа РФ						
	Всеми методами (РМП, РСК, ИФА, РПГА, РИФ, РИБТ, ИБ)	Методом ИФА всего		Методом РИФ всего		Методом ИБ всего	
		абс	в %	абс.	в %	абс	в %
ЦФО n = 15 (83,3%)	3 275 025	791 232	24,16	70 282	2,15	181	0,006
СЗФО n = 6 (54,5%)	919 953	233 534	25,39	8 884	0,97	3 554	0,37
ЮФО n = 2 (33,3%)	566 369	176 477	31,16	7 581	1,34	24	0,004
СКФО n = 6 (85,7%)	2 140 628	37 268	1,74	3 184	0,15	21	0,001
ПрФО n = 11 (78,6%)	3 128 028	790 744	25,28	32 914	1,05	5 280	0,17
УФО n = 4 (66,7%)	272 138	85 725	31,50	9 211	3,38	5 425	1,99
СФО n = 6 (75,0%)	1 430 612	548 203	38,32	28 751	2,01	483	0,03
ДВФО n = 7 (77,8%)	1 161 237	313 060	26,96	14 129	1,22	328	0,03
Всего по России n = 60 (72,3%)	12 893 990	2 976 273	23,08	174 936	1,36	3 663	0,03

Таблица 6.

Данные о количестве исследований в ИФА_{IgM}, РИФ-IgM и ИБ-IgM, выполненных в лабораториях медицинских организаций дерматовенерологического профиля субъектов Российской Федерации в 2012 году

Федеральные округа Российской Федерации	Количество иммунохимических исследований для диагностики сифилиса, выполненных в лабораториях медицинских организаций субъектов соответствующего округа РФ					
	Методом ИФА		Методом РИФ		Методом ИБ	
	всего	в ИФА _{IgM} (абс и % от всего в ИФА)	всего	в РИФ-IgM (абс и % от всего в РИФ)	всего	ИБ-IgM (абс и % от всего в ИБ)
ЦФО	791 232	29 464 / 3,72%	70 282	540 / 0,78%	181	16 / 8,84%
СЗФО	233 534	7 309 / 3,13%	8 884	440 / 4,95%	3 554	0 / 0%
ЮФО	176 477	3 465 / 1,96%	7 581	0 / 0%	24	12 / 50,0%
СКФО	37 268	4 869 / 13,06%	3 184	0 / 0%	21	0 / 0%
ПрФО	790 744	47 142 / 5,96%	32 914	2 375 / 7,22%	5 280	1 009 / 19,11%
УФО	85 725	6 561 / 7,65%	9 211	0 / 0%	5 425	70 / 1,29%
СФО	548 203	43 809 / 7,99%	28 751	0 / 0%	483	59 / 12,22%
ДВФО	313 060	20 260 / 6,47%	14 129	0 / 0%	328	51 / 15,55%
Всего по России	2 976 273	162 879 / 5,47	174 936	3 355 / 1,92%	3 663	1 217 / 33,22%

Для оценки потенциала возможного использования современных иммунохимических исследований с определением специфических IgM для диагностики сифилиса мы использовали данные официальной государственной статистической отчетности Минздрава России о заболеваемости населения России сифилисом в 2012 году (Ресурсы и деятельность медицинских организаций дерматовенерологического профиля. Заболеваемость инфекциями, передаваемыми половым путем, заразными кожными болезнями и болезнями кожи за 2011-2012 годы: Статистические материалы, 2013).

Так, по данным Минздрава России в Российской Федерации в 2012 году было зарегистрировано 39 200 новых случаев заболевания ранним сифилисом (сифилис первичный, вторичный, скрытый ранний и врожденный ранний), а в 60 субъектах Российской Федерации, которые принимали участие в нашем анкетном опросе, это число составило 24 401 случая (Приложение 2).

На основании этих данных и сведений, полученных при анкетном опросе, нами были сделаны расчеты удельного количества иммунохимических исследований с определением специфических IgM, которые потребовалось провести в лабораториях в расчете на диагностику одного клинического случая заболевания ранним сифилисом. Для диагностики всех зарегистрированных случаев раннего сифилиса в 60 медицинских организациях дерматовенерологического профиля по данным анкетирования было проведено всего 167 451 исследований, в том числе: в ИФА_{IgM} - 162 879, в РИФ_{IgM} - 3 355 и методом ИБ-IgM - 1 217 тестов. Расчеты показали, что на один зарегистрированный случай раннего сифилиса при лабораторном обследовании населения было проведено порядка 6,86 единиц иммунохимических тестов с определением IgM, в том числе: в ИФА_{IgM} - 6,68 исследований и только 0,14 исследований в РИФ_{IgM} и 0,05 - в ИБ-IgM.

Столь ярко выраженная диспропорция в клиническом применении разных лабораторных методов определения трепонемоспецифических IgM при ранней диагностике начальных форм сифилиса, на наш взгляд, обуслов-

лена рядом причин:

- модификация ИФА_{IgM} постепенно внедрялась в практику здравоохранения, начиная с 2000-2003 годов, за этот период времени в медицинских организациях накоплен определенный опыт её применения, вследствие чего в настоящее время она является наиболее распространенной для определения специфических IgM к антигенам *T. pallidum*, при этом отечественными производителями медицинских изделий выпускается довольно широкий ассортимент диагностических наборов реагентов для ИФА_{IgM} при диагностике сифилиса;

- РИФ_{IgM} - методика, редко применяемая в практическом здравоохранении в Российской Федерации, так как для её воспроизводства до последнего времени отсутствовал промышленный выпуск отечественных диагностических наборов реагентов, а иностранные наборы не были зарегистрированы в Росздравнадзоре и не имели разрешения на применение в медицинских организациях Российской Федерации;

- ИБ-IgM - является технологией, разрешенной к применению в Российской Федерации, но стоимость диагностических наборов реагентов зарубежного производства достаточно высокая, что существенно ограничивало частоту применения этого метода для диагностики сифилиса.

Нами также проведена оценка количества исследований, выполненных в лабораториях дерматовенерологических организаций субъектов Российской Федерации по соответствующим Федеральным округам в 2012 году (таблица 7) в пересчёте на 1 вновь установленный клинический случай ранней формы сифилиса; при этом также наблюдали широкую вариацию полученных показателей (рисунок 3).

Средние показатели по России количества проведенных лабораторных тестов с выявлением IgM к антигенам бледной трепонемы всеми методами, а также в ИФА_{IgM}, РИФ-IgM и ИБ-IgM в 2012 году в расчёте на один диагностированный случай раннего сифилиса составили: 6,86; 6,68; 0,14 и 0,05 соответственно.

Таблица 7.

Данные о количестве иммунохимических исследований в ИФА_{IgM}, РИФ-IgM и ИБ-IgM, выполненных в лабораториях медицинских организаций дерматовенерологического профиля субъектов Российской Федерации в 2012 году, в расчете на 1 выявленный клинический случай раннего сифилиса

Федеральные округа России	Всего выявлено случаев ранних клинических форм сифилиса в 2012 году	Количество иммунохимических исследований для диагностики сифилиса, выполненных в лабораториях медицинских организаций субъектов соответствующего округа РФ							
		Всеми методами (ИФА _{IgM} , РИФ-IgM, ИБ-IgM)		Методом ИФА _{IgM}		Методом РИФ IgM		Методом ИБ-IgM	
		всего	в расчете на 1 случай раннего сифилиса	всего	в расчете на 1 случай раннего сифилиса	всего	в расчете на 1 случай раннего сифилиса	всего	в расчете на 1 случай раннего сифилиса
ЦФО	3 796	30 020	7,91	29 464	7,76	540	0,14	16	0,004
СЗФО	1 130	7 749	6,86	7 309	6,47	440	0,39	0	0
ЮФО	829	3 477	4,19	3 465	4,18	0	0	12	0,01
СКФО	922	4 869	5,28	4 869	5,28	0	0	0	0
ПрФО	6 392	50 526	7,90	47 142	7,38	2 375	0,37	1 009	0,16
УФО	1 574	6 631	4,21	6 561	4,17	0	0	70	0,05
СФО	6 705	43 868	6,54	43 809	6,53	0	0	59	0,01
ДВФО	3 043	20 311	6,67	20 260	6,66	0	0	51	0,02
Всего по РФ	24 401	167 451	6,86	162 879	6,68	3 355	0,14	1 217	0,05

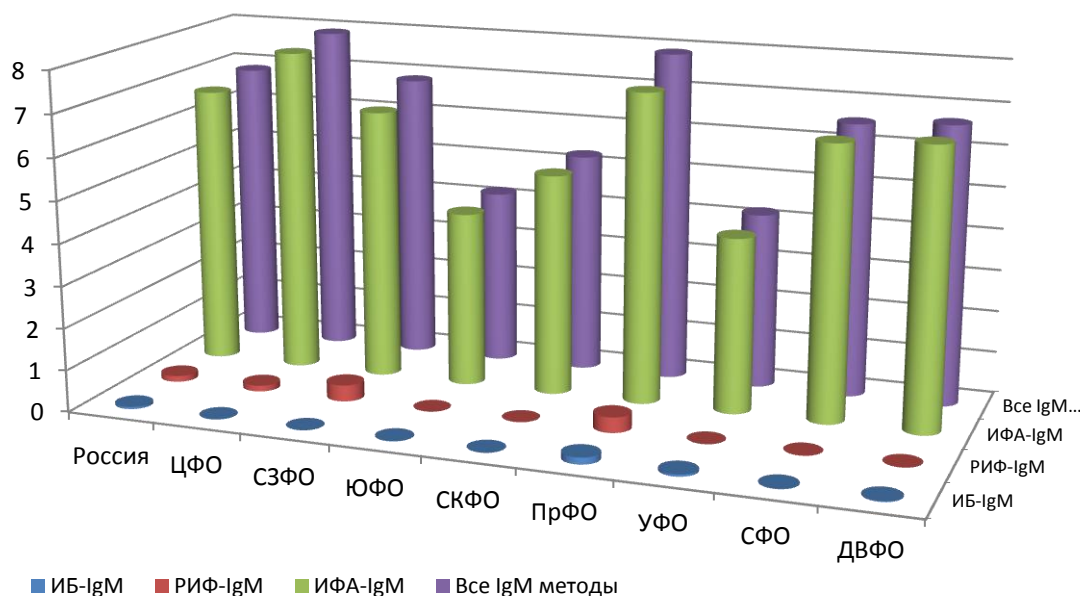


Рисунок 3. Соотношение количества иммунохимических тестов с определением антител класса М к *T. pallidum*, выполненных в разных федеральных округах России в 2012 году в расчёте на 1 выявленный случай раннего сифилиса.

Показатели, превышавшие средние данные по России, наблюдали в ЦФО (7,91; 7,76; 0,14 и 0,004 соответственно) и в ПрФО (7,90; 7,38; 0,37 и 0,16 соответственно). В остальных федеральных округах удельные показатели частоты применения современных методик определения специфических IgM для диагностики ранних клинических форм сифилиса были равны или ниже, чем в среднем по России: в СЗФО (6,68; 6,47; 0,39 и 0 соответственно), в ДВФО (6,67; 6,66; 0 и 0,02 соответственно), в СФО (6,54; 6,53; 0 и 0,01 соответственно), в СКФО (5,41; 5,10; 0,31 и 0 соответственно), в ЮФО (4,19; 4,18; 0 и 0,01 соответственно) и в УФО (4,21; 4,17; 0 и 0,05 соответственно).

Постепенное внедрение в практическое здравоохранение отечественных наборов реагентов для современных методик определения специфических IgM при диагностике сифилиса позволит нивелировать существующие различия в частоте применения всех 3 видов диагностических исследований. По нашим представлениям количество исследований в модификации РИФ-IgM в специализированных дерматовенерологических организациях при диагно-

стике сифилиса будет постепенно приближаться к количеству исследований в ИФА_{IgM}, в то время как прирост количества исследований в ИБ-IgM в большей мере будет зависеть от снижения себестоимости затрат на это дорогостоящее исследование.

Таким образом, изучение данных, полученных в ходе анкетного опроса иммуносерологических лабораторий 60 дерматовенерологических организаций субъектов Российской Федерации, позволило установить, что в 2012 году подавляющее большинство лабораторий применяли для диагностики сифилиса современные методики исследования: ИФА – в 100,00% и РИФ – в 75,00%, в то время как ИБ – только в 28,33% лабораторий.

При обследовании населения с целью диагностики сифилиса частота применения вышеперечисленных лабораторных тестов от общего количества проведенных исследований составила: в ИФА – 23,08%, в РИФ – 1,36% и в ИБ - 0,03%. При этом, суммарное применение модификаций всех перечисленных методов исследований, основанных на дифференцированном выявлении только трепонемоспецифических IgM, не превышало всего 1,30% (167 451 единиц) от общего количества проведенных тестов для диагностики сифилиса.

В структуре объема исследований, проведенных каждым методом при обследовании населения на сифилис в 2012 году, доля применения модификаций методов с определением только антител класса М при постановках ИФА и РИФ составила лишь небольшую часть - 5,47% и 1,82% соответственно, в то время как с использованием ИБ-IgM – почти треть (33,22%).

Недостаточное применение технологии определения трепонемоспецифических IgM при верификации положительных результатов скрининговых обследований на сифилис и при уточнении клинического диагноза, по нашему мнению, в значительной степени зависело от отсутствия производственного выпуска отечественных наборов реагентов для выполнения соответствующих видов диагностических исследований, разрешенных к применению в медицинских учреждениях Российской Федерации.

ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ КЛИНИЧЕСКОЙ ИНФОРМАТИВНОСТИ IgM МОДИФИКАЦИИ РЕАКЦИИ НЕПРЯМОЙ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ ПРИ РАЗНЫХ ФОРМАХ СИФИЛИСА.

4.1. Клиническая характеристика групп пациентов

Для обеспечения выполнения задач настоящего исследования был осуществлен подбор репрезентативного числа пациентов в опытную и контрольную группы.

Опытная группа была представлена пациентами, обратившимися за медицинской помощью в Консультативно-диагностический центр ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России. На основе критериев отбора (см. раздел 2.1. Дизайн исследования) в опытную группу были включены 492 больных с установленным клиническим диагнозом «сифилис». Диагноз пациентам был поставлен на основании оценки результатов их клинического и лабораторного обследования, а также изучения анамнестических сведений, связанных с развитием заболевания, и сопоставления данных кон-frontации с половыми партнёрами. В этой группе преобладали пациенты с клиническими формами раннего сифилиса, что было обусловлено особенностями цели и задач данной работы, заключающимися в изучении гуморального иммунного ответа с участием антител класса М у больных начальными формами заболевания (таблица 8).

Таблица 8.

Структура опытной группы пациентов с учетом клинических форм сифилитической инфекции

№ п/п	Шифр диагноза по МКБ-10	Клиническая форма сифилиса	Количество пациентов	
			абс.	%
1	A.51.0-A.51.2	Первичный	79	16,06
2	A.51.3	Вторичный	205	41,67
3	A.51.5	Скрытый ранний	114	23,17

4	A.52.8	Скрытый поздний	32	6,50
5	A.53.0	Скрытый, неуточнённый как ранний или поздний	62	12,60
Всего пациентов в опытной группе			492	100

В структуре пациентов опытной группы больные с манифестными клиническими формами сифилитической инфекции (сифилис первичный и вторичный) составили 57,73%, а всеми ранними формами (включая сифилис скрытый ранний) - 80,90%, в то время как больные другими скрытыми формами с длительностью развития патологии около 2-х лет и более (сифилис скрытый неуточнённый как ранний или поздний и сифилис скрытый поздний) были представлены в 19,10% случаев (рисунок 4).

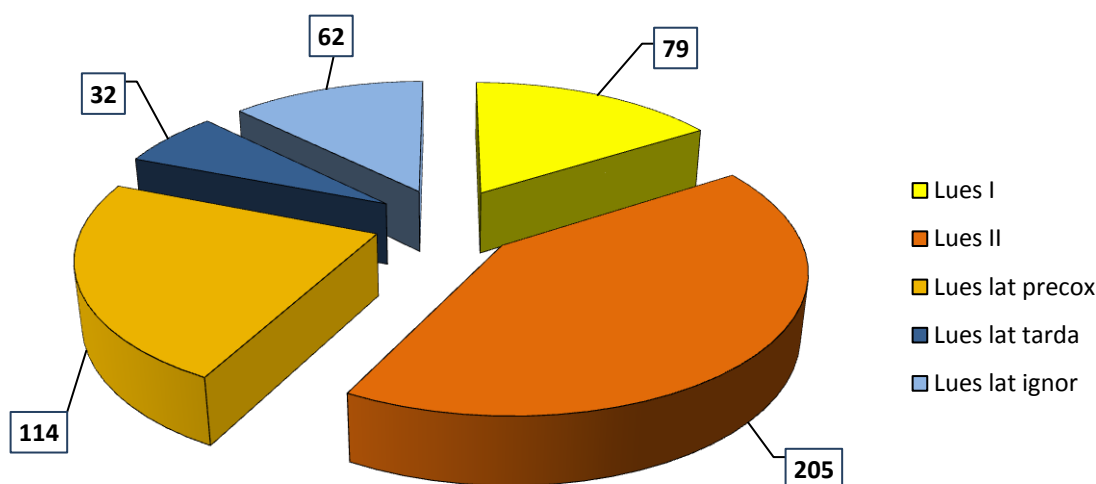


Рисунок 4. **Распределение пациентов опытной группы в зависимости от клинического диагноза.**

Характеристика больных сифилисом опытной группы с учетом их пола и возраста представлена в таблице 9.

Преобладающую долю пациентов опытной группы составили мужчины - 63,21%, в то время как женщины были представлены в 36,79% случаев. Возраст пациентов основной группы варьировал от 20 до 70 лет с выраженным преобладанием, как мужчин, так и женщин в возрастных группах 31-40 лет (по 24,39 и 15,85% соответственно) и 41-50 лет (по 22,15 и 8,74%

соответственно).

Таблица 9.

Распределение пациентов опытной группы по полу и возрасту

Пол \ Возраст	Количество больных в возрасте (количество лет)					Всего
	20-30	31-40	41-50	51-58	61-70	
Мужской	54	120	109	21	7	311 (63,21%)
Женский	28	78	43	19	13	181 (36,79%)
Всего	82	198	152	40	20	492 (100%)

В контрольную группу настоящего исследования были включены 153 человека, в том числе: 123 (80,39%) активных донора крови из отделения клинической трансфузиологии ГКБ № 15 им. О.М. Филатова Департамента здравоохранения г. Москвы (с отрицательными лабораторными результатами исследования в ИФА на сифилис) и 30 (19,61%) пациентов, обращавшихся за медицинской помощью в консультативно-диагностическое отделение ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России по поводу ложноположительных результатов иммунохимического обследования, и которым по результатам комплексного обследования диагноз «сифилис» установлен не был (рисунок 5).

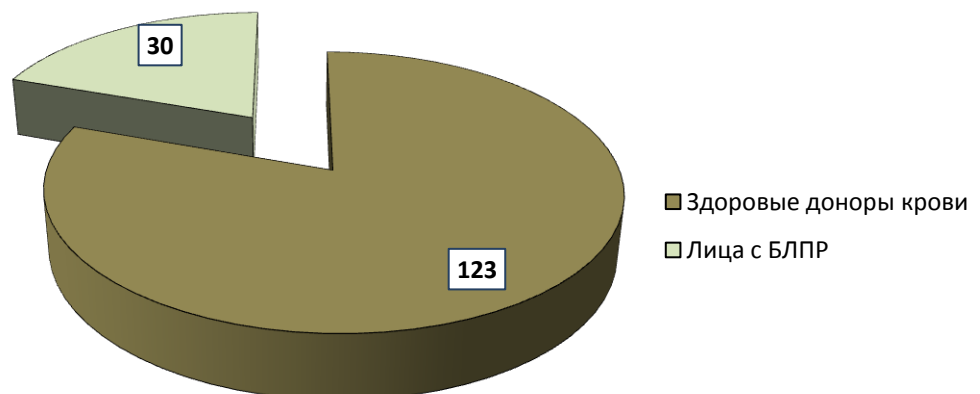


Рисунок 5. Распределение пациентов в составе контрольной группы.

В составе контрольной группы были представлены 51,63% женщин и

48,37% мужчин. Возраст пациентов также варьировал в пределах 20-70 лет с наибольшей частотой в возрастных интервалах 31-40 лет (по 13,07 и 22,88% соответственно) и 41-50 лет (по 11,76 и 21,57% соответственно) (таблица 10).

Таблица 10.

Распределение пациентов контрольной группы по полу и возрасту

Возраст Пол	Количество больных в возрасте (количество лет)					Всего
	20-30	31-40	41-50	51-58	61-70	
Мужской	17	20	18	13	6	74 (48,37%)
Женский	9	35	33	1	1	79 (51,63%)
Всего	26	55	51	14	7	153 (100%)

Сопоставление возрастной и гендерной характеристик пациентов опытной и контрольной групп позволило установить некоторые различия. В опытной группе основную часть составили мужчины – 63,21%, в то время как в контрольной группе - женщины – 51,63%. Однако в обеих отобранных группах преобладали пациенты в возрастных пределах 31-40 и 41-50 лет: в опытной группе (больные сифилисом) - соответственно по 40,24 и 30,89% (198 и 152 из 492), а в контрольной группе (пациенты без сифилиса) – соответственно по 35,95 и 33,33% (55 и 51 из 153 человек) (рисунок 6).

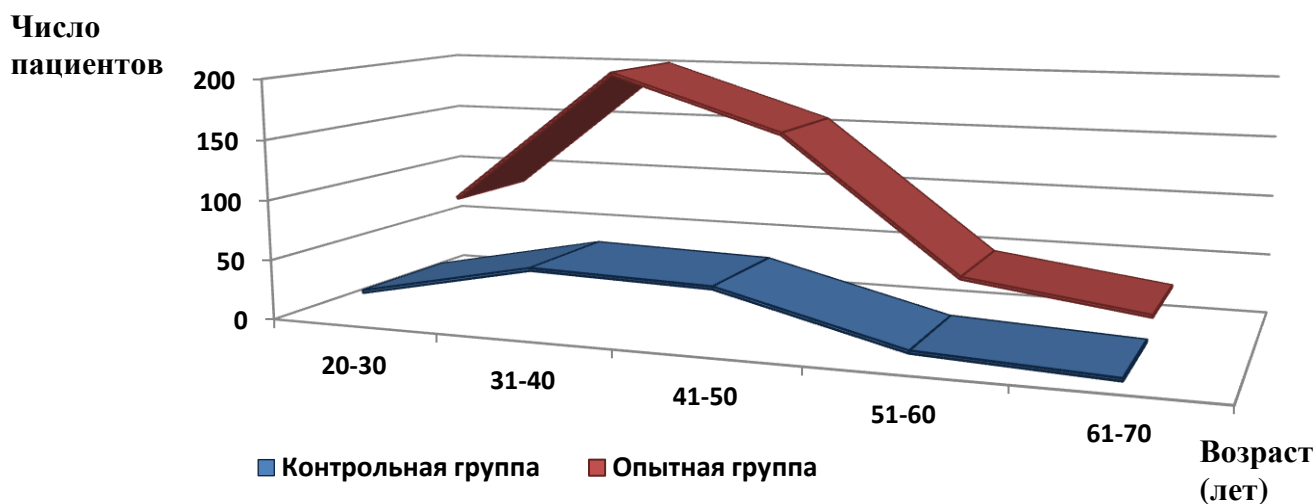


Рисунок 6. Распределение пациентов по возрасту в составе опытной и контрольной групп.

Таким образом, представленные данные позволили всесторонне охарактеризовать опытную и контрольную группы пациентов, от которых были получены образцы биологического материала для последующего проведения диагностических лабораторных (иммунохимических) исследований.

Опытную группу составили больные сифилисом до начала проведения им специфического антибактериального лечения. Контрольная группа была представлена лицами без сифилитической инфекции.

Установленные гендерные и возрастные различия в составе пациентов опытной и контрольной групп, тем не менее, не явились основанием для перестроения или искусственного формирования групп исследования, в связи с тем, что набор пациентов осуществлялся по мере их обращения в медицинские организации.

4.2. Результаты аттестации образцов сыворотки крови опытной и контрольной групп на содержание трепонемоспецифических антител в ИФА_{IgG+IgM+IgA} и РИФ_{abc} (IgG)

На подготовительном этапе исследования все образцы сыворотки крови опытной и контрольной групп были аттестованы в ИФА по содержанию в них специфических антител (в виде суммарного пула: IgG+IgM+IgA) к антигенам *T. pallidum* с наборами реагентов «РекомбиБест антипаллидум-суммарные антитела» (по ТУ 9398-069-05941003-2007; РУ № ФСР 2007/00614 от 17.08.2007; производства ЗАО «ВекторБест», Россия) и в РИФ_{abc} - с наборами реагентов «ЛюмиБест антипаллидум» для выявления антител к *Treponema pallidum* методом иммунофлюоресценции» (по ТУ 9398-339-23548172-2012; РУ № ФСР 2012/13695 от 30.07.2012 производства ЗАО «Вектор-Бест», Россия).

При исследовании 492 образцов сыворотки крови больных сифилисом в ИФА_(IgG+IgM+IgA) положительные результаты были получены в 487 (98,98%) случаях; в том числе: при сифилисе первичном - в 77 (97,47%) из 79 случаев, вторичном - в 205 (100%) из 205, скрытом раннем - в 114 (100%) из 114, скрытом неуточнённом как ранний или поздний - в 60 (96,77%) из 62, сифилисе скрытом позднем - в 31 (96,88%) из 32 случаев.

Показатели полуколичественной оценки в ИФА содержания антител в исследованных образцах - коэффициенты позитивности (КП), рассчитанные для всех положительных результатов, - варьировали в интервале от 1,09 до 25,56 ($M \pm m = 12,15 \pm 0,20$), в том числе: при сифилисе первичном - от 1,45 до 16,89 ($M \pm m = 8,44 \pm 0,38$), сифилисе вторичном - от 1,09 до 25,56 ($M \pm m = 14,10 \pm 0,25$), сифилисе скрытом раннем - от 1,58 до 21,00 ($M \pm m = 12,19 \pm 0,37$), скрытом неуточнённом как ранний или поздний - от 1,73 до 17,78 ($M \pm m = 11,23 \pm 0,50$), скрытом позднем - от 1,56 до 16,11 ($M \pm m = 8,60 \pm 0,74$) (рисунок 7).

Отрицательные результаты в ИФА_(IgG+IgM+IgA) наблюдали в 5 (1,02%)

случаях: при сифилисе первичном - в 2 (2,53%) из 79 случаев, скрытом неуточнённом как ранний или поздний - в 2 (3,22%) из 62, сифилисе скрытом позднем - в 1 (3,13%) из 32 случаев.

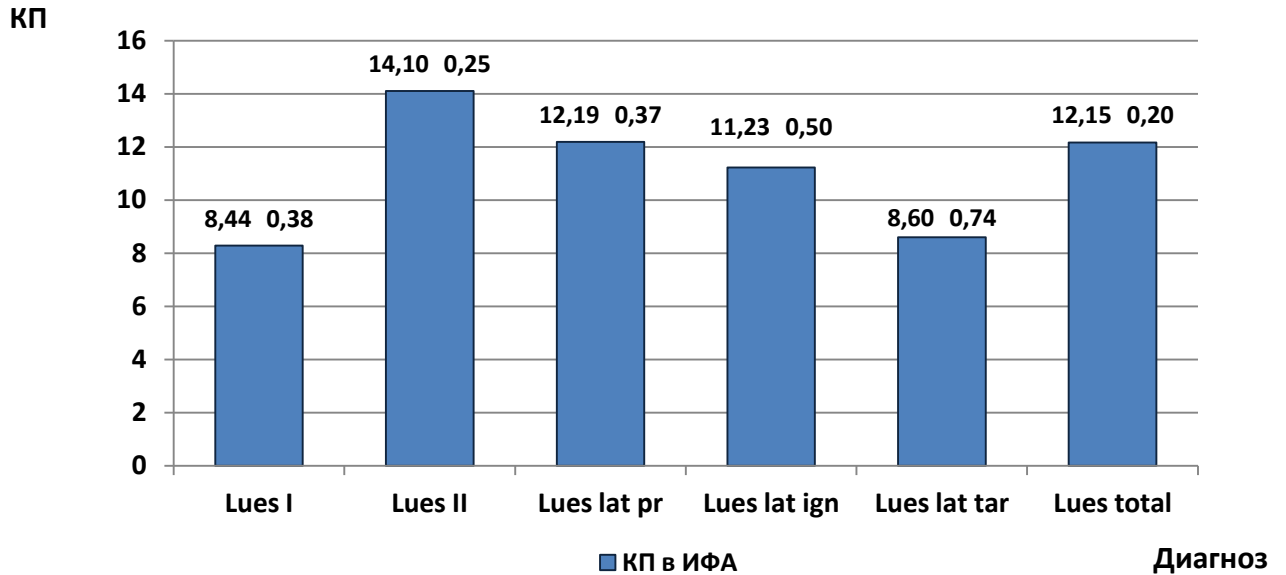


Рисунок 7. Полуколичественная оценка содержания суммарных антител к *T. pallidum* в образцах основной группы методом ИФА.

Изучение в РИФ_{абс} (IgG) этого же набора сывороток крови (n=492) выявило иммунофлюоресцирующие антитела к антигенам *T. pallidum* в 483 (98,17%) случаях: при сифилисе первичном - в 75 (94,94%), вторичном - в 205 (100%), скрытом раннем - в 114 (100%), скрытом неуточнённом как ранний или поздний - в 59 (95,16%), скрытом позднем - в 30 (93,75%) образцах.

Показатели полуколичественного содержания антител к *T. pallidum*, определяемых в РИФ_{абс}, колебались в интервале от «++» до «++++», при этом среднее значение результата исследования ($M \pm m$) составило $3,00 \pm 0,10$ «плюса»; в том числе: при сифилисе первичном - $3,11 \pm 0,07$; вторичном - $3,31 \pm 0,05$; скрытом раннем - $3,22 \pm 0,07$; скрытом неуточнённом как ранний или поздний - $2,92 \pm 0,11$ и сифилисе скрытом позднем - $2,61 \pm 0,15$ (рисунок 8).

Отрицательные результаты в РИФ_{абс} (IgG) наблюдали в 9 (1,83%) случаях: при сифилисе первичном - в 4 (5,06%) из 79 случаев, скрытом неуточ-

нённом как ранний или поздний - в 3 (4,84%) из 62, сифилисе скрытом позднем - в 2 (6,25%) из 32 случаев.

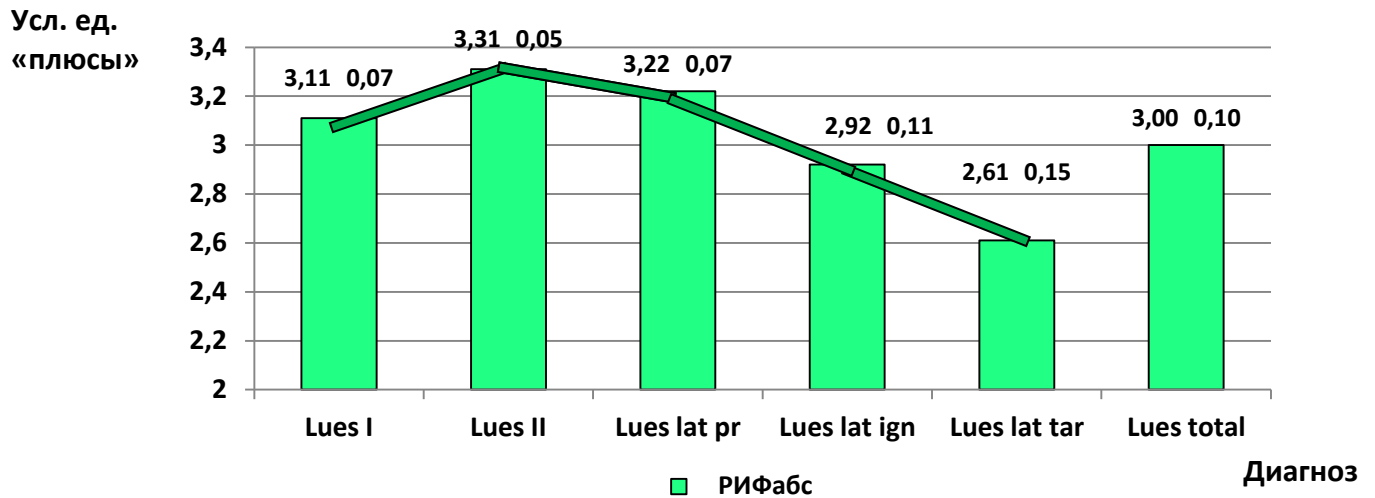


Рисунок 8. Полуколичественная оценка содержания флюоресцирующих антител к *T. pallidum* в образцах основной группы методом РИФа_{abc}.

Графическое представление средних статистических показателей содержания трепонемоспецифических антител в образцах сыворотки крови опытной группы на рисунках 6 и 7 демонстрировало нарастание содержания специфических иммуноглобулинов при сифилисе вторичном по сравнению с сифилисом первичным, и постепенное его понижение в зависимости от длительности течения латентного специфического процесса, что соответствует современным представлениям и литературным данным о динамике специфического гуморального иммунитета при сифилисе (Ляхов В.Ф., 1990; Ткачев В.К. и Вяткина Т.Г., 2005; Красносельских Т.В., 2010; Kern A., 1979; Baker-Zander S.A. et al., 1986; H. Young, 1992, 2000; B.L. Schmidt et al., 1994; Larsen S.A. et al., 1995, 1998; Luger A. 1998; Egglstone S.I. et Turner A.J.L., 2000; Goh B.T., 2001, 2005) и характеризовало собранный клинический материал как репрезентативный для характеристики разных изучаемых клинических форм сифилитической инфекции.

Исследование в ИФА_(IgG+IgM+IgA) 123 сывороток крови, полученных от лиц без указаний на наличие сифилиса, и 30 образцов с БЛПР (контрольная

группа сравнения) показало отрицательные результаты определения антител во всех случаях; интервалы наблюдавшихся значений КП составили 0,001-0,36 ($M \pm m = 0,13 \pm 0,01$) и 0,07-0,64 ($M \pm m = 0,16 \pm 0,01$) соответственно.

Определение в этих образцах крови антител к *T. pallidum* в РИФ_{abc} (IgG) позволило получить 137 (89,54%) отрицательных и 16 (10,46%) слабоположительных («++») результатов, из числа которых 11 (7,19%) слабоположительных ответов были установлены с кровью здоровых доноров и 5 (3,27%) - с сыворотками крови, демонстрировавшими БЛПР.

Таким образом, при аттестации 492 сывороток крови основной группы содержание трепонемоспецифических антител при постановке ИФА_{IgG+IgM+IgA} было определено в 487 (98,98%) образцах, а при выполнении РИФ_{abc} - в 483 (98,17%) образцах.

Одновременно двумя использованными для аттестации иммунохимическими методами лабораторного исследования антитрепонемные антитела не были выявлены только в 2 образцах крови при сифилисе первичном. При этом применение метода ИФА_(IgG+IgM+IgA) с целью определения антител к *T. pallidum* показало несколько более высокую чувствительность по сравнению с РИФ-IgG_{abc} (98,98 и 98,17% соответственно).

Изучение 153 сывороток крови их контрольной группы сравнения в ИФА_{IgG+IgM+IgA} позволило получить отрицательные результаты, свидетельствующие об отсутствии антител к *T. pallidum*, в 100% случаев, в то время как в РИФ_{abc}(IgG) - только в 137 (89,54%) случаев. Полученные данные охарактеризовали РИФ_{abc} как метод, несколько уступающий по показателю клинической специфичности результатам исследования в ИФА_{IgG+IgM+IgA}.

4.3. Результаты исследования образцов сыворотки крови в ИФА с определением специфических антител класса М к антигенам бледной трепонемы

Исследование 492 сывороток крови **основной группы** в ИФА_{IgM} (с наборами реагентов «ИФА-АНТИ-ЛЮИС-М», тест-система иммуноферментная для выявления антител класса М к возбудителю сифилиса» по ТУ 9398-201-05941003-2012; РУ № РЗН 2013/126 от 26.02.2013; производства ООО «НПО «Диагностические системы», Россия) позволило определить присутствие специфических иммуноглобулинов класса М к *T. pallidum* только в 378 (76,83%) образцах (положительные результаты), в том числе: при сифилисе первичном – в 77 (97,47%) из 79 случаев, вторичном – в 192 (93,66%) из 205, скрытом раннем – в 71 (62,28%) из 114, скрытом неуточнённом как ранний или поздний – в 33 (53,23%) из 62, скрытом позднем – в 5 (15,63%) из 32 случаев (таблица 11).

Значения КП положительных результатов в ИФА_{IgM} колебались от 1,05 до 22,18 ($M \pm m = 9,05 \pm 0,30$): при сифилисе первичном - от 1,58 до 22,18 ($M \pm m = 12,54 \pm 0,58$), вторичном - от 1,08 до 21,87 ($M \pm m = 9,78 \pm 0,39$), скрытом раннем - от 1,13 до 18,56 ($M \pm m = 5,95 \pm 0,53$), скрытом неуточнённом как ранний или поздний - от 1,05 до 17,55 ($M \pm m = 4,51 \pm 0,74$), скрытом позднем - от 1,28 до 5,48 ($M \pm m = 2,57 \pm 0,68$).

При этом со 114 (23,17%) образцами сывороток крови опытной группы в ИФА_{IgM} были получены отрицательные результаты исследования, свидетельствовавшие об отсутствии в этих образцах значимых количеств трепонемоспецифических иммуноглобулинов класса М. Распределение образцов, в составе которых антитела класса М к *T. pallidum* не были определены, представлено следующим образом: при сифилисе первичном – 2 (2,53%) из 79, вторичном – 13 (6,34%) из 205, скрытом раннем – 43 (37,72%) из 114, скрытом неуточнённом как ранний или поздний – 29 (46,77%) из 62, скрытом позднем – 27 (84,37%) из 32 случаев.

Значения КП отрицательных результатов в ИФА_{IgM} в контрольной

группе колебались от 0,030 до 0,950 ($M \pm m = 0,296 \pm 0,026$).

Таблица 11.

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

Клиническая форма сифилиса	Результаты выявления специфических антител			
	Количество положительных результатов в тестах (абс / %)		Полуколичественная оценка содержания антител по показателю КП ($M \pm m$)	
	ИФА _(IgG+IgM+IgA)	ИФА _{IgM}	ИФА _(IgG+IgM+IgA)	ИФА _{IgM}
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
Всего больных сифилисом n=492	487 / 98,98%	378 / 76,83%	12,15 ±0,20	9,05±0,30

При этом отрицательные результаты исследования одновременно в ИФА_(IgG+IgM+IgA) и ИФА_{IgM} наблюдали только у 4 (0,81%) их 492 пациентов опытной группы: одного (1,26%) из 79 больных сифилисом первичным, двух (6,90%) из 29 – сифилисом скрытым неуточнённым как ранний или поздний и одного (3,13%) из 32 - сифилисом скрытым поздним. В других случаях отрицательные результаты были получены только в одной из применявшихся модификаций ИФА, в то время как в другой – положительные результаты разной степени выраженности

Динамика показателей КП в ИФА характеризовала содержание анти-

тел соответствующих классов у больных разными клиническими формами сифилиса. Выявленные данные об изменении содержания антител разных классов соответствовали современной концепции образования антител у больных бактериальными инфекциями (сифилисом в частности): гуморальный иммунитет человека после инфицирования *T. pallidum* довольно рано и активно дебютирует выработкой специфических иммуноглобулинов класса М, с постепенным переключением гуморального ответа на синтез антител класса G и снижением образования антител класса М, а также появлением в жидких средах организма антител класса А (Гариб Ф.Ю., 1987; Ляхов В.Ф., 1990; Красносельских Т.В. и др., 2010; Кашкин К.П., 2004; Новиков В.В. и др., 2005; Ярилин А.А., 2010; Хаитов Р.М., 2009; Kern A., 1979; Baker-Zander S.A. et al., 1986; Luger A., 1998) (рисунок 9).

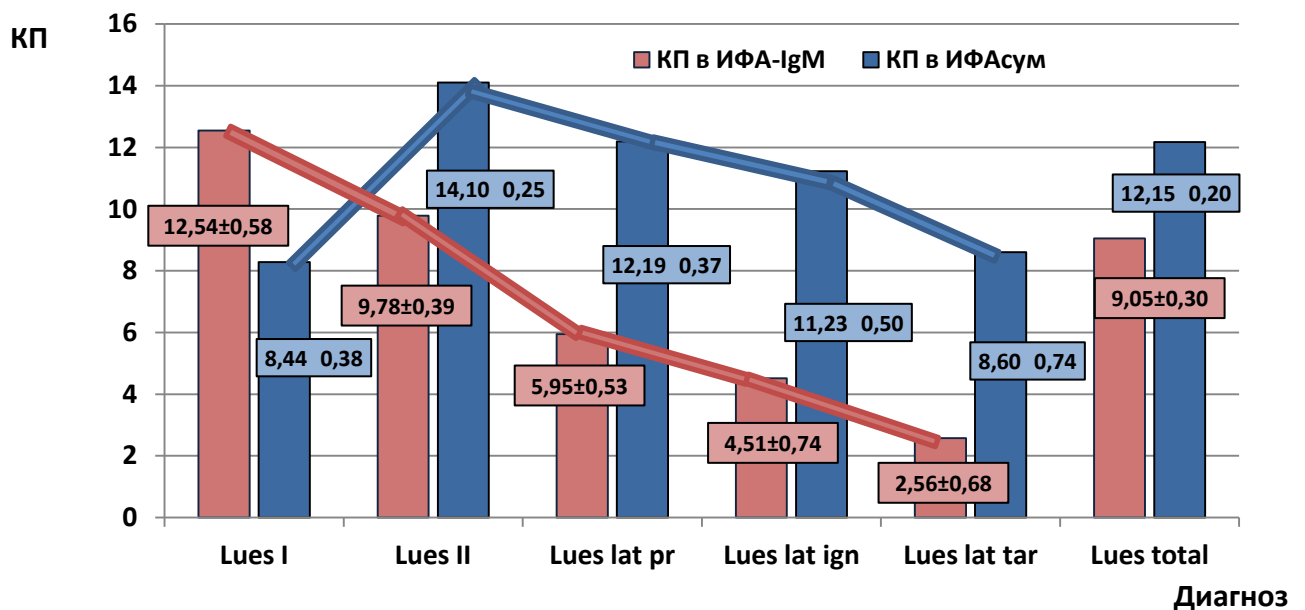


Рисунок 9. Полуколичественная оценка содержания антител класса М и суммарно антител классов М+G+A к *T. pallidum* в образцах опытной группы методом ИФА.

О более выраженной роли иммуноглобулинов класса М в гуморальном иммунном ответе на антигены *T. pallidum* у больных уже на начальных этапах развития сифилиса свидетельствовали более высокие значения средних показателей коэффициента позитивности в ИФА_{IgM}: значения этого коэффициента были максимальными - 12,54±0,58 - при сифилисе первичном; затем

они постепенно понижались по мере увеличения длительности сроков течения заболевания: при сифилисе вторичном - до $9,78 \pm 0,39$, при скрытых формах сифилиса - до уровней $5,95 \pm 0,53$; $4,51 \pm 0,74$ и $2,57 \pm 0,68$ соответственно. В то же самое время содержание трепонемоспецифических иммуноглобулинов класса М, G и А (суммарно) сначала увеличивалось от $8,44 \pm 0,38$ - при сифилисе первичном до $14,10 \pm 0,25$ - при сифилисе вторичном, после чего также начинало постепенно понижаться при скрытых формах течения инфекции до $12,19 \pm 0,37$; $11,23 \pm 0,50$ и $8,60 \pm 0,74$ соответственно.

При этом необходимо отметить, что только при сифилисе первичном средний уровень аналитического сигнала (КП) в ИФА_{IgM} был достоверно выше, чем при постановке ИФА_(IgG+IgM+IgA) ($p < 0,01$). При исследованиях для диагностики каждой последующей клинической формы сифилиса в отдельности и при всех формах сифилиса (суммарно) значения КП в ИФА_(IgG+IgM+IgA) были достоверно выше средних уровней КП в ИФА_{IgM} ($p < 0,01$).

Исследование 153 сывороток крови **контрольной группы** в ИФА_{IgM} показало отрицательные результаты в 149 (97,39%) случаях и ложноположительные результаты в 4 (2,61%) случаях, в том числе: с 2 (1,63%) из 123 сывороток крови в подгруппе здоровых доноров и с 2 (6,67%) из 30 – в подгруппе лиц с БЛПР (таблица 12).

Значения КП отрицательных результатов в ИФА_{IgM} в контрольной группе колебались от 0,011 до 0,810 ($M \pm m = 0,109 \pm 0,016$): с сыворотками крови в подгруппе здоровых доноров - $M \pm m = 0,075 \pm 0,012$ и с сыворотками в подгруппе лиц с БЛПР - $M \pm m = 0,261 \pm 0,017$).

**Результаты определения в ИФА специфических антител
к антигенам *T. pallidum* в контрольной группе здоровых лиц**

Подгруппа контрольной группы	Результаты выявления специфических антител			
	Количество положительных результатов в тестах (абс / %)		Полуколичественная оценка содержания антител по показателю КП (M±m)	
	ИФА _(IgG+IgM+IgA)	ИФА _{IgM}	ИФА _(IgG+IgM+IgA)	ИФА _{IgM}
Здоровые доноры крови n=123	0 / 0%	2 / 1,63%	---	2,187±0,077
Пациенты с БЛПР n=30	0 / 0%	2 / 6,67%	---	2,216±0,039
Всего в группе сравнения n=153	0 / 0%	4 / 2,61%	---	2,209±0,055

Полученные в настоящей работе данные позволили нам рассчитать и сопоставить показатели клинической информативности исследований (по ГОСТ Р 55022.3-2008) для диагностики сифилиса методами ИФА_{IgG+IgM+IgA} и ИФА_{IgM} (таблица 13).

Анализ представленных показателей позволил оценить, что клиническая чувствительность и диагностическая эффективность исследований в ИФА_{IgM} при диагностике сифилиса первичного как достаточно высокие (по 97,47 и 97,41%) и соответствующие таковым при ИФА_(IgG+IgM+IgA) (по 97,47 и 97,41% соответственно).

Показатели клинической чувствительности и диагностической эффективности, установленные для ИФА_{IgM} при сифилисе вторичном (93,66 и 95,25% соответственно), были несколько ниже показателей при сифилисе первичном (97,47 и 97,41%), и уступали соответствующим показателям для ИФА_{IgG+IgM+IgA} при сифилисе вторичном (100 и 98,88%).

При скрытых формах сифилиса показатель клинической чувствитель-

ности определения к антигенам *T. pallidum* в ИФА_{IgM} более существенно уступал исследованиям методом ИФА_{IgG+IgM+IgA}: при скрытом раннем - 62,28 против 100%, при скрытом неуточненном как ранний или поздний - 53,23 против 96,77% и при сифилисе скрытом позднем - 15,63 против 96,88%, а также показателям чувствительности ИФА_{IgM} при манифестных формах: сифилисе первичном (97,47%) и вторичном (93,66%).

Таблица 13.

**Показатели клинической информативности ИФА_{IgM}
для ранней диагностики сифилиса (по ГОСТ Р 55022.3-2008)**

Показатели	Установленная величина показателя (в %)	
	ИФА (IgG+ IgM+IgA)	ИФА _{IgM}
Клиническая чувствительность – количество положительных результатов, полученных у лиц с установленным диагнозом «сифилис»; в том числе:	98,95	76,83
Сифилис первичный	97,47	97,47
Сифилис вторичный	100	93,66
Сифилис скрытый ранний	100	62,28
Сифилис скрытый неуточнённый как ранний или поздний	96,77	53,23
Сифилис скрытый поздний	96,88	15,63
Клиническая специфичность – количество отрицательных результатов, полученных при обследовании здоровых лиц, в том числе:	100	97,39
Здоровые доноры крови	100	98,37
Лица с БЛПР	100	93,33
Диагностическая эффективность – количество результатов, адекватно отражающих состояние здоровья при обследовании больных сифилисом и здоровых лиц; в том числе:	99,22	81,71

Сифилис первичный	97,41	97,41
Сифилис вторичный	98,88	95,25
Сифилис скрытый ранний	98,50	82,40
Сифилис скрытый неуточнённый как ранний или поздний	97,21	84,65
Сифилис скрытый поздний	97,84	83,24
Предсказательная ценность положительных результатов – вероятность наличия заболевания при получении положительного результата в исследовании; в том числе:	100	95,06
Сифилис первичный	100	97,41
Сифилис вторичный	100	97,96
Сифилис скрытый ранний	100	94,67
Сифилис скрытый неуточнённый как ранний или поздний	100	89,19
Сифилис скрытый поздний	100	55,56
Предсказательная ценность отрицательных результатов – вероятность отсутствия заболевания при получении отрицательного результата в исследовании; в том числе:	96,82	56,65
Сифилис первичный	97,41	98,68
Сифилис вторичный	98,88	91,98
Сифилис скрытый ранний	98,50	77,60
Сифилис скрытый неуточнённый как ранний или поздний	97,21	83,70
Сифилис скрытый поздний	97,84	84,66

Примечание: цветом выделены показатели выше 95%, что соответствует современным требованиями к уровню информативности лабораторных исследований для диагностики сифилиса (Приказ МЗ РФ №87 от 26.01.2001 г.).

Аналогичным образом вели себя показатели диагностической эффективности, рассчитанные при скрытых формах сифилиса для ИФА_{IgM} и ИФА_(IgG+IgM+IgA): при скрытом раннем – 82,40% против 98,50%, при скрытом

неуточнённом как ранний или поздний - 84,65 против 97,21% и при сифилисе скрытом позднем - 83,24 против 97,84%.

Таким образом, исследование образцов крови опытной группы (полученных от больных сифилисом) с использованием технологии ИФА в модификации ИФА_{IgM} позволило установить частоту выявления и динамику изменения содержания трепонемоспецифических антител класса М в сыворотке крови у больных разными формами сифилиса. Так, показано эффективное выявление в ИФА специфических IgM к *T. pallidum* в 97,47% образцов при сифилисе первичном, в 93,66% - при вторичном, в 62,28% – при скрытом раннем, в 53,23% – при скрытом неуточнённом как ранний или поздний и в 15,63% – при сифилисе скрытом позднем.

С применением расчета полуколичественного показателя содержания анализа - коэффициента позитивности (КП) - в ИФА показано высокое содержание антител класса М у подавляющего числа больных уже на самых ранних этапах развития сифилитической инфекции. При сифилисе первичном значение КП ($M \pm m$) составило $12,54 \pm 0,58$, при переходе к сифилису вторичному содержание антител понижалось до $9,78 \pm 0,39$, при скрытых формах заболевания понижение уровней антител достигало $5,95 \pm 0,53$ (скрытый ранний), $4,51 \pm 0,74$ (скрытый неуточнённый как ранний или поздний) и $2,57 \pm 0,68$ (сифилис скрытый поздний).

Полученные в исследовании данные позволили рассчитать и сопоставить показатели клинической информативности исследований в ИФА для диагностики сифилиса в модификации ИФА_{IgG+IgM+IgA} и ИФА_{IgM}.

Показатели клинической чувствительности исследований в ИФА_{IgM} были наиболее высокими при сифилисе первичном (97,47%) и вторичном (93,66%), но существенно ниже при скрытых формах (62,28% – при скрытом раннем; 53,23% - при скрытом неуточнённом как ранний или поздний и 15,63% - при сифилисе скрытом позднем); при всех формах этого заболевания – 76,83%.

Клиническая специфичность исследований методом ИФА_{IgM} при си-

филисе составила 97,39%, диагностическая эффективность – 81,71%, предсказательная ценность положительных результатов – 95,6%, предсказательная ценность отрицательных результатов – 56,65%.

Сопоставление показателей содержания специфических IgM и антител трех классов (IgM+IgG+IgA) суммарно позволило установить, что средний уровень аналитического сигнала в ИФА_{IgM} только при сифилисе первичном был достоверно выше, чем при постановке ИФА_(IgG+IgM+IgA) ($p < 0,01$); при диагностике в ИФА_{IgG+IgM+IgA} сифилиса вторичного и скрытого, а также всех форм сифилиса вместе средние значения уровней КП были достоверно выше, чем в ИФА_{IgM} ($p < 0,01$). Это обстоятельство обусловило более высокие значения клинической чувствительности и диагностической эффективности модификации теста ИФА_(IgG+IgM+IgA), что, в свою очередь, определяет показания к использованию каждой из модификаций метода.

4.4. Результаты исследования образцов сыворотки крови методом РИФ_{abc}-IgM с определением специфических антител к антигенам бледной трепонемы

По причине доступности для проведения исследований ограниченного количества наборов реагентов («Антипаллидум-Флюороген-IgM», диагностикум для выявления антител класса М к *Treponema pallidum* в реакции иммунофлюоресценции» по ТУ 9398-128-70423725-2011; РУ № РЗН 2013/247 от 28.02.2013 г.; производства ЗАО «ЭКОлаб», Россия), которые на момент проведения настоящей работы проходили регистрацию в Российской Федерации, исследованию в РИФ_{abc}-IgM были подвергнуты только 423 из 492 образцов сыворотки крови **опытной группы** (больные сифилисом). Исследование в РИФ_{abc}-IgM позволило получить 319 (75,41%) положительных результатов, в том числе: 70 (95,89%) из 73 – в подгруппе больных с сифилисом первичным, 179 (89,50%) из 200 – с сифилисом вторичным, 48 (53,93%) из 89 – с сифилисом скрытым ранним, 16 (42,11%) из 38 – с сифилисом скрытым неуточнённым как ранний или поздний и 6 (26,09%) из 23 – с сифилисом скрытым поздним (таблица 14).

Таблица 14.

Результаты исследования в РИФ_{abc}-IgM 423 образцов сывороток крови опытной группы (больные сифилисом)

Клиническая форма сифилиса	Результаты выявления специфических антител			
	Количество положительных результатов в тестах (abc / %)		Полуколичественная оценка содержания антител в условных «плюсах» (M±m)	
	РИФ _{abc} (IgG)	РИФ _{abc} -IgM	РИФ _{abc} (IgG)	РИФ _{abc} -IgM
Первичный	75 / 94,94% n=79	70 / 95,89% n=73	3,11±0,07	3,04±0,07
Вторичный	205 / 100% n=205	179 / 89,50% n=200	3,31±0,05	2,98±0,06

Скрытый ранний	114 / 100% n=114	48 / 53,93% n=89	3,22±0,07	2,13±0,09
Скрытый неуточнённый как ранний или поздний	59 / 95,16% n=62	16 / 42,11% n=38	2,92±0,11	2,13±0,12
Скрытый поздний	30 / 93,75% n=32	6 / 26,09% n=23	2,61±0,15	2,17±0,21
Всего (больные сифилисом)	483 / 98,17% n=492	319 / 75,41% n=423	3,00 ±0,10	2,79±0,05

Полуколичественные показатели содержания флюоресцирующих антител в образцах **опытной группы** колебались в интервале от «+»¹ до «++++», а среднее значение результата ($M \pm m$) в условных единицах «плюсах» составило $2,79 \pm 0,05$; в том числе: при первичном - $3,04 \pm 0,07$; вторичном - $2,98 \pm 0,06$; скрытом раннем - $2,13 \pm 0,09$; скрытом неуточнённом как ранний или поздний - $2,13 \pm 0,12$ и скрытом позднем - $2,17 \pm 0,21$ (рисунок 10).

условные ед.
«плюсы»

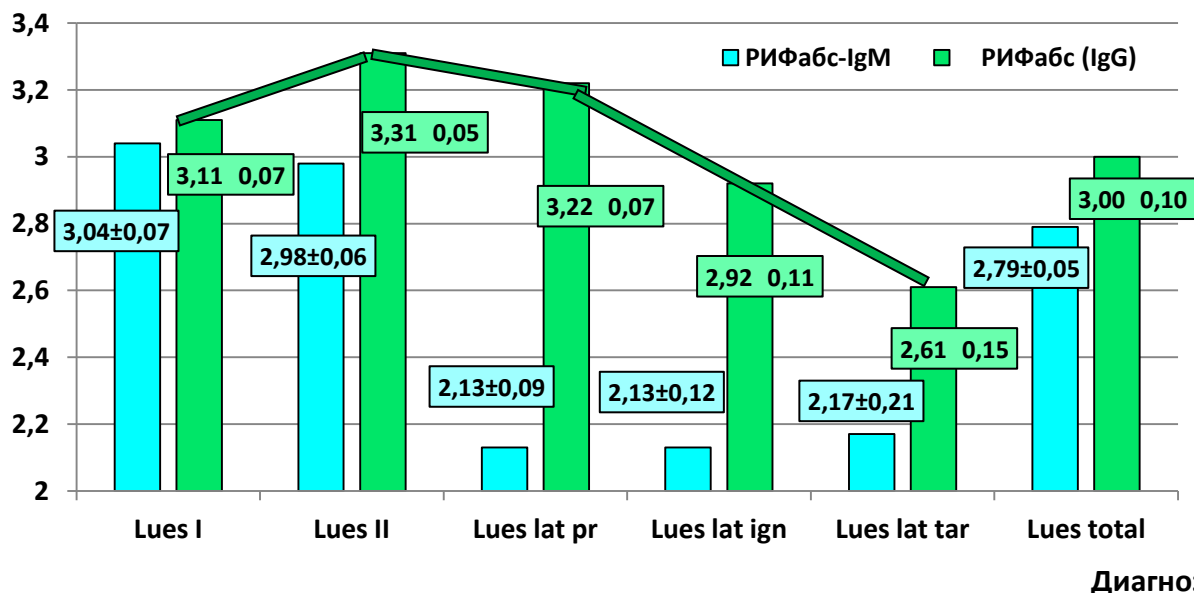


Рисунок 10. Полуколичественная оценка определения антител к *T. pallidum* методом РИФа_{abc} (IgG) и РИФа_{abc}-IgM в образцах сыворотки крови опытной группы.

¹ В соответствии с инструкцией разработчика набора реагентов «Антипаллидум-Флюороген-IgM» (диагностикум для выявления антител класса М к *T. pallidum* в реакции иммунофлюоресценции) по ТУ 9388-128-70423725-2011 значимым считается результат от «+» (слабоположительный) и выше до «++++».

В РИФ_{abc}-IgM с образцами крови больных сифилисом опытной группы всего было получено 104 (24,59%) отрицательных результата. Отрицательные результаты в РИФ_{abc}-IgM при сифилисе первичном наблюдали с 3 (4,29%) образцами: один из которых в РИФ_{abc} (IgG), ИФА_{IgM} и ИФА_{IgM+IgG+IgA} также демонстрировал отсутствие трепонемоспецифических антител, другой - в РИФ_{abc} (IgG) показывал положительный результат на «+++», а методом ИФА_{IgM} в нём определялся низкий уровень антител (КП = 1,58), с третьим образцом в РИФ_{abc} (IgG) был получен отрицательный результат на «+», а в ИФА_{IgM} определен положительный ответ со средним уровнем содержания антител (КП = 4,67).

При вторичном сифилисе отрицательные результаты в РИФ_{abc}-IgM были определены с 21 (10,50%) образцом: из которых в ИФА_{IgM} в 7 случаях специфические IgM также не были выявлены, в 6 - они определялись в низкой ($1,18 \leq \text{КП} \leq 2,11$), в 6 - в средней ($4,1 \leq \text{КП} \leq 9,92$) и в 2 случаях - в высокой концентрации ($10,19 \leq \text{КП} \leq 17,46$). Со всеми 21 образцами, полученными у больных сифилисом вторичным и показавшими в РИФ_{abc}-IgM отрицательные результаты, при аттестации в РИФ_{abc} (IgG) наблюдали положительные результаты: на «+++» - 3 образца и на «+++ /++++» - 18 образцов.

Антитела класса М к антигенам *T. pallidum* не были выявлены в РИФ_{abc}-IgM в 41 (46,07%) образце опытной группы, полученном от больных сифилисом скрытым ранним; при этом из них в ИФА_{IgM} с 23 сыворотками также были получены отрицательные результаты, и ещё в 7 случаях IgM определялись в низкой ($1,0 \leq \text{КП} \leq 2,5$), в 10 случаях - в средней ($2,76 \leq \text{КП} \leq 9,47$) и 1 случае - в высокой концентрации ($7,9 \leq \text{КП} \leq 10,7$).

При сифилисе неуточненном как ранний или поздний антитела в РИФ_{abc}-IgM не были определены в 22 (57,89%) случаях; результаты исследования этих сывороток в ИФА_{IgM} в 10 случаях также были отрицательными, а в 9 случаях антитела класса М выявлялись в низкой ($1,0 \leq \text{КП} \leq 2,5$) и в 3 случаях - в средней ($2,71 \leq \text{КП} \leq 7,11$) концентрации.

В образцах крови при сифилисе скрытом позднем в РИФ_{abc}-IgM

исследуемые маркеры инфекции не были определены в 17 (73,91%) случаях; результаты исследования этих сывороток в ИФА_{IgM} в 15 случаях были также отрицательными, а в 2 случаях антитела класса М выявлялись в низкой концентрации ($1,77 \leq \text{КП} \leq 2,36$).

Изучение в РИФ_{abc}-IgM 73 сывороток крови из **группы контроля** (полученных от лиц без сифилиса) было выявлено 63 (86,30%) отрицательных и 10 (13,70%) положительных результатов. Положительные результаты были получены с 3 (5,77%) из 52 исследованных образцов здоровых доноров крови и с 7 (33,33%) - из 21 исследованного образца с БЛПР (Таблица 15).

Таблица 15.

Результаты исследования в РИФ_{abc}-IgM 423 образцов сывороток крови контрольной группы (пациенты без сифилиса)

Подгруппа контрольной группы	Результаты выявления специфических антител			
	Количество положительных результатов в тестах (abc / %)		Полуколичественная оценка содержания антител в условных «плюсах» (M±m)	
	РИФ _{abc} (IgG)	РИФ _{abc} -IgM	РИФ _{abc} (IgG)	РИФ _{abc} -IgM
Здоровые доноры крови	11 / 8,94% n=123	3 / 5,77% n=52	0,29 ±0,06	2,0±0,00
Пациенты с БЛПР	5 / 17,24% n=29	7 / 33,33% n=21	0,17 ±0,12	1,83 ±0,43
Всего (контрольная группа)	16 / 10,53% n=152	10 / 13,70% n=73	0,21 ±0,10	1,88 ±0,29

При этом выраженность положительного результата колебалась от «+» до «+++». Положительные результаты в РИФ_{abc}-IgM были получены с 3 образцами сыворотки крови здоровых доноров крови: 2 образцами, показавшими положительные результаты в ИФА_{IgM} (КП = 2,790 и 1,584), и одним образцом, демонстрировавшим отсутствие антител класса М в ИФА_{IgM} (КП = 0,058).

Семь положительных результатов в РИФ_{abc}-IgM в подгруппе пациен-

тов с БЛПР наблюдали с: 2 образцами сыворотки крови, имевшими положительные результаты в ИФА_{IgM} (КП=3,420 и 1,011), и 5 образцами – с отрицательными результатами исследования в ИФА_{IgM} с КП в интервале 0,070-0,760 ($M \pm m = 0,392 \pm 0,044$).

Результаты исследований, проведенных в РИФ_{абс}-IgM с образцами крови опытной группы (полученными от больных сифилисом) и контрольной группы (полученными от здоровых лиц), позволили нам провести расчет показателей информативности изучавшегося диагностического лабораторного метода по ГОСТ Р 53022.3-2008 в сравнении с методикой, наиболее широко применяемой в настоящее время - РИФ_{абс} (IgG) (Таблица 16).

Таблица 16.

Показатели клинической информативности РИФ_{абс} (IgG) и РИФ_{абс}-IgM для ранней диагностики сифилиса (по ГОСТ Р 55022.3-2008)

Показатели	Установленная величина показателя (в %)	
	РИФ _{абс} (IgG)	РИФ _{абс} -IgM
Клиническая чувствительность – количество положительных результатов, полученных у лиц с установленным диагнозом «сифилис»; в том числе:		
Сифилис первичный	98,17	75,41
Сифилис вторичный	94,94	95,89
Сифилис скрытый ранний	100	89,50
Сифилис скрытый неуточнённый как ранний или поздний	100	53,93
Сифилис скрытый поздний	95,16	42,11
Клиническая специфичность – количество отрицательных результатов, полученных при обследовании здоровых лиц, в том числе:		
Здоровые доноры крови	89,54	86,30
Лица с БЛПР	91,06	94,23
	87,76	66,67

Диагностическая эффективность – количество результатов, адекватно отражающих состояние здоровья при обследовании больных сифилисом и здоровых лиц; в том числе:	96,74	77,02
Сифилис первичный	92,24	91,10
Сифилис вторичный	95,53	88,64
Сифилис скрытый ранний	94,01	68,52
Сифилис скрытый неуточнённый как ранний или поздний	90,74	71,17
Сифилис скрытый поздний	90,80	71,88
Предсказательная ценность положительных результатов – вероятность наличия заболевания при получении положительного результата в исследовании; в том числе:	96,79	96,96
Сифилис первичный	82,42	87,50
Сифилис вторичный	92,76	94,71
Сифилис скрытый ранний	87,69	82,76
Сифилис скрытый неуточнённый как ранний или поздний	78,67	61,54
Сифилис скрытый поздний	65,22	37,50
Предсказательная ценность отрицательных результатов – вероятность отсутствия заболевания при получении отрицательного результата в исследовании; в том числе:	93,84	37,72
Сифилис первичный	97,16	95,45
Сифилис вторичный	100	75,00
Сифилис скрытый ранний	100	60,58
Сифилис скрытый неуточнённый как ранний или поздний	97,85	74,12
Сифилис скрытый поздний	98,56	78,75

Примечание: цветом выделены показатели выше 95%, что соответствует современным требованиями к уровню информативности лабораторных исследований для диагностики сифилиса (Приказ МЗ РФ №87 от 26.01.2001 г.).

Анализ представленных показателей позволил оценить, что клиническая чувствительность и диагностическая эффективность исследований в РИФ_{abc}(IgG) были достоверно выше при сифилисе вторичном, скрытом раннем, скрытом неуточнённом как ранний или поздний и скрытом позднем по отношению к соответствующим показателям исследований в РИФ_{abc}-IgM: 100, 100, 95,16 и 93,75% против 89,50, 53,93, 42,11 и 26,09%. Лишь при самой начальной клинической форме инфекции - сифилисе первичном - клиническая чувствительность РИФ_{abc}-IgM соответствовала необходимым требованиям к современным иммунодиагностическим тестам (не менее 95%; по Приказу Минздрава России №87 от 26.03.2001 г.) и при этом превышала показатель клинической чувствительности определения антител методом РИФ_{abc}(IgG): 95,89 и 94,94% соответственно.

Необходимо также отметить, что клиническая специфичность обеих модификаций исследования в РИФ_{abc} значительно отставала от современных требований, предъявляемых к диагностическим иммунохимическим тестам при диагностике сифилиса (не менее 95%): при РИФ_{abc}(IgG) показатель составил 89,54% и при РИФ_{abc}-IgM - 86,30%.

Более высокая частота получения неспецифических положительных результатов определения специфических антител класса М в РИФ_{abc}-IgM в группе здоровых пациентов по сравнению с применением методики определения специфических антител класса G в РИФ_{abc} (IgG) обусловила также и отставание показателя общей диагностической эффективности применения РИФ_{abc}-IgM (77,02%) в сравнении с РИФ_{abc} (IgG) (96,74%). При манифестных ранних клинических формах диагностическая эффективность применения методики РИФ_{abc}-IgM была существенно выше: при сифилисе первичном - 91,10%, сифилисе вторичном - 88,64%; однако при скрытых формах диагностическая эффективность РИФ_{abc}-IgM была недостаточной - в рамках 68,52-71,88%.

Получение неспецифических ложноположительных результатов в РИФ_{abc} не существенно понизило предсказательную ценность получения

положительного результата (ПЦ⁺) при определении антител класса G - 96,79% и класса M - 96,96%, а также предсказательную ценность отрицательного результата исследования (ПЦ⁻) при определении антител класса G - 97,16% и класса M - 95,45%) при изучении кумулятивных результатов исследования вне зависимости от клинической формы сифилиса.

При оценке ПЦ⁺ с образцами крови больных манифестными формами инфекции величины показателей при постановке РИФ_{abc}-IgM были выше, чем при РИФ_{abc}(IgG): при сифилисе первичном - 87,50 против 82,42%, при сифилисе вторичном - 94,71 против 92,76%, что может быть обусловлено большей выраженностью гуморального иммунитета с участием антител класса M. И, наоборот, при скрытых формах сифилиса показатели ПЦ⁺ были более высокими при применении модификации РИФ_{abc}(IgG), так как для этих сроков развития заболевания более характерно преобладание выработки антител класса G над антителами класса M (при сифилисе скрытом раннем - 87,69 против 82,76%%, при сифилисе неуточнённом как ранний или поздний - 78,67 против 61,54% и при сифилисе позднем - 65,22 против 37,72%).

Таким образом, на основании проведенных исследований была доказана работоспособность метода, разработанного производителем для определения специфических антител класса M к антигенам возбудителя сифилитической инфекции *Treponema pallidum* и соответствующего ему набора реагентов «Антипаллидум-Флюороген-IgM». Полученные при этом данные позволили произвести расчеты показателей информативности этой модификации клинического лабораторного исследования в РИФ_{abc} в сравнении с модификацией, наиболее часто применяемой при диагностике сифилиса - выявлением трепонемоспецифических антител класса G в РИФ_{abc} (IgG).

Показана более высокая клиническая чувствительность метода РИФ_{abc}-IgM только при обследовании лиц с сифилисом первичным, при этом установленная величина превышала аналогичный показатель при РИФ_{abc}(IgG): 95,89 и 94,52% соответственно. При других клинических формах сифилитической инфекции применение метода РИФ_{abc}-IgM по пока-

зателю клинической чувствительности существенно уступало исследованию в РИФ_{абс} (IgG): при сифилисе вторичном - 89,50 против 100%; при скрытом раннем - 53,93 против 100%; при скрытом неуточненном как ранний или поздний - 42,11 против 94,92% и при сифилисе скрытом позднем - 29,09 против 93,33.

При обследовании в РИФ_{абс}-IgM у лиц без сифилиса наблюдалось до 13,70% неспецифических положительных результатов, что характеризовало его с позиций недостаточно высокой специфичности (86,30%) и привело к снижению показателя диагностической эффективности метода исследования (77,02%). По соответствующим показателям постановки исследований в модификации РИФ_{абс}(IgG) демонстрировали более высокие значения: КС - 89,54% и ДЭ - 96,74%.

При использовании методики РИФ_{абс}-IgM для диагностики ранних манифестных форм сифилиса наибольшей информативностью обладают положительные, нежели отрицательные результаты исследования, так как показатели предсказательной ценности их положительных результатов (при всех формах - 96,96%, сифилисе первичном - 87,50%, вторичном - 94,71%) были существенно выше, чем показатели предсказательной ценности отрицательных результатов исследования (37,72; 95,45 и 75,00% соответственно).

Анализ полученных показателей информативности модификаций лабораторных исследований в реакции непрямой иммунофлюоресценции РИФ_{абс} с выявлением антител класса G или M позволил определить значение и возможность применения каждой из них в практическом здравоохранении при ранней диагностике разных клинических форм сифилиса, а также приступить к разработке показаний к их использованию и порядка обследования соответствующих групп населения.

ГЛАВА 5. РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ КЛАССА М И G К АНТИГЕНАМ *Treponema pallidum* МЕТОДОМ ИММУНОБЛОТТИНГА У БОЛЬНЫХ СИФИЛИСОМ ПЕРВИЧНЫМ

5.1. Определение трепонемоспецифических антител класса М (к антигенам TrN15, TrN17, TrpA и TrN47)

В это исследование были включены 76 из 79 образцов сыворотки крови опытной группы, полученные от больных с установленным клиническим диагнозом «сифилис первичный», независимо от локализации первичного аффекта; контрольная группа была представлена 24 образцами сыворотки крови активных доноров крови. Ограниченный объем исследования в этом разделе был обусловлен лимитированным количеством наборов реагентов для проведения иммуноблоттинга с дифференцированным выявлением трепонемоспецифических антител класса М к антигенам возбудителя сифилиса.

Основанием для постановки диагноза больным сифилисом служили: наличие клинических проявлений заболевания на коже или видимых слизистых оболочках, прямое обнаружение возбудителя *T. pallidum* в отделяемом шанкров и/или данные серологического обследования пациентов в соответствии с действующими нормативными документами (Приказ МЗ РФ №327 от 25.07.2003; Кубанова А.А., 2012 а).

Все образцы сыворотки крови больных сифилисом первичным и здоровых доноров крови были предварительно изучены в ИФА_{IgM} (с наборами реагентов «ИФА-АНТИ-ЛЮИС-М», тест-система иммуноферментная для выявления антител класса М к возбудителю сифилиса» по ТУ 9398-201-05941003-2012; РУ № РЗН 2013/126 от 26.02.2013 года; производства ООО «НПО «Диагностические системы», Россия) (см. раздел 4.1.). В составе иммуносорбента для выявления антител в вышеуказанном наборе реагентов для ИФА производителем набора используются антигены *T. pallidum* с молекулярной массой 17, 41 и 47 кДа.

Исследование 76 сывороток крови больных сифилисом первичным в

ИФА_{IgM} позволило на предварительном этапе определить специфические антитела класса М к антигенам *T. pallidum* в 74 (97,37%) и их отсутствие - в 2 (2,63%) случаях.

Показатели КП, рассчитанные для всех положительных результатов в ИФА_{IgM}, варьировали в интервале от 1,20 до 22,18 ($M \pm m = 12,42 \pm 0,62$):

- в низкой концентрации ($1,20 \leq \text{КП} \leq 3,98$) антитела определялись с 5 образцами сыворотки крови;

- в средней концентрации ($4,30 \leq \text{КП} \leq 7,69$) - с 15 образцами;

- в высокой концентрации ($8,03 \leq \text{КП} \leq 22,18$) - 54 образцами сыворотки крови.

Значения КП в ИФА_{IgM} с 2 образцами, показавшими отрицательные результаты исследования, составили: 0,97 (так называемая «серая зона результатов исследования») и 0,03 соответственно.

Со всеми 24 образцами из группы контроля (здоровые доноры крови) в ИФА_{IgM} нами были получены отрицательные результаты исследования.

Дифференцированное определение антител классов М или G к разным антигенам *T. pallidum* проводили методом линейного иммуноблоттинга (Western blot) с наборами реагентов «Лайн-Блот Сифилис», тест-система для выявления антител к отдельным антигенам возбудителя сифилиса методом иммунного блоттинга с использованием рекомбинантных антигенов (по ТУ 9398-118-70423725-2012; РУ № РЗН 2014/1657 от 05.06.2014 г.; производства ЗАО «ЭКОлаб», Россия): комплект № 1: «Лайн-Блот-Сифилис-IgG» для выявления антител класса G к *T. pallidum*» (на момент проведения исследования также ещё выпускался по ТУ 9388-128-70423725-2011; РУ № РЗН 2013/247 от 28.02.2013 г.); и комплект № 2: «Лайн-Блот-Сифилис-IgM» для выявления антител класса М к *T. pallidum*».

Иммуносорбент в составе набора реагентов «Лайн-Блот-Сифилис» предназначен для отдельного определения антител к четырем рекомбинантным белкам, являющимся полными аналогами антигенов возбудителя сифилиса *Treponema pallidum* штамма Nichols: TrN15, TrN17, TmpA и TrN47.

Полуколичественный учет результатов исследования в иммуноблоттинге осуществляли, в соответствии с указаниями инструкции по применению наборов, в условных единицах: «минус» - отрицательный результат и «плюсах» (от «0,5+» до «++++») - положительные результаты. По результатам определения антител к отдельным антигенам *T. pallidum* в ИБ для каждого исследованного образца выдавалось обобщающее заключение: об отсутствии антител в образце (**отрицательный результат**) - в случае, если ни с одним из 4-х антигенов не получали результатов исследования с интенсивностью окраски на участке стрипа равной или превышающей «0,5+»; **неопределенный результат** - при появлении свидетельств присутствия антител с интенсивностью окраски равной или превышающей «0,5+» только к одному из антигенов и **положительный результат** - в случаях выявления антител более чем к 2-м антигенам с интенсивностью окрашивания соответствующих участков стрипов равной или превышающей «0,5+».

С целью статистической обработки результатов полуколичественного определения антител в минимальных количествах (с интенсивностью менее «0,5+») нами дополнительно было введено обозначение «0,3+» (это обозначение не используется производителем наборов реагентов); применение этого обозначения не изменяло формулировку обобщающего заключения по результатам исследования соответствующего образца крови в иммуноблоттинге, но это позволяло изучать последовательность появления следовых значений иммунных антител к каждому антигену.

Исследование 76 сывороток крови больных сифилисом первичным в иммуноблоттинге с набором «Лайн-Блот-Сифилис-IgM» (ИБ-IgM) позволило сделать следующие обобщающие заключения: 2 (2,63%) - отрицательных, 9 (10,84%) - неопределенных и 65 (85,53%) - положительных (рисунок 11).

Полученные результаты характеризовали **клиническую чувствительность** исследования в ИБ-IgM при сифилисе первичном на уровне 85,53%, что оказалось несколько ниже литературных данных по оценке величины этого показателя для иммуноблоттинга у больных всеми формами заболева-

ния с использованием IgG (94,8%) (Кубанова А.А. и др., 2006; Фриго Н.В. и др., 2006; Hagedorn H.J. et al., 2002), но существенно выше, чем при обследовании в ИБ-IgM больных сифилисом вторичным (29,2%), сифилисом ранним скрытым (12,5%) и беременных с серорезистентностью после перенесенного сифилиса (8%) (Сердюцкая М.В. и др., 2007).

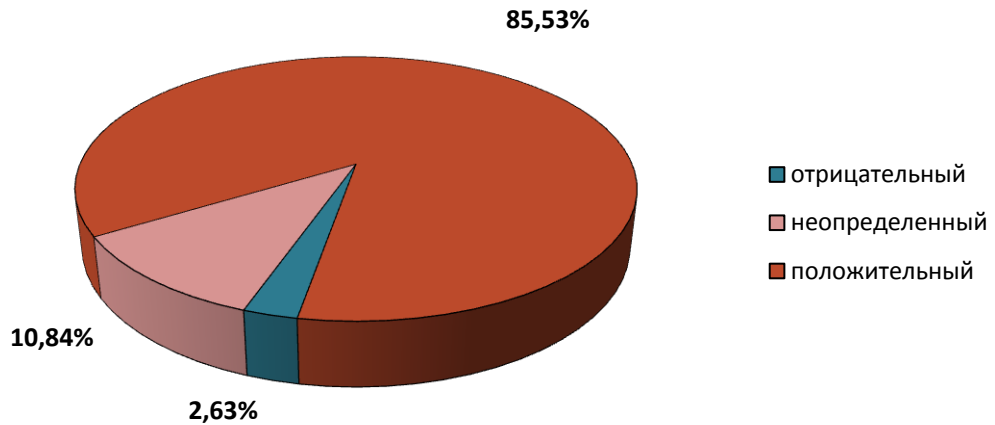


Рисунок 11. Результаты исследования в ИБ-IgM сывороток крови больных первичным сифилисом (в основной группе).

Отрицательные результаты в ИБ-IgM нами были выявлены с 2 сыворотками крови больных сифилисом первичным, в том числе: с одной сывороткой крови, демонстрировавшей также отсутствие специфических антител в ИФА_{IgM} (КП = 0,03) и с образцом, показавшим в ИФА_{IgM} средний уровень содержания антител (КП = 2,75). При этом с обеими указанными сыворотками крови в ИБ-IgM были получены результаты, указывавшие на присутствие в них следовых количеств антител класса М («0,3+») к антигенам TrpA + TrpN15 и TrpA + TrpN47 соответственно; эти показатели нами были учтены при оценке очередности появления антител класса М к разным антигенам *T. pallidum* на ранних этапах развития инфекции.

Неопределенные результаты в иммуноблоттинге-IgM наблюдали с 9 образцами, включая: 2 сыворотки крови с низким уровнем IgM по результатам исследования в ИФА_{IgM} ($1,58 \leq \text{КП} \leq 3,98$), 3 сыворотки - со средним уровнем антител ($4,67 \leq \text{КП} \leq 5,88$) и 4 сыворотки - с высоким содержанием IgM ($11,52 \leq \text{КП} \leq 15,73$).

Положительные результаты в иммуноблоттинге-IgM были получены с 65 образцами: с 1 сывороткой крови, показавшей отрицательный результат исследования в ИФА_{IgM} (КП = 0,97), и с 64 сыворотками крови, демонстрировавшими в ИФА_{IgM}: низкие уровни антител ($1,20 \leq \text{КП} \leq 3,45$) - 4 образца, средние ($4,30 \leq \text{КП} \leq 7,69$) - 10 и высокие ($8,03 \leq \text{КП} \leq 22,18$) - 50 образцов.

Положительные заключения о результатах исследования в иммуноблоттинге-IgM были установлены при выявлении трепонемоспецифических антител на уровне «0,5+» и более с 2 антигенами одновременно в 14 (21,54%) из 65 обследованных образцов, с 3 антигенами - в 30 (46,15%) случаях и с 4 антигенами - в 21 (32,31%) сыворотке крови.

Со всеми 24 образцами сывороток крови контрольной группы при исследовании их в иммуноблоттинге-IgM наблюдали отрицательные результаты; при этом по отношению к антигенам в составе иммуносорбента на стрипах не определено даже следовых значений содержания иммунных антител, что позволило оценить **клиническую специфичность** исследования в ИБ-IgM с изучавшимся набором реагентов как 100%. Расчетные показатели **диагностической эффективности** составили 89,00%.

Полученные в иммуноблоттинге-IgM данные обследования образцов опытной группы были подвергнуты сравнительному анализу с целью оценки, к каким именно антигенам, из числа включенных в состав иммуносорбента (TrN15, TrN17, TmpA и TrN47), у больных первичным сифилисом развивался наиболее выраженный гуморальный ответ (таблица 17).

Средние показатели ($M \pm m$) содержания антител, рассчитанные для следовых и положительных результатов в условных единицах «плюсах», составили: для антигена TrN15 - $0,4 \pm 0,0$; для TrN17 - $1,0 \pm 0,1$; для TmpA - $1,9 \pm 0,1$ и для антигена Tr№47 - $0,9 \pm 0,1$.

Было показано 100% выявление антител класса М к антигену TmpA: в следовых количествах («0,3+») - в 3 (3,95%) образцах, в значимых количествах (от «0,5+» до «++++») - в 73 (96,05%) из 76 образцов.

**Результаты исследования в иммуноблоттинге-IgM
к разным антигенам *T. pallidum* с сывороткой крови больных
сифилисом первичным (пациенты опытной группы)**

Полуколичественные единицы измерения	Количество результатов определения антител к антигенам (абс / %)			
	TrN15	TrN17	TmpA	TrN47
Отсутствие (□)	21 / 27,63%	7 / 9,21%	0 / 0%	7 / 9,21%
Выявление в следовых количествах (0,3+)	28 / 36,84%	15 / 19,74%	7 / 9,21%	12 / 15,79%
Всего отрицательных	49 / 64,47%	22 / 28,95%	7 / 9,21%	19 / 25,00%
Выявление в значимых количествах (0,5+)	19 / 25,00%	18 / 23,68%	6 / 7,90%	16 / 21,05%
Выявление в значимых количествах (1,0+)	6 / 7,90%	19 / 25,00%	19 / 25,00%	27 / 35,53%
Выявление в значимых количествах (2,0+)	2 / 2,63%	9 / 11,84%	19 / 25,00%	10 / 13,16%
Выявление в значимых количествах (3,0+)	0 / 0%	5 / 6,58%	14 / 18,42%	3 / 3,95%
Выявление в значимых количествах (4,0+)	0 / 0%	3 / 3,95%	11 / 14,47%	1 / 1,32%
Всего положительных	27 / 35,53%	54 / 71,05%	69 / 90,79%	57 / 75,00%
Всего результатов от 0,3+ по 4+	55 / 72,37%	69 / 90,79	76 / 100%	69 / 90,795
Всего в группе	76 / 100%	76 / 100%	76 / 100%	76 / 100%

Установлено отсутствие IgM в 7 (9,21%) образцах по отношению к антигенам TrN17 и TrN47. При этом в отношении TrN17 и TrN47 следовые уровни антител («0,3+») были определены с 15 (19,74%) и 12 (15,79%) образцами соответственно, а значимые количества (в интервале «0,5+» - «++++») - в 54 (71,05%) и 57 (75,00%) из 76 образцов соответственно.

Против TrN15 специфические IgM не были определены в 21 (27,63%) образце, следовые значения («0,3+») определены в 28 (36,84%), значимые количества («0,5+» - «++++») - в 27 (35,53%) сыворотках крови (рисунок 12).

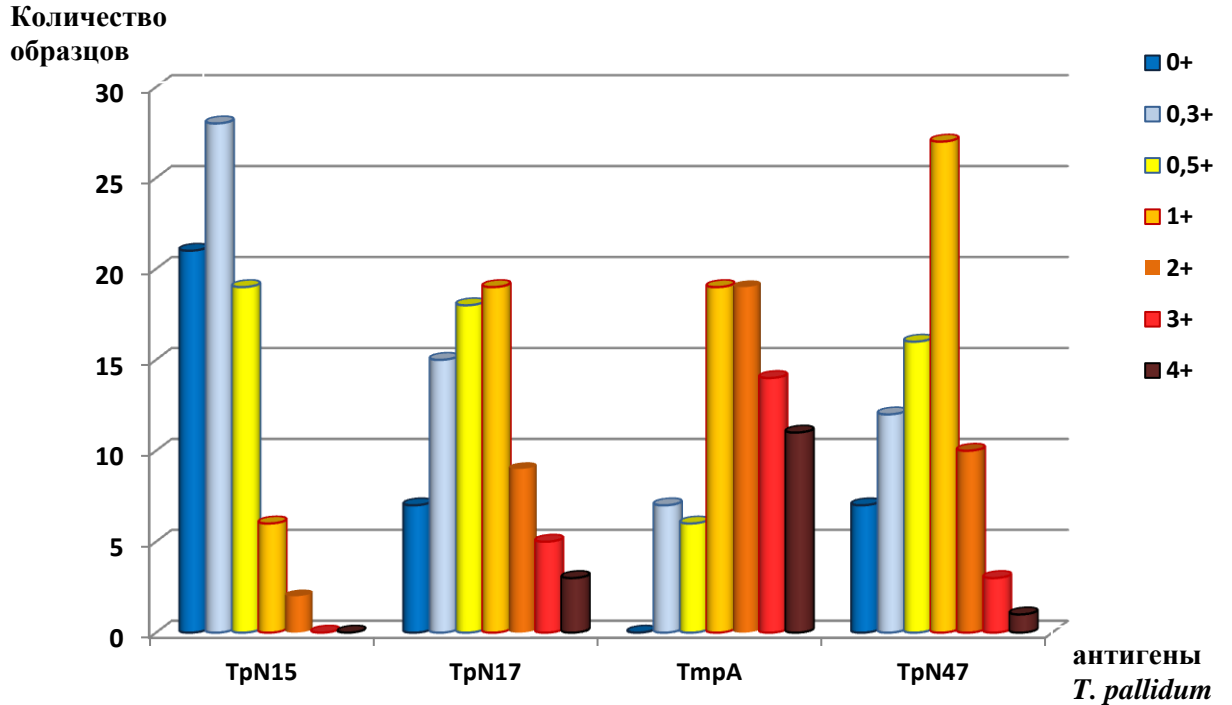


Рисунок 12. Количество сывороток крови, полученных у больных первичным сифилисом (основной группы), демонстрировавших содержание специфических IgM к отдельным антигенам *T. pallidum* при исследовании в ИБ-IgM.

При этом было определено, что в каждом отдельном исследовании в ИБ-IgM с образцом сыворотки крови больного сифилисом первичным наблюдался более высокий уровень антител, превышающий содержание антител ко всем остальным антигенам *T. pallidum*, только к одному из четырёх изучавшихся антигенов. Это обстоятельство позволило нам установить 4 возможных профиля формирования иммунологической реактивности (или профиля иммунного ответа) у больных сифилисом первичным (рисунок 13):

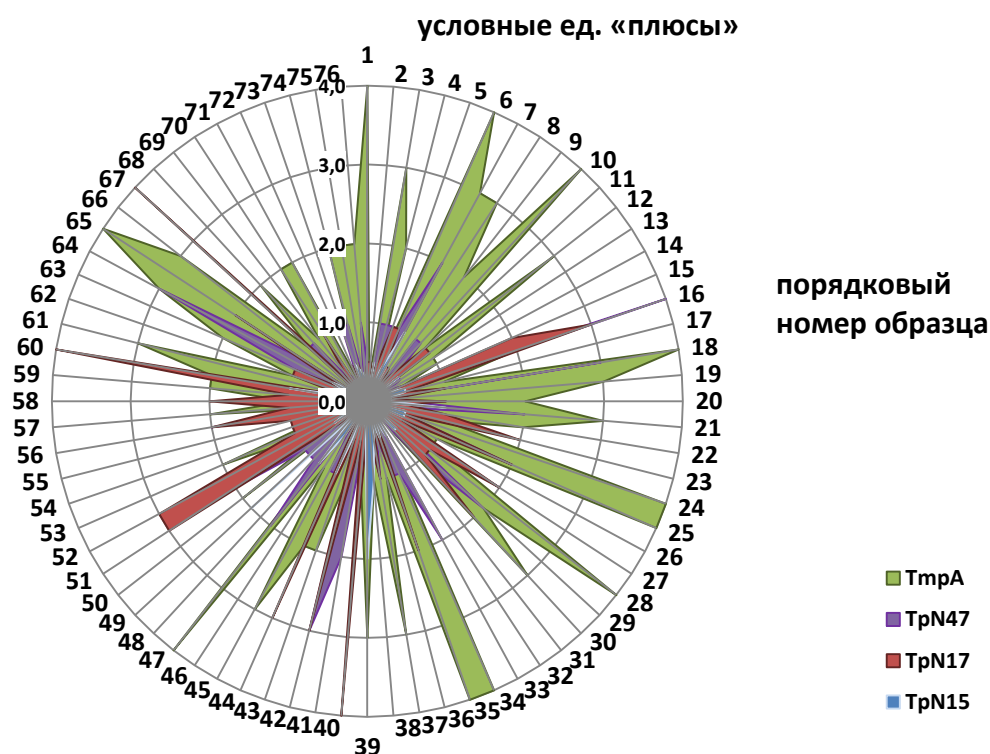


Рисунок 13. Максимальное содержание антител класса М к разным антигенам *T. pallidum* в сыворотке крови 76 больных сифилисом первичным по результатам исследования в ИБ-IgM.

- 1) максимально выраженный гуморальный ответ на антиген TrN15 на уровне «+»/«++», при менее выраженной реактивности в отношении других антигенов в составе набора «Лайн-Блот-Сифилис-IgM» - наблюдали у 2 (2,63%) из 76 обследованных больных сифилисом первичным;
- 2) иммунный ответ с преобладанием содержания антител против антигена TrN17 - на уровне «+» / «++++» - у 17 (22,37%) пациентов;
- 3) профиль преимущественного иммунного ответа на антиген TrpA - на уровне «0,3+» / «++++» - у 50 (65,79%) больных;
- 4) преобладание антителообразования по отношению к TrN47 с интенсивностью «0,3+» / «++++» - у 7 (9,21%) пациентов.

Проведенный анализ полученных в исследовании данных показал, что в 50 (65,79%) из 79 случаев (то есть у подавляющего числа больных сифилисом первичным из состава опытной группы), преобладал иммунный ответ на

антиген **ТрpА** (рисунок 14). Этот антиген, по данным научных публикаций, является периплазматическим белком, участвующим в транспорте металлов через цитоплазматическую мембрану клетки *T. pallidum* (Лазарев В.Н. и др., 2010; Ротанов С.В. и др., 2012-б; Хайруллин Р.Ф. и др., 2013; LaFond R.E. et al., 2006; Tomson F.L. et al., 2007; Seña A.C. et al., 2010; Cox D.L. et al., 2010).

Почти у четверти обследованных пациентов сифилисом первичным - 17 (22,37%) - в сыворотке крови преобладало содержание специфических антител к **ТрN17** – «величайшему мембранному белку» *T. pallium*, который является липопротеином. Высокое содержание белка ТрN17 обнаруживается во внутренней мембране протоплазматического комплекса и в небольших количествах этот антиген присутствует в структуре наружной мембраны возбудителя сифилитической инфекции.

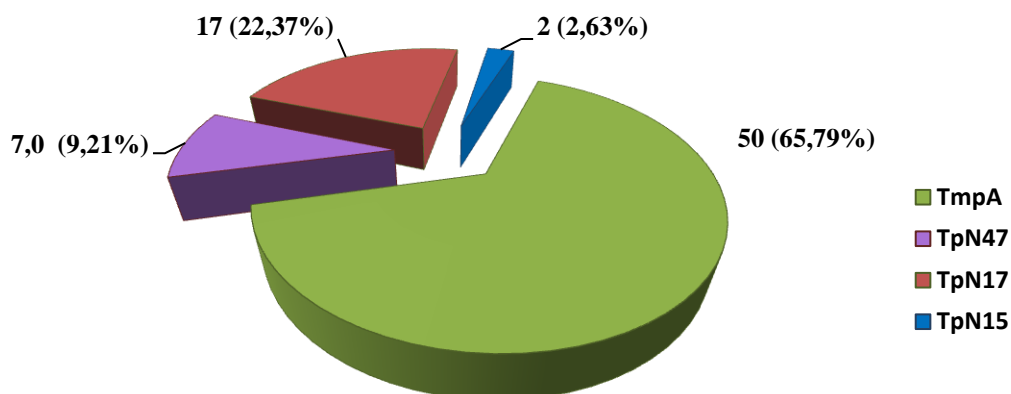


Рисунок 14. Соотношение профилей гуморального иммунного ответа у больных сифилисом первичным в зависимости от профиля содержания IgM к антигенам *T. pallidum*.

В 9,21% случаев (у 7 из 76 больных сифилисом первичным) нами обнаружено максимальное содержание иммунных антител против антигена **ТрN47**, являющегося ферментом - цинк-зависимой карбоксипептидазой - (относится также к группе пенициллин-связывающих белков), который в больших количествах продуцируется патогенной *T. pallidum* (Хайруллин Р.Ф. и др., 2013; Naake D.A. et al., 2000; Brinkman M.B. et al., 2006; Tomson F.L. et al., 2007; Seña A.C. et al., 2010; Cox D.L. et al., 2010).

В наименьшей степени среди больных сифилисом первичным была представлена группа пациентов с приоритетом образования иммунных анти-тел к белку **TrN15 - 2** (2,63%) больных. Этот антиген выявляется в структуре наружной мембраны *T. pallidum ssp. pallidum* (возбудитель сифилиса), а также *ssp. pertenue* (возбудитель фрамбезии), но не обнаруживается у непатогенной культуральной *T. pallidum* biotype Reiter (Лазарев В.Н. и др., 2010; Хайруллин Р.Ф. и др., 2013; LaFond R.E. et al., 2006; Brinkman M.B. et al., 2006; Tomson F.L. et al., 2007; Seña A.C. et al., 2010; Cox D.L. et al., 2010).

Общими свойствами всех перечисленных антигенов *T. pallidum* является их локализация в структуре мембран наружной клеточной стенки или протоплазматического комплекса, а также указание на их высокое содержание в клетке микроорганизма (Хайруллин Р.Ф. и др., 2013; Brinkman M.B. et al., 2006; Tomson F.L. et al., 2007; Cox D.L. et al., 2010). Эти характеристики, вероятно, обеспечивают более раннее распознавание, выделение и представление указанных соединений в качестве чужеродных антигенов профессиональными макрофагами организма хозяина.

Комплекс указанных свойств изучавшихся антигенов возбудителя сифилиса обуславливает более раннее начало синтеза в организме больного сифилисом специфических антител по отношению к ним, что находит своё отражение в содержании соответствующих специфических иммуноглобулинов в сыворотке крови больных сифилисом первичным и выраженности результатов исследования в иммуносерологических тестах для диагностики сифилиса (ИБ-IgM). При этом причины формирования каждого из установленных профилей иммунного ответа у больных сифилисом первичным (преобладание антителогенеза на отдельные антигены бледной трепонемы) в рамках настоящего исследования установлены не были; не установлено коррелятивной связи с имеющимися характеристиками больных сифилисом: полом, возрастом, локализацией и выраженностью клинических проявлений.

Таким образом, на основании проведенных исследований было установлено, что у больных сифилисом первичным исследование в иммуно-

блоттинге-IgM имеет клиническую чувствительность на уровне 85,53%, клиническую специфичность - 100% и диагностическую эффективность - 89%.

Первичный гуморальный иммунный ответ у больных сифилисом первичным при участии IgM различной степени выраженности (от «0,3+» до «++++») на антиген TprA выявлялся в 100% случаев, на TrN47 и TrN17 - по 90,79%, а на TrN15 - только в 72,37% случаев.

На начальных этапах развития сифилитической инфекции у больных методом ИБ-IgM показано преобладание выработки антител, направленных преимущественно к одному из 4 изучавшихся антигенов возбудителя сифилиса. Так, максимальную выраженность иммунного ответа у больных сифилисом первичным на антиген TprA наблюдали в 65,79% случаев; в то время как приоритет антителообразования по отношению к другим антигенам отмечали существенно реже: к TrN17 - в 22,37%; к TrN47 - в 9,21% и к TrN15 - в 2,63% случаев.

Полученные данные позволили сформулировать предположение, что на начальном этапе развития инфекции у больных сифилисом формирование иммунного ответа, в подавляющем большинстве случаев, происходит к антигену TprA, как обладающему максимально выраженной иммуногенностью и в достаточной мере представленному в структуре клетки возбудителя. В связи этим содержание антител к TprA в сыворотке крови больных сифилисом первичным превалирует по отношению к содержанию антител, трёх других изучавшихся антигенов *T. pallidum* (TrN15, TrN17 и TrN47). В последующем, по мере развития инфекционного процесса, у больных сифилисом первичным постепенно расширяется спектр гуморального иммунного ответа, присоединяется синтез антител специфичных к антигенам TrN47 и TrN17, при существенном отставании выработки антител против антигена TrN15.

5.2. Определение содержания антител класса М к антигену ТрN37

Для более полной характеристики последовательности и выраженности антителообразования к отдельным антигенам бледной трепонемы у больных сифилисом первичным нами дополнительно были проведены ограниченные по количеству изученных образцов исследования с наборами реагентов для выявления антител класса М к *T. pallidum* методом ИБ: «*recomBlot Treponema IgM*» производства фирмы «Mikrogen® GmbH» (Германия) и «Лайн-Блот-Сифилис-IgM» (по ТУ 9398-118-70423725-2012) производства ЗАО «ЭКОлаб» (Россия).

Дело в том, что в наборе реагентов «*recomBlot Treponema IgM*» по сравнению с наборами реагентов отечественного производства («Лайн-Блот-Сифилис-IgM») исследование осуществляется в отношении не 4, а 5 антигенов возбудителя сифилиса. Дополнительным антигеном, включенным в состав иммуносорбента в наборе «*recomBlot Treponema IgM*», является антиген **ТрN37**, который относят к группе флагеллярных антигенов, характерных для структуры тонофибрилл возбудителя, обеспечивающих его подвижность в среде обитания. В ряде зарубежных научных работ было показано более раннее понижение содержания и полное исчезновение из крови больных сифилисом специфических антител к флагеллярным антигенам после завершения полноценной антибактериальной терапии.

Всего нами были исследованы 19 образцов сыворотки крови больных сифилисом первичным, из числа тех, в которых определялось выраженное содержание антител класса М при исследовании в ИФА_{IgM} и ИБ-IgM.

На основе критериев оценки результатов исследований, представленных в соответствующих инструкциях по применению наборов, наблюдали:

- с набором «*recomBlot Treponema IgM*»:
 - 1 (5,3%) положительный,
 - 3 (15,8%) неопределенных,
 - 15 (78,9%) отрицательных результатов;

- с набором «Лайн-Блот-Сифилис-IgM»:

-- 14 (73,7%) положительных,

-- 5 (26,3%) неопределенных результатов.

Интерпретация результатов исследования в существенной степени зависела как от чувствительности представленных наборов реагентов, так и от критериев оценки полученных данных.

Так, с набором реагентов «Лайн-Блот-Сифилис-IgM» положительным оценивается образец, в котором определяется присутствие не менее двух видов антител с интенсивностью равной или превышающей пороговый уровень «0,5+», в то время как с наборами «*recomBlot Treponema IgM*» - только в отношении четырёх антигенов.

При этом с набором «*recomBlot Treponema IgM*» антитела к антигену TrN15 были выявлены в 3 (15,8%) образцах, к TrN17 - в 7 (36,8%), к TrN37 - в 0 (0%), к TmpA - в 10 (52,6%), к TrN47 - в 14 (73,7%); в то время как с набором «Лайн-Блот-Сифилис-IgM» антитела к TrN15 были определены в 13 (68,4%), к TrN17 - в 17 (89,5%), к TmpA - в 19 (100%), к TrN47 - в 18 (94,8%) случаях (рисунок 15).

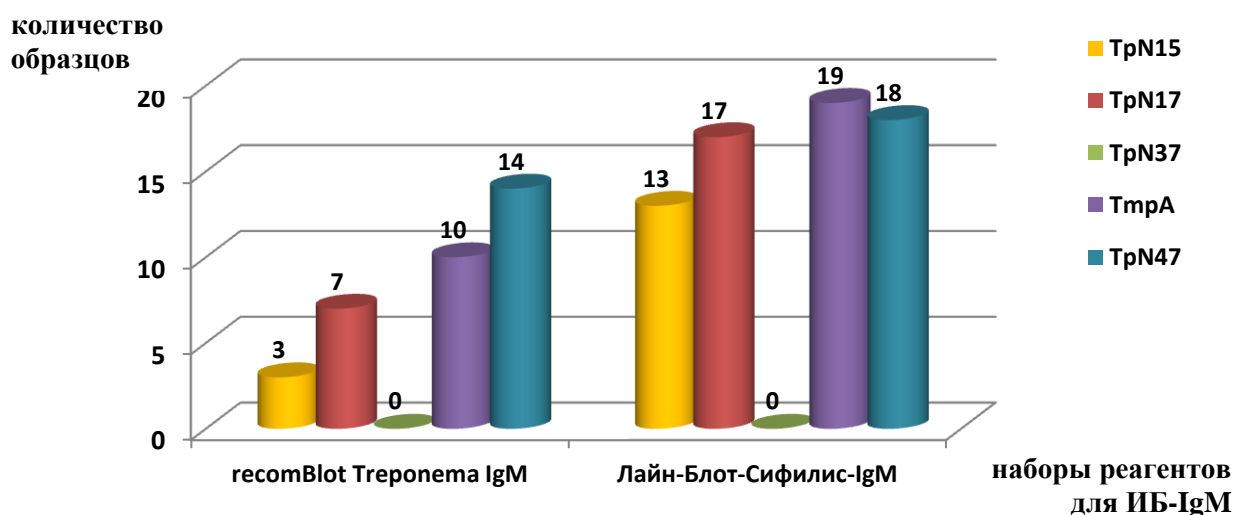


Рисунок 15. Количество сывороток крови больных сифилисом первичным (опытной группы), демонстрировавших содержание специфических IgM к антигенам *T. pallidum* при исследовании в ИБ-IgM с разными наборами реагентов.

Проведенными исследованиями показано, что наиболее часто в образцах крови больных сифилисом первичным при использовании наборов реагентов различного производства («*recomBlot Treponema IgM*» и «Лайн-Блот-Сифилис-IgM») определялись антитела к антигенам:

- TrpA - в 10 (52,6%) и в 19 (100%) и
- TrN47 - в 14(73,7%) и 18 (94,8%) случаях соответственно.

Существенно реже в исследовании выявлялись антитела к антигенам:

- TrN17 - в 7 (36,8%) и в 17 (89,5%) и
- TrN15 - в 3 (15,8%) и в 13 (68,3%) случаях соответственно

Антитела к TrN37 в исследованных образцах обнаружены не были.

Определение и оценка величины показателя клинической чувствительности исследований ИБ-IgM с применением наборов реагентов различного производства показали существенные различия. При исследовании образцов крови больных сифилисом первичным установлена более высокая клиническая чувствительность набора реагентов для линейного иммуноблоттинга «Лайн-Блот-Сифилис-IgM» по сравнению с набором реагентов «*recomBlot Treponema IgM*»: 73,7 и 5,3% соответственно.

Таким образом, при применении наборов реагентов для ИБ-IgM различного производства было подтверждено раннее установленное положение о высокой диагностической значимости определения антител к антигенам TrpA (52,6 - 100%) и TrN47 (73,7 - 94,8%) и несколько меньшая - к антигенам TrN17 (36,8 - 89,5%) и TrN15 (15,8 - 68,3%). Не установлено выраженного гуморального ответа со стороны иммунной системы больных сифилисом первичным на антиген Tr37, что в определённой степени поясняет отсутствие использования этого маркера в наборе реагентов отечественного производства.

5.3. Определение трепонемоспецифических антител класса G (к антигенам TrN15, TrN17, TmpA и TrN47)

В сравнительном аспекте нами было также проведено исследование 76 вышеописанных образцов сывороток крови больных сифилисом первичным в иммуноблоттинге с набором «Лайн-Блот-Сифилис-IgG» (ИБ-IgG), что позволило представить соответствующие обобщающие заключения по результатам определения антител класса G к антигенам *T. pallidum*: 1 (1,31%) - отрицательное, 5 (6,58%) - неопределенных и 70 (92,11%) - положительных (рисунок 16).

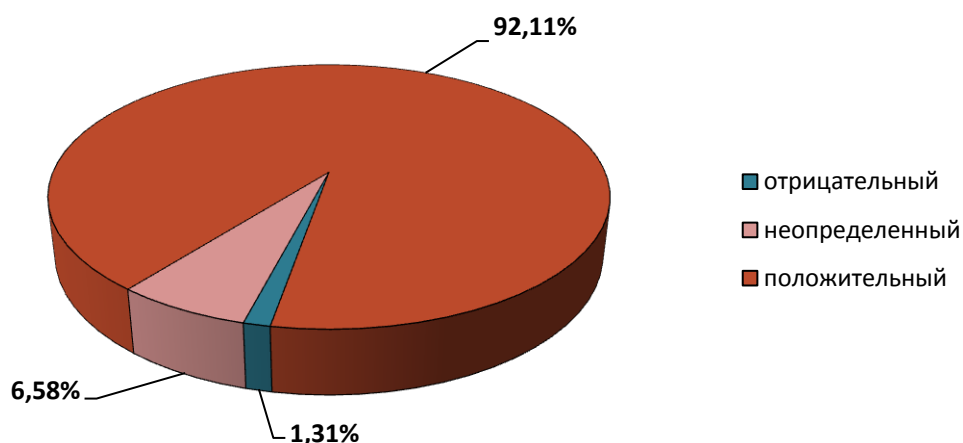


Рисунок 16. Результаты исследования в ИБ-IgG сывороток крови больных первичным сифилисом (в основной группе).

Полученные данные показали более высокую **клиническую чувствительность** исследования при первичном сифилисе методом ИБ-IgG - 92,11% в сравнении с применением ИБ-IgM - 85,53% (рисунки 11 и 16).

Отрицательное заключение было сделано по результатам исследования в ИБ-IgG в отношении 1 образца сыворотки крови, также демонстрировавшего отрицательные результаты в ИФА_{IgM} (КП=0,03) и ИБ-IgM (по отношению к TmpA и TrN15 - по «0,3+»); при этом ИБ-IgG с этим образцом не было выявлено даже следовых значений содержания антител ни к одному из 4-х изучавшихся антигенов бледной трепонемы.

Неопределенные результаты в иммуноблоттинге-IgG наблюдали всего с 5 образцами: 1-й сывороткой, показавшей положительный результат в

ИФА_{IgM} (со средним уровнем антител; КП = 2,75) и отрицательный - в ИБ-IgM (по отношению к TmpA и TrN47 - по «0,3+»), с 4 образцами сыворотки с положительными результатами исследования в ИФА_{IgM} (2 сыворотками со средним содержанием IgM, КП = 4,75 и 5,87 соответственно и 2 - с высоким содержанием IgM, КП = 9,82 и 16,71 соответственно) и ИБ-IgM.

Положительные результаты в ИБ-IgG были получены с 70 образцами, в том числе: с 1 сывороткой крови, показавшей отрицательный результат исследования в ИФА_{IgM} (КП = 0,97) и положительный - в ИБ-IgM, с 7 сыворотками крови, демонстрировавшими в ИФА_{IgM} положительные результаты и неопределенные в ИБ-IgM, и с 62 образцами с положительными результатами исследования как в ИФА_{IgM}, так и в ИБ-IgM.

Положительные заключения о результатах исследования в ИБ-IgG были установлены при одновременном выявлении в образцах антител к 2 антигенам *T. pallidum* на уровне «0,5+» и более в 9 (12,86%) из 70 случаев, с 3 антигенами - в 18 (25,71%) и с 4 антигенами - в 43 (61,43%) случаях.

Группа контроля в этом разделе исследования была представлена также 24 образцами сыворотки крови, полученным от здоровых активных доноров крови; с этими сыворотками по результатам исследования в ИБ-IgG было получено 24 (100%) отрицательных результата.

Результаты исследования в иммуноблоттинге-IgG также были подвергнуты сопоставлению с целью определения приоритетов антителообразования к изучавшимся антигенам возбудителя заболевания (таблица 18).

Максимальное выявление антител класса G было показано в отношении антигена TmpA (76 образцов, 98,68%): в следовых количествах («0,3+») - в 2 (2,63%) образцах, в значимых количествах (от «0,5+» до «++++») - в 73 (96,05%) образцах. Антитела класса G по отношению к TmpA не были определены в 1 образце (1,32%).

Отсутствие IgG по отношению к антигену TrN47 было установлено в 2 (2,63%) образцах и антитела определены в 74 (97,37%) случаях: следовые

количества («0,3+») - с 3 (3,95%) образцами, а значимые (в интервале «0,5+» - «++++») - в 71 (93,42%).

Установлено отсутствие IgG в 8 (10,53%) образцах по отношению к антигенам TrN17 и их наличие в 68 (89,47%) сыворотках. При этом в отношении TrN17 следовые количества антител («0,3+») были определены с 8 (10,53%) образцами и значимые уровни («0,5+» - «++++») - в 60 (78,95%) случаях.

Таблица 18.

**Результаты определения в ИБ-IgG
антител к антигенам *T. pallidum* у больных сифилисом первичным**

Полуколичественные единицы измерения	Количество результатов определения антител к антигенам (абс / %)			
	TrN15	TrN17	TrpA	TrN47
Отсутствие (□)	20 / 26,31%	8 / 10,53%	1 / 1,32%	2 / 2,63%
Выявление в следовых количествах (0,3+)	12 / 15,79%	8 / 10,53%	2 / 2,63%	3 / 3,95%
Всего результатов отрицательных	32 / 42,10%	16 / 21,05%	3 / 3,95%	5 / 6,58%
Выявление в значимых количествах (0,5+)	13 / 17,11%	2 / 2,63%	0 / 0%	7 / 8,22%
Выявление в значимых количествах (1,0+)	12 / 15,79%	13 / 17,11%	4 / 5,26%	10 / 13,15%
Выявление в значимых количествах (2,0+)	12 / 15,79%	17 / 22,37%	21 / 27,63%	24 / 31,58%
Выявление в значимых количествах (3,0+)	7 / 9,21%	9 / 11,84%	19 / 25,00%	16 / 21,05%
Выявление в значимых количествах (4,0+)	0 / 0%	19 / 25,00%	29 / 38,16%	14 / 18,42%
Всего результатов положительных	44 / 57,90%	60 / 78,95%	73 / 96,05%	71 / 93,42%
Всего результатов от 0,3+ по 4+	56 / 73,69%	68 / 89,47%	75 / 98,68%	74 / 97,37%
Всего исследований в группе	76 / 100%	76 / 100%	76 / 100%	76 / 100%

Также как и в случае исследования в ИБ-IgM, при иммуноблоттинге на основе определения специфичных IgG было получено максимальное количество отрицательных результатов при определении антител против TrpN15 - с 20 (26,36%) образцами. Следовые значения IgG («0,3+») были представлены в 12 (15,79%) сыворотках крови, значимые количества («0,5+» - «++++») - в 44 (57,90%) образцах сыворотки крови (рисунок 17).

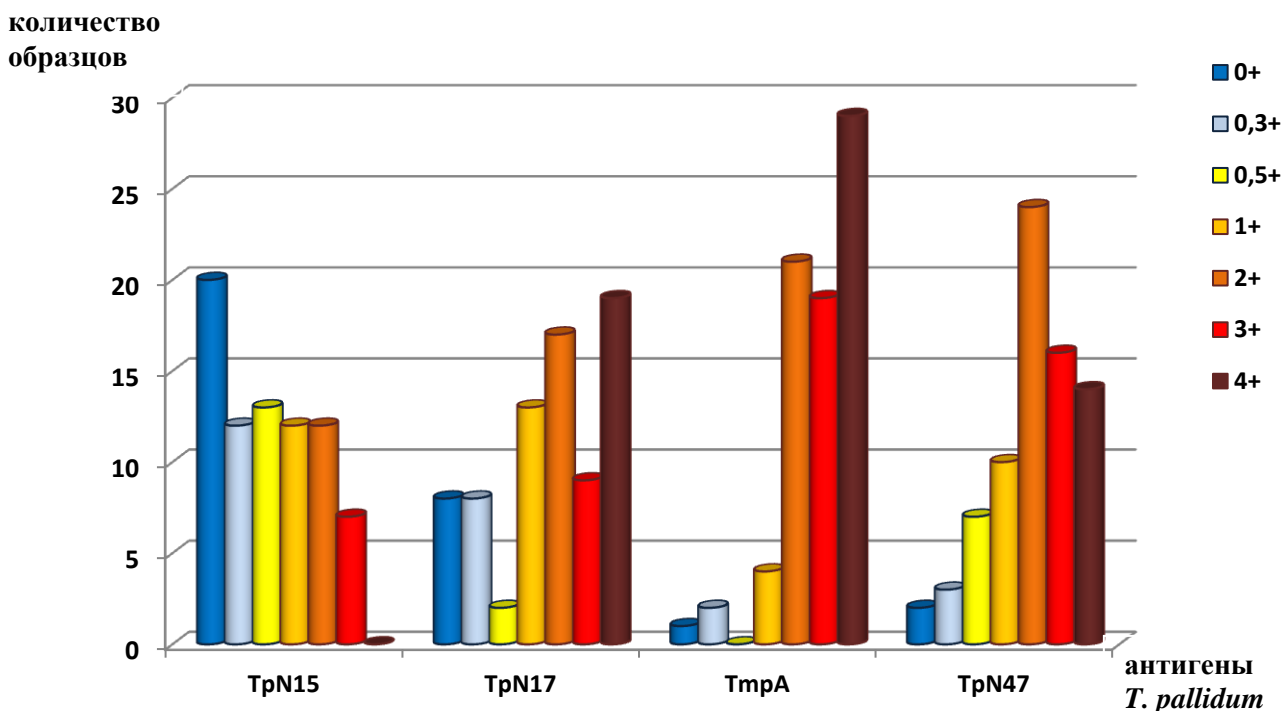


Рисунок 17. Количество сывороток крови, полученных у больных первичным сифилисом (опытной группы), демонстрировавших содержание специфических IgG к отдельным антигенам *T. pallidum* при исследовании в ИБ-IgG.

При анализе результатов постановки исследований в ИБ-IgG также было проведено определение профилей максимального содержания антител, направленных к каждому из изучавшихся антигенов, в исследованных образцах крови больных сифилисом первичным.

Превалирование у пациентов гуморального иммунного ответа изолировано на антиген **TrpN15** по сравнению с другими антигенами, нанесенными на стрипы в составе набора «Лайн-Блот-Сифилис-IgG», не наблюдали ни в одном случае (0%) из 76 обследованных больных сифилисом первич-

НЫМ.

По выраженности образования антител класса G у больных первичным сифилисом было выделено 6 возможных профилей иммунологической реактивности (рисунок 18):

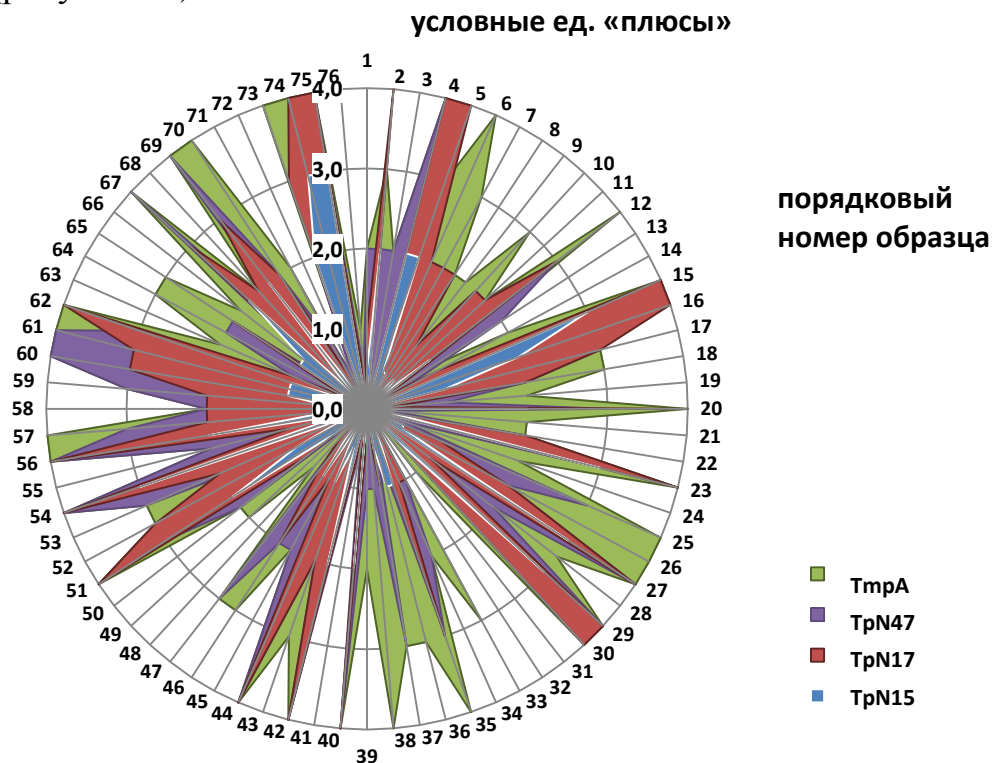


Рисунок 18. Максимальное содержание антител класса G к антигенам *T. pallidum* в сыворотке крови 76 больных первичным сифилисом при исследовании в ИБ-IgG.

- 1) наиболее высокое содержание антител только к антигену **TrN17** на уровне «++++» - в 3 (3,95%) случаях;
- 2) наиболее высокое содержание антител только к антигену **TprA** на уровне «+» / «++++» - в 32 (42,10%) случаях;
- 3) наиболее высокое содержание антител только к антигену **TrN47** на уровне «0,5+» / «++» - в 3 (3,95%) случаях;
- 4) наиболее высокое содержание антител к 2 антигенам одновременно (**TrN17** и **TprA**) на уровне «++» / «++++» - в 10 (13,16%) случаях;
- 5) наиболее высокое содержание антител к 2 антигенам одновременно (**TprA** и **TrN47**) на уровне «++» / «++++» - 14 (18,42%) случаях;
- 6) наиболее высокое содержание антител к 3 антигенам одновременно

(ТрN17, ТmpA и ТрN47) на уровне «++» / «++++» - в 14 (18,42%) случаях.

Средние статистические показатели ($M \pm m$) содержания специфических антител класса G, рассчитанные для следовых и положительных результатов ИБ-IgG в условных единицах «плюсах», составили: для антигена ТрN15 - $0,9 \pm 0,1$; для ТрN17 - $2,0 \pm 0,1$; для ТmpA - $2,9 \pm 0,1$ и для антигена ТрN47 - $2,2 \pm 0,1$.

Полученные в данном разделе величины были сопоставлены со средними статистическими показателями ($M \pm m$) содержания трепонемоспецифических антител класса M, также рассчитанными для следовых и положительных результатов в условных единицах «плюсах» при проведении ИБ-IgM (раздел 5.1); эти величины составили: для антигена ТрN15 - $0,4 \pm 0,0$; для ТрN17 - $1,0 \pm 0,1$; для ТmpA - $1,9 \pm 0,1$ и для антигена ТрN47 - $0,9 \pm 0,1$ (рисунок 19).

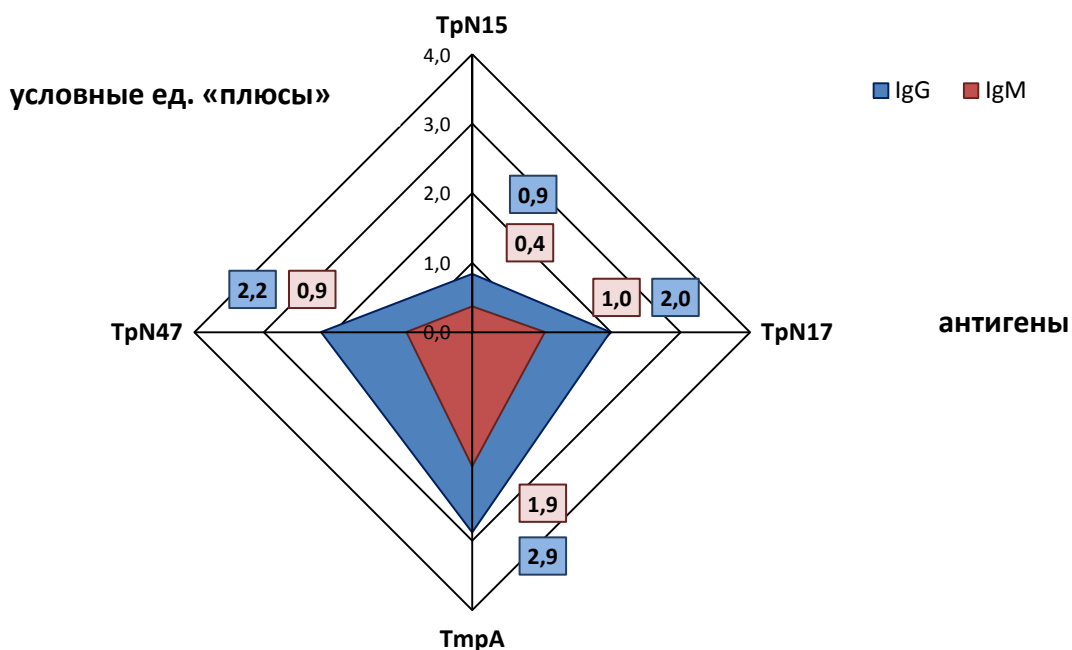


Рисунок 19. Содержание антител классов M и G к антигенам *T. pallidum*, рассчитанные для следовых и положительных результатов ИБ в условных единицах «плюсах».

Как следует из данных диаграмм, представленных на рисунках 19 и 20, у больных на начальных этапах развития сифилитической инфекции

(сифилис первичный) наблюдается высокая степень аналогии в приоритетах (последовательности появления и интенсивности) синтеза антител как класса G, так и класса M, направленных к антигенам, включенным в исследование. В образцах крови больных сифилисом первичным преобладали антитела, специфичные в отношении антигена **TmpA** (зеленый цвет секторов) и сочетаний содержания указанных антител с антителами к антигенам **TrpN47** (фиолетовый цвет секторов) и **TrpN17** (сектора бардовой окраски).

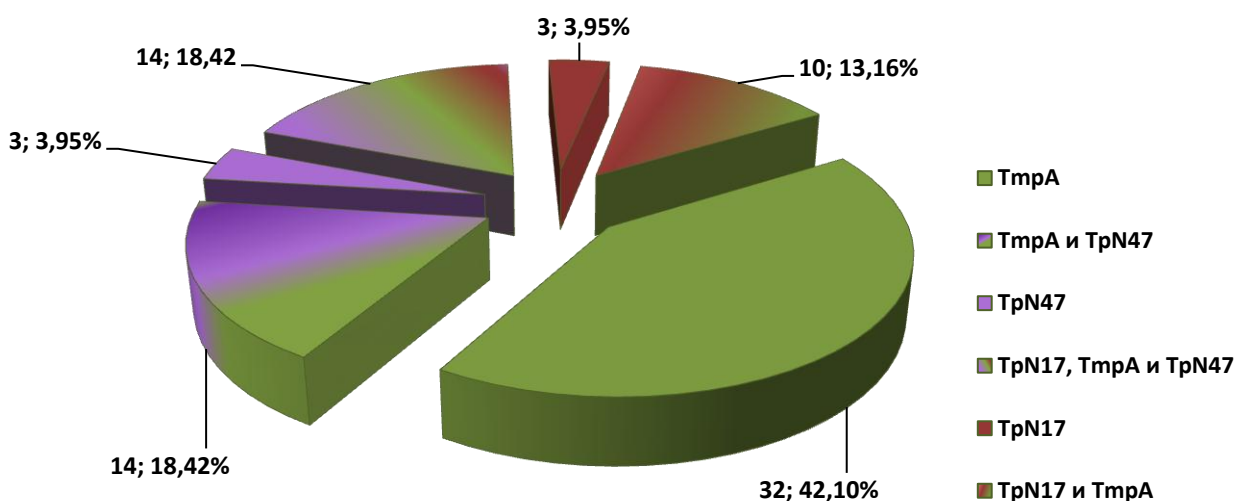


Рисунок 20. Соотношение профилей иммунного ответа у больных сифилисом первичным в зависимости от преобладания синтеза антител класса G к антигенам *T. pallidum*.

При этом интенсивность гуморального ответа с участием антител класса G в нашем исследовании существенно превосходила таковую с участием антител класса M. В ряде случаев наблюдалось нивелирование разницы в количестве выявляемых антител по отношению к разным антигенам *T. pallidum* путем «выравнивания» интенсивности гуморального ответа по максимальной верхней границе («++++»), определяемой методом ИБ.

В то же время высокий уровень антителообразования с участием IgG при сифилисе первичном обеспечивал более высокую клиническую чувствительности исследования методом ИБ-IgG по сравнению с применением ИБ-IgM (92,11 против 85,53% соответственно) (таблица 19).

**Показатели клинической информативности ИБ-IgG и ИБ-IgM
для ранней диагностики сифилиса первичного (по ГОСТ Р 55022.3-2008)**

Показатели	Установленная величина показателя (в %)	
	ИБ-IgG	ИБ-IgM
Клиническая чувствительность – количество положительных результатов, полученных у лиц с установленным диагнозом «сифилис первичный»; в том числе при использовании в составе иммуносорбента белка:	92,11	85,53
ТрN15	57,90	35,53
ТрN17	78,95	71,05
ТмрА	96,05	90,79
ТрN47	93,42	75,00
Клиническая специфичность – количество отрицательных результатов, полученных при обследовании здоровых лиц	100	100
Диагностическая эффективность – количество результатов, адекватно отражающих состояние здоровья при обследовании больных сифилисом и здоровых лиц, в том числе с белком:	94,00	89,00
ТрN15	68,00	51,00
ТрN17	84,00	78,00
ТмрА	97,00	93,00
ТрN47	95,00	81,00
Предсказательная ценность положительных результатов – вероятность наличия заболевания при получении положительного результата в исследовании; в том числе с белком:	100	100
ТрN15	100	100
ТрN17	100	100
ТмрА	100	100
ТрN47	100	100

Предсказательная ценность отрицательных результатов – вероятность отсутствия заболевания при получении отрицательного результата в исследовании; в том числе:	80,00	68,57
TrN15	42,86	32,88
TrN17	60,00	52,17
TprA	88,89	77,42
TrN47	82,76	55,81

Примечание: цветом выделены показатели выше 95%, что соответствует современным требованиями к уровню информативности лабораторных исследований для диагностики сифилиса (Приказ МЗ РФ №87 от 26.01.2001 г.).

Показатели клинической специфичности обеих модификаций исследования методом ИБ для диагностики сифилиса в нашем исследовании были максимальными - по 100%.

Диагностическая эффективность обеих модификаций исследования не достигала необходимого уровня 95%, но при применении ИБ-IgG она была выше и соответствовала 94%, а при ИБ-IgM - только 89%.

Наиболее значимыми, определяющими вектор суммарного заключения исследования в ИБ, являлись результаты исследования с белками TprA (97% - при ИБ-IgG и 93% - при ИБ-IgM) и TrN47 (95% - при ИБ-IgG и 81% - при ИБ-IgM); им несколько уступала эффективность определения антител к белку TrN17 (84% - при ИБ-IgG и 78% - при ИБ-IgM), в то время как определение специфических анти-TrN15 лишь немного превышало 50% (68% при ИБ-IgG и 51% при ИБ-IgM).

Таким образом, проведенное исследование с применением метода иммуноблоттинга (в модификациях с дифференцированным выявлением только IgM или только IgG) позволило изучить последовательность развития и выраженность гуморального ответа иммунной системы заражённого сифилисом человека к отдельным антигенам *T. pallidum* на ранних этапах развития инфекционного процесса:

- впервые были определены и охарактеризованы разные профили первичного гуморального ответа с участием антител класса М, отличающиеся более выраженным синтезом антител только к какому-либо одному антигену *T. pallidum* по сравнению с другими: максимальное содержание антител против антигена TmpA наблюдали в 65,79% случаев (при содержании антител $M \pm m = 1,9 \pm 0,1$ условных единиц «плюсов»), к антигену TrN17 - в 22,37% ($M \pm m = 1,0 \pm 0,1$), к TrN47 - в 9,21% ($M \pm m = 0,9 \pm 0,1$) и к TrN15 - в 2,63% случаев ($M \pm m = 0,4 \pm 0,1$);

- частота определения в сыворотке крови больных первичным сифилисом антител класса М составила: к антигену TmpA - 100% случаев, к TrN47 и TrN17 - по 90,79% и к TrN15 - только 72,37% случаев;

- в подавляющем большинстве случаев при первичном сифилисе гуморальный иммунный ответ с участием антител класса М сочетался с выработкой антител класса G; при этом содержание в крови антител класса G к каждому из 4 изученных антигенов *T. pallidum* более чем в 2 раза превосходило уровни антител класса М;

- охарактеризована частота выявления в сыворотке крови трепонемоспецифических антител класса G: к антигену TmpA - у 98,68% больных ($M \pm m = 2,9 \pm 0,1$), к TrN47 - у 97,37% ($M \pm m = 2,2 \pm 0,1$), к TrN17 - у 89,47% ($M \pm m = 2,0 \pm 0,1$) и к TrN15 - у 73,69% ($M \pm m = 0,8 \pm 0,1$);

- гуморальный ответ с участием антител класса G по отношению к разным антигенам повторяет последовательности, установленные в отношении антител класса М: приоритет иммунного ответа на антиген TmpA наблюдали в 42,10% ($M \pm m = 1,9 \pm 0,1$), на TrN17 - в 3,95% ($M \pm m = 2,0 \pm 0,1$), на TrN47 - в 3,95% ($M \pm m = 2,2 \pm 0,1$), одновременно на TrN17 и TmpA - в 10,16% случаев, одновременно на TmpA и TrN17 - в 18,42% случаев, одновременно на TrN17, TmpA и TrN47 - в 18,42% случаев.

Клиническая чувствительность исследований методом ИБ при диагностике первичного сифилиса составила: при выявлении специфических антител к *T. pallidum* класса М - 85,53%, а при определении антител класса G

- 92,11%. Показана высокая клиническая специфичность обеих модификаций ИБ - по 100%. Более высокая клиническая чувствительность постановок ИБ обуславливает и более высокие показатели диагностической эффективности применения этого метода по отношению к ИБ-IgM (94 и 89% соответственно).

Представленные показатели характеризовали диагностические возможности использования метода иммуноблоттинга в его модификациях с определением антител класса М или G при выявлении различных клинических форм сифилиса.

ГЛАВА 6. РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СРОКОВ ЦИРКУЛЯЦИИ СПЕЦИФИЧЕСКИХ IgM В КРОВИ БОЛЬНЫХ СИФИЛИСОМ ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ

В этом разделе исследования был изучен 341 образец сыворотки крови, полученный от больных ранними формами сифилиса (сифилис первичный - 30, сифилис вторичный - 148 и сифилис скрытый ранний - 163 образца) после окончания специфического лечения, при клинико-серологическом наблюдении над ними с целью оценки излеченности от сифилиса в консультативном отделении ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России.

Обследованная группа пациентов включала 151 (44,29%) мужчину и 190 (55,72%) женщин в возрасте от 29 до 65 лет.

Все пациенты в период 2010-2013 годов получили специфическую антибактериальную терапию по поводу ранних форм сифилиса в соответствии с Методическими рекомендациями, утвержденными Минздравом России (1999), и Клиническими рекомендациями Российского общества дерматовенерологов и косметологов (Кубанова А.А. 2010, 2012а; Федеральные клинические рекомендации ... , 2013). Лечение цефтриаксоном получали 207 пациентов (60,70%) и бензатина бензилпенициллином - 134 пациента (36,07%) (бициллином-1 - 123; 36,70% и ретарпен - 11; 3,23% человек) (рисунок 21).

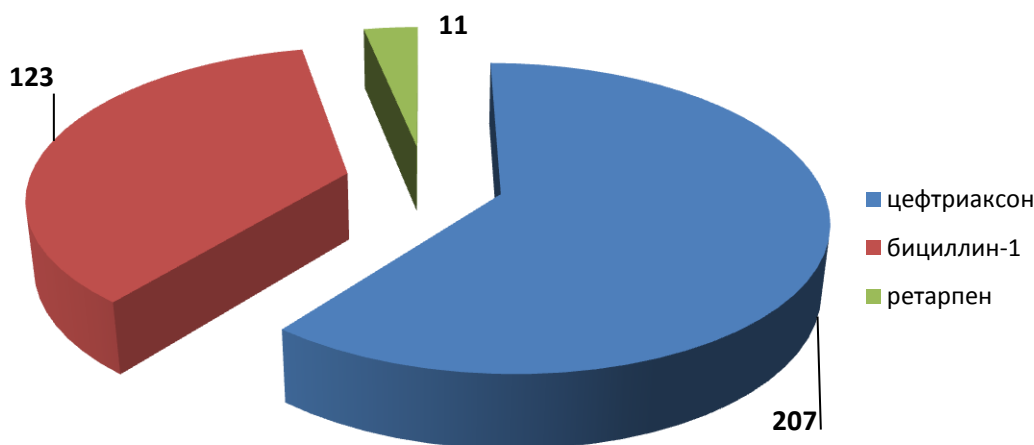


Рисунок 21. Соотношение методов проведенного лечения у пациентов, обследованных в период клинико-серологического наблюдения.

Условием отбора пациентов для включения в настоящее исследование являлось отсутствие в медицинской документации указаний на нарушение режима лечения и проведение им полного курса назначенной терапии.

Образцы крови для исследования были получены в различные сроки наблюдения (от 3 месяцев до 3 лет) (таблица 20).

Таблица 20.

Количество образцов крови, полученных от больных ранними формами сифилиса после окончания специфического лечения

Срок наблюдения после окончания терапии	Количество образцов крови
3 месяца	69
6 месяцев	63
9 месяцев	51
12 месяцев	74
24 месяца	45
36 месяцев	39
Всего	341

С полученными образцами сыворотки крови были выполнены исследования методом ИФА с целью определения в них циркуляции специфических антител класса М к возбудителю заболевания; для постановки ИФА использованы наборы реагентов «ИФА-АНТИ-ЛЮИС-М» (тест-система иммуноферментная для выявления антител класса М к *T. pallidum*) производства ООО «НПО «Диагностические системы» (г. Н. Новгород, Россия).

При исследовании в ИФА-IgM 69 образцов сыворотки крови, полученных от больных сифилисом через 3 месяца после окончания антибактериальной терапии, положительные результаты, свидетельствовавшие о циркуляции у обследованных в крови трепонемоспецифических IgM, наблюдали в 37 (53,62%) случаях, а отрицательные результаты - в 32 (46,38%) случаях.

Аналогичные исследования в ИФА-IgM сывороток крови, полученных

от больных сифилисом через 6, 9, 12 и 24 месяца после окончания лечения, положительные результаты, были получены с 32 (50,79%) из 63 образцов, с 19 (37,25%) из 51, с 14 (18,92%) из 74 и с 6 (17,78%) из 45 образцов соответственно, а отрицательные результаты - с 31 (49,21%), 32 (62,75%), 58 (78,38%) и с 37 (82,22%) образцами сыворотки крови соответственно.

Изучение в ИФА-IgM 39 образцов крови, полученных от больных ранними формами сифилиса через 36 месяцев клинико-серологического наблюдения после лечения, не дало доказательств присутствия в пробах специфических антител к антигенам возбудителя заболевания, то есть положительных результатов получено не было, со всеми 39 (100%) пробами были получены отрицательные результаты теста (рисунок 22).

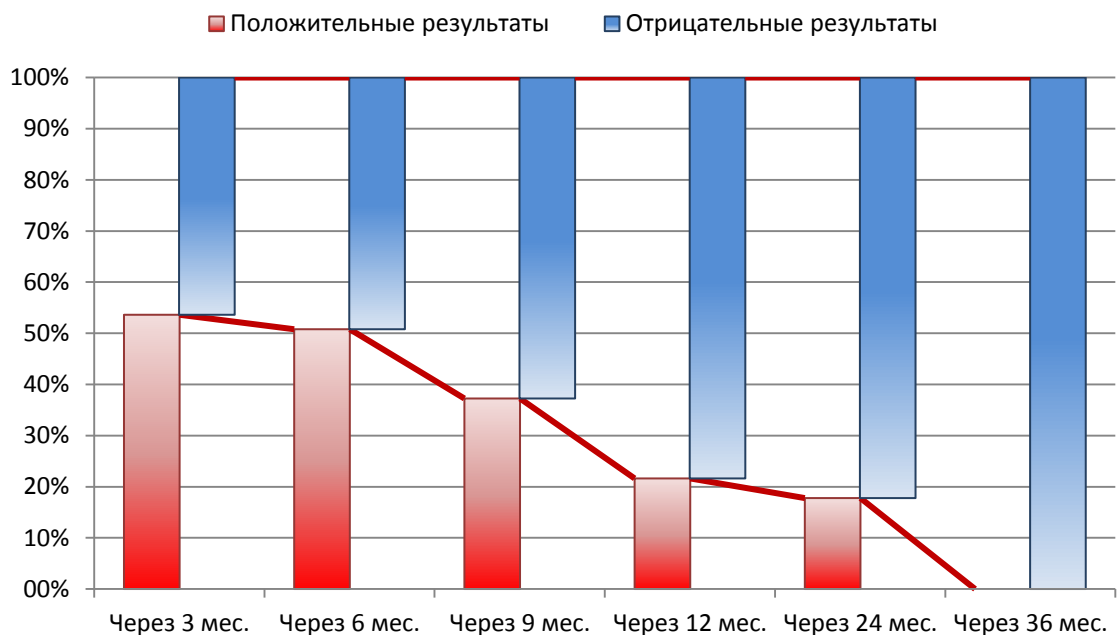


Рисунок 22. Соотношение положительных и отрицательных результатов ИФА-IgM при исследовании образцов крови больных сифилисом в различные сроки после лечения.

Полученные результаты указывали, что продукция антител класса М у больных, получивших лечение по поводу ранних форм сифилиса, прекращается не сразу. При отсутствии антигенной стимуляции количество пациентов, в крови которых определяется содержание антител класса М, по мере увеличения сроков наблюдения постепенно нарастает; и антитела указанного клас-

са перестают выявляться полностью только к сроку 3 года после завершения терапии.

Величина коэффициента позитивности (КП) положительных результатов исследования в ИФА-IgM при исследовании крови больных сифилисом после лечения через 3 месяца составила $7,23 \pm 2,54$, через 6 месяцев - $6,11 \pm 1,56$, через 9 месяцев - $4,92 \pm 1,36$, через 1 год - $2,89 \pm 0,93$ и через 2 года - $1,52 \pm 0,52$ (рисунок 23).

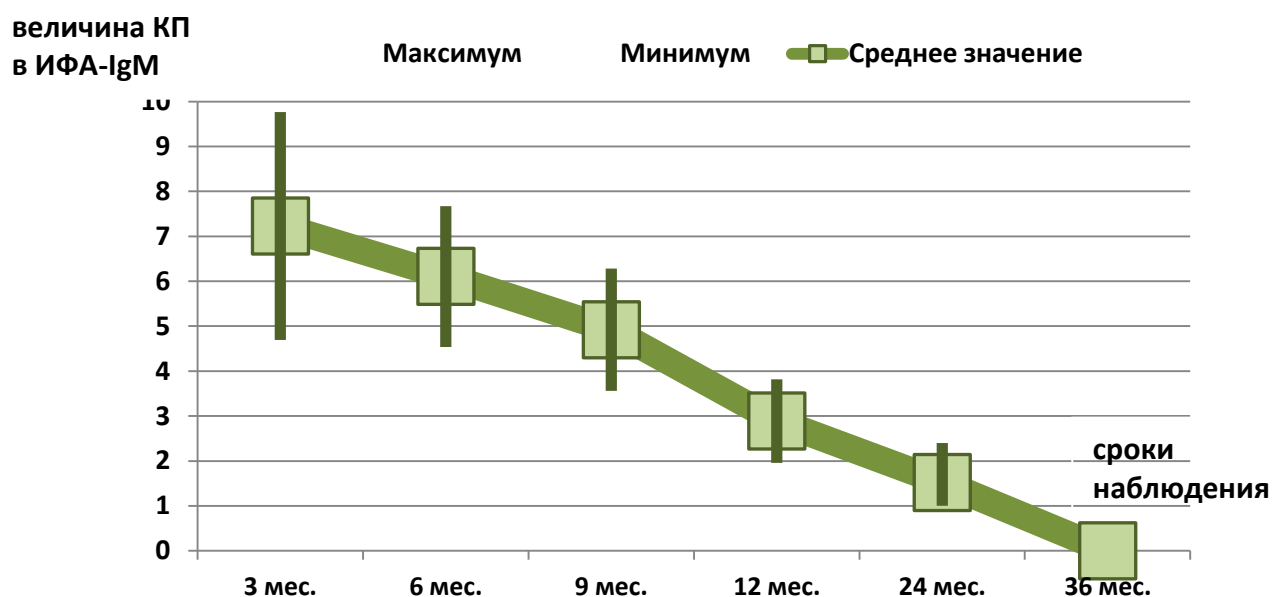


Рисунок 23. Средние значения показателя КП результатов ИФА-IgM при исследовании образцов крови больных сифилисом в различные сроки наблюдения после лечения.

Изменение величины коэффициента позитивности положительных результатов определения трепонемоспецифических антител класса М к антигенам *Treponema pallidum* в период клинико-серологического наблюдения над больными указывало также на постепенный характер понижения концентрации этих антител в сыворотке крови, продолжавшийся вплоть до полной их элиминации. Срок полного исчезновения указанных антител из кровотока пациентов после лечения ранних форм сифилиса в нашем исследовании достигал порядка 36 месяцев.

Нами также был проведен анализ динамики изменения показателей содержания антител класса М к бледной трепонеме в зависимости от метода

проведенной терапии (применявшегося антибактериального препарата).

Характеристика исследованных образцов крови с учетом метода проведенной терапии приведена в таблице 21.

Таблица 21.

Количество образцов крови, полученных от больных ранними формами сифилиса после окончания специфического лечения с учетом метода терапии

Метод терапии (антибактериальный препарат)	Количество образцов, полученных через n месяцев после окончания терапии						Всего
	3	6	9	12	24	36	
цефтриаксон	38	39	36	44	31	19	207
бензатина бензил- пенициллин	31	24	15	30	14	20	134
Всего	69	63	51	74	45	39	341

С образцами крови, полученными от пациентов, леченных цефтриаксоном, в ИФА-IgM через 3, 6, 9, 12, 24 и 36 месяцев после окончания лечения, положительные результаты, были получены с 21 (53,84%) из 38 образцов, с 20 (51,28%) из 39, с 14 (38,89%) из 36, с 8 (18,19%) из 44, с 6 (19,35%) из 31 и с 0 (0%) из 19 образцов соответственно, а отрицательные результаты - с 17 (44,73%), 19 (48,72%), 22 (61,11%), 28 (63,64%), 24 (77,42%) и с 19 (100%) образцами сыворотки крови соответственно.

В подгруппе сывороток крови, представленных от пациентов, получавших препараты на основе бензатина бензилпенициллина (бициллин-1 и ретарпен), положительные результаты в ИФА-IgM через 3, 6, 9, 12, 24 и 36 месяцев после лечения составили 16 (51,61%) из 31 случаев; 12 (50,00%) из 24; 5 (33,33%) из 15; 6 (20,00%) из 30; 2 (14,29%) из 14 и 0 (0%) из 20 случаев соответственно, а отрицательные результаты - 15 (48,39%), 12 (50,00%), 10 (66,67%), 24 (80,00%), 12 (85,71%) и 20 (100%) случаев соответственно.

Сравнительное изучение полученных данных представлено в графическом виде на рисунке 24, оно демонстрирует практическое отсут-

вие различий в сроках циркуляции антител класса М у больных ранними формами сифилиса, получивших лечение цефтриаксоном или бензатина бензилпенициллином.

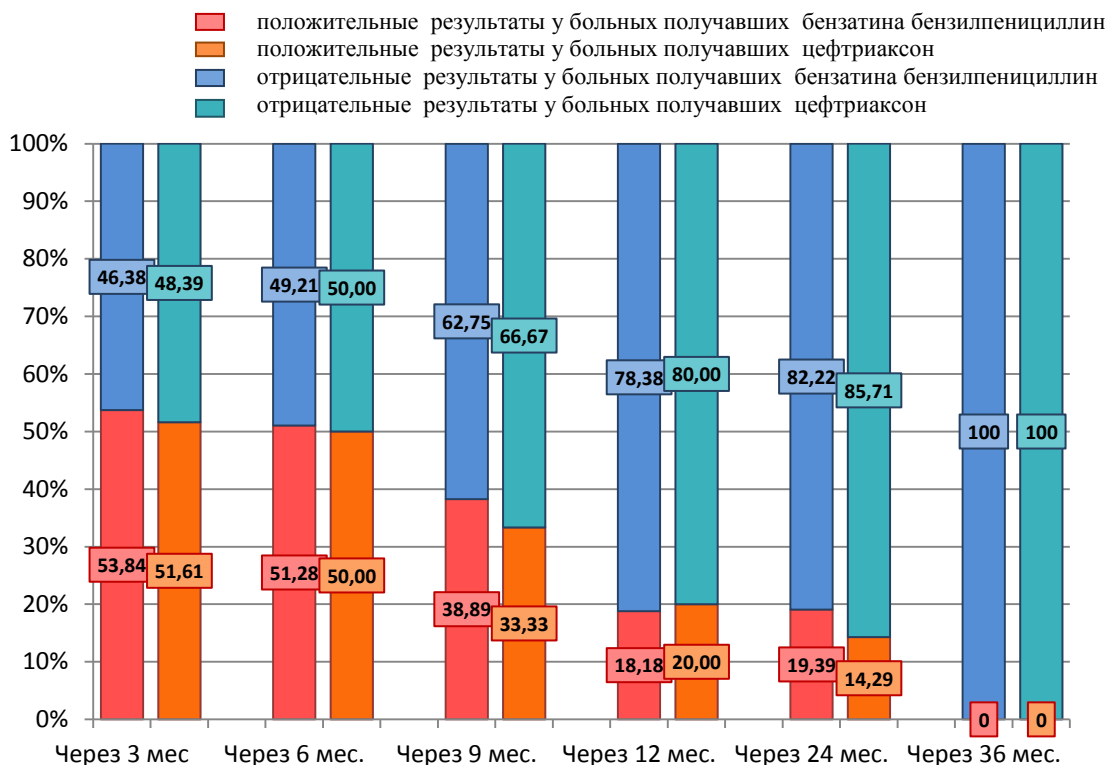


Рисунок 24. Соотношение положительных и отрицательных результатов ИФА-IgM при исследовании образцов крови больных сифилисом в различные сроки после терапии различными антибактериальными препаратами.

Продукция антител класса М у больных после окончания стимуляции гуморального иммунитета антигенами *T. pallidum* прекращается постепенно, этот процесс не зависит от используемого для терапии вида антибактериального препарата, оказывающего эффективное лечебное воздействие.

Таким образом, на основании изучения в ИФА-IgM образцов крови, представленных от больных, получивших полноценное антибактериальное лечение по поводу ранних форм сифилиса (в соответствии с рекомендациями, утвержденными Минздравом России, 1999, и разработанными РОДВК, 2010, 2012) было установлено, что после окончания терапии происходит постепенное угасание интенсивности синтеза антител класса М к антигенам *T. pallidum*; об этом свидетельствовало как уменьшение частоты выявления

указанных антител у пациентов, так и понижение интенсивности аналитического сигнала (КП) в ИФА-IgM по мере увеличения сроков клинко-серологического наблюдения. При этом в ряде случаев антитела класса М к антигенам бледной трепонемы у отдельных больных могут определяться и в сроки наблюдения более 2 лет. В связи с этим лабораторное обследование в ИФА-IgM нами не может быть рекомендовано для включения в комплекс показателей ближайших результатов наблюдения у больных ранними формами сифилиса в качестве критерия оценки эффективности проведенной анти-бактериальной терапии или излеченности.

ГЛАВА 7. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ МЕТОДИК, ОСНОВАННЫХ НА ОПРЕДЕЛЕНИИ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ КЛАССА М, ПРИ ДИАГНОСТИКЕ РАННИХ КЛИНИЧЕСКИХ ФОРМ СИФИЛИСА

В настоящее время при массовых обследованиях населения с целью выявления больных сифилисом наиболее рациональным является такая организация оказания первичной медицинской помощи, при которой клинические осмотры пациентов сопровождаются необходимыми лабораторными исследованиями, среди которых безусловный приоритет имеют методы прямого выявления возбудителя заболевания. При отсутствии возможности получения биологического материала для поиска и идентификации *T. pallidum* наиболее информативными для установления сифилитической инфекции являются иммунохимические исследования с выявлением специфических антител к антигенам этой бактерии и, в первую очередь, иммуноферментные исследования и реакция пассивной гемагглютинации (Приказ Минздрава России №87 от 26.03.2001 г.). Применяется также обследование нетрепонемными тестами с определением антител к кардиолипину.

Как следует из источников научной литературы и данных, полученных в нашей работе при опросе клинико-диагностических лабораторий медицинских организаций дерматовенерологического профиля субъектов Российской Федерации (глава 3) наиболее часто используемым при обследовании на сифилис методом иммунохимического исследования (из числа тестов, использующих трепонемные антигены) является иммуноферментный анализ (в 2012 году доля исследований в ИФА составила 23,08% всех тестов для диагностики сифилиса).

Это обусловлено широким внедрением в практическое здравоохранение указанного метода исследования, позволяющего с разными наборами реагентов, но в рамках одной медицинской технологии проводить определение в образцах биологического материала специфических маркеров самых разных заболеваний, патологических или физиологических состояний, а

также наличием в лабораториях медицинских организаций необходимого исследовательского и вспомогательного оборудования для выполнения ИФА. К числу положительных характеристик ИФА, безусловно, следует отнести: высокую информативность, воспроизводимость и стандартизуемость метода исследования, наличие автоматизации целого ряда этапов проведения исследования, наличие компьютерных программ для спектрофотометрии изменения окраски в реакционных лунках и математической обработки полученных данных, промышленный выпуск широкого спектра наборов реагентов и контрольных материалов для этого метода, разработку методик проведения внутрिलाбораторного и внешнего контроля качества ИФА.

Однако применение метода ИФА имеет ограничения, обусловленные особенностями конструкции используемых наборов реагентов. Возможности технологии позволяют в рамках одной постановки определять в исследуемой пробе сумму антител разных классов (IgM, IgG, IgA) сразу к нескольким наиболее специфичным для возбудителя антигенным детерминантам, входящим в состав иммуносорбента.

В то же время в целом ряде случаев возникает необходимость в дифференцированном определении антител класса М, так как они ранее других появляются при развитии иммунного ответа в рамках инфекционного процесса. Как было показано в нашей работе (глава 4, раздел 4.3.), клиническая информативность исследований в ИФА_{IgM} при диагностике ранних клинических форм сифилиса высокая; она максимальная при сифилисе первичном: КЧ - 97,47%, КС - 97,39%, ДЭ - 97,41%, ПЦ⁺ - 95,06% и ПЦ⁻ - 98,68%, и несколько ниже при сифилисе вторичном: КЧ - 93,66%, КС - 97,39%, ДЭ - 95,25%, ПЦ⁺ - 97,96% и ПЦ⁻ - 91,98%. Это обстоятельство позволило нам рекомендовать к более широкому использованию модификацию ИФА_{IgM}, которая по данным нашего анкетного опроса среди всей массы исследований, выполненных методом ИФА в 2012 году, составила всего 5,47% (глава 3). Эту модификацию ИФА нецелесообразно применять для диагностики сифилиса скрытого раннего ввиду низкой клинической информативности: КЧ -

62,28%, КС - 97,39%, ДЭ - 82,40%, ПЦ⁺ - 94,67% и ПЦ⁻ - 77,60%.

Как и любой метод лабораторного исследования ИФА не является абсолютно специфичным, поэтому исследователями разрабатываются, а практическим здравоохранением используются и другие иммунохимические исследования.

Одним из наиболее зарекомендовавших себя, причисляемых к «золотому стандарту» иммунохимического исследования при сифилисе, является реакция непрямой иммунофлюоресценции. Помимо того, что иммуносорбентом в этом исследовании является фиксированная на стекле цельная клетка бледной трепонемы, со всем комплексом присущих ей антигенов, исследователями разработаны и внедрены в практику более специфичные модификации РИФ (РИФ_{abc} и РИФ₂₀₀), которые обладают высокой клинической информативностью.

Однако, модификации РИФ, до последнего времени широко используемые практическим здравоохранением (РИФ_{abc} и РИФ₂₀₀), позволят определять в биологических пробах пациентов сумму антител разных классов, среди которых IgG занимают преобладающее значение. А модификации РИФ, основанные на определении в биологических образцах антител только класса М, для учреждений практического здравоохранения были не разработаны и при диагностике сифилиса у пациентов широко не применялись.

В нашей работе проведена оценка клинической информативности модификации РИФ_{abc}-IgM на основе набора реагентов для этого метода, разработанного и произведенного российскими производителями медицинских изделий («Антипаллидум-Флюороген-IgM», диагностикум для выявления антител класса М к *Treponema pallidum* в реакции иммунофлюоресценции» по ТУ 9398-128-70423725-2011; РУ № РЗН 2013/247 от 28.02.2013 г.; производства ЗАО «ЭКОлаб», Россия).

Нами было установлено (глава 4, раздел 4.4.), что показатели клинической информативности исследований в РИФ_{abc}-IgM при диагностике раннего сифилиса также высоки; максимальные при сифилисе первичном: КЧ -

95,89%, КС - 86,30%, ДЭ - 91,10%, ПЦ⁺ - 87,50% и ПЦ⁻ - 95,45%, и несколько ниже при сифилисе вторичном: КЧ - 89,50%, КС - 86,30%, ДЭ - 88,64%, ПЦ⁺ - 94,71% и ПЦ⁻ - 75,00%. Клиническая информативность РИФ-IgM при диагностике сифилиса скрытого недостаточно высокая: КЧ - 53,93-26,09%, КС - 97,39%, ДЭ - 68,52-71,88%, ПЦ⁺ - 82,76-37,50% и ПЦ⁻ - 60,58-78,75%, что ограничивает целесообразность его применения при этих формах.

Полученные нами результаты позволили рекомендовать модификацию РИФ_{abc}-IgM к более широкому внедрению в практику здравоохранения при диагностике сифилиса, тем более, что по данным 2012 года исследования подобного вида среди всех постановок РИФ в медицинских дерматовенерологических организациях субъектов Российской Федерации составила всего 1,82% (глава 3), а в Государственном реестре медицинских изделий и организаций, осуществляющих производство и изготовление медицинских изделий (Росздравнадзор. http://www.roszdravnadzor.ru/national_foreign_medprod/search_medproduct) отсутствовали сведения о регистрации в России наборов реагентов, необходимых для проведения исследования в РИФ_{abc}-IgM.

Относительно новая технология дифференцированного определения трепонемоспецифических антител к разным рекомбинантным антигенам *T. pallidum* - иммуноблоттинг в настоящее время получила признание в России и успешно применяется при диагностике сифилиса. При этом базовой методикой является определение трепонемоспецифических IgG; а модификация ИБ-IgM была разработана российскими производителями медицинских изделий относительно недавно, она была изучена в нашем исследовании. Результаты проведенной нами работы позволили рассчитать клиническую информативность исследований в модификации ИБ-IgM на основе набора реагентов для этого метода исследования российского производства.

Нами было установлено (глава 5, раздел 5.3.), что показатели информативности исследований в ИБ-IgM при диагностике сифилиса первичного достаточно высоки: КЧ - 85,53%, КС - 100%, ДЭ - 89,00%, ПЦ⁺ - 100% и ПЦ⁻ - 68,57%, и по ряду позиций не уступают показателям применения базово-

вой модификации ИБ-IgG: КЧ - 91,11%, КС - 100%, ДЭ - 94,00%, ПЦ⁺ - 100% и ПЦ - 80,00%. Полученные результаты также позволили рекомендовать модификацию ИБ-IgM к широкому применению в практике здравоохранения при диагностике ранних форм сифилиса - сифилиса первичного; тем более, что по полученным в ходе проведенного нами анкетного опроса, в 2012 году исследования в модификации ИБ-IgM среди всех постановок ИБ составила довольно существенную долю - 33,22% (глава 3), что свидетельствовало о практической потребности в этом виде лабораторного исследования при обследовании пациентов с целью диагностики сифилиса.

Как следует из материалов обсуждения результатов, полученных в данном исследовании, представленных нами выше, для практического использования при обследовании больных с целью диагностики ранних клинических форм сифилиса были рекомендованы модификации трех медицинских технологий, основанных на выявлении в крови обследуемых пациентов трепонемоспецифических антител класса М: ИФА_{IgM}, РИФ_{фбс}-IgM и ИБ-IgM.

Но какова последовательность использования этих лабораторных методик при обследовании пациента? Каковы особые показания к назначению каждого метода? Имеются ли приоритеты или предпочтения по отношению к результатам, полученным разными изучавшимися нами методиками, особенно в случаях значимого расхождении полученных лабораторных заключений при диагностике ранних клинических форм сифилиса у пациентов?

На основании полученных нами показателей клинической информативности каждой из изучавшихся методик лабораторного определения трепонемоспецифических IgM, с учетом трудоёмкости и себестоимости проведения каждого вида лабораторного исследования нами был разработан порядок обследования пациентов с целью диагностики раннего сифилиса на основе лабораторных методик с определением специфических антител класса М.

Порядок обследования пациентов для диагностики раннего сифилиса с применением лабораторных методик для определения трепонемоспецифических антител класса М

1. Обследованию подлежат пациенты, у которых имеется необходимость в лабораторном обследовании с целью выявления ранних клинических форм сифилиса (в первую очередь сифилиса первичного и вторичного):

- предъявляющие жалобы на наличие на коже или видимых слизистых оболочках клинических проявлений, характерных для ранних форм сифилитической инфекции (эрозии и язвы, а также розеолы и папулы);

- без клинических проявлений сифилиса на коже и видимых слизистых оболочках, но указывающие на незащищённый половой акт с больным заразной формой сифилиса (в пределах 2-х последних месяцев до обращения - средняя длительность инкубационного периода);

- не имеющие на момент обследования клинических проявлений сифилиса на коже и видимых слизистых оболочках, но указывающие на их наличие в анамнезе (в пределах 2-х последних лет - средняя длительность раннего сифилиса).

2. Рекомендуются клиническое лабораторное обследование пациентов с целью прямого выявления возбудителя заболевания *T. pallidum* (изучение биоматериала методами микроскопии в тёмном поле зрения и/или в полимеразной цепной реакции), а также определение в крови специфических антител к антигенам *T. pallidum* (методами ИФА_{IgM} и/или РИФ_{abc-IgM}).

3. При выборе метода иммунохимического исследования крови (ИФА_{IgM} и/или РИФ_{abc-IgM}) врачи дерматовенерологии и врачи клинической лабораторной диагностики учитывают величину показателей клинической информативности предлагаемых лабораторных методов, рассчитанные в соответствии с требованиями по ГОСТ Р 55022.3-2008 (таблица 22).

4. Тактика ведения пациента по результатам проведения иммунохимического исследования:

Клиническая информативность современных иммунохимических исследований (ИФА_{IgM} и РИФ_{abc-IgM}), основанных на определении в крови человека содержания IgM к антигенам *Treponema pallidum*

Предполагаемый диагноз и метод исследования	Величина показателя клинической информативности лабораторного метода (в %):				
	КЧ*	КС	ДЭ	ПЦ ⁺	ПЦ ⁻
Сифилис первичный					
ИФА _{IgM}	97,47**	97,39	97,41	95,06	98,68
РИФ _{abc-IgM}	95,89	86,30	91,10	87,50	95,45
Сифилис вторичный					
ИФА _{IgM}	93,66	97,39	95,25	97,96	91,98
РИФ _{abc-IgM}	89,50	86,30	88,64	94,71	75,00
Сифилис скрытый ранний					
ИФА _{IgM}	62,28	97,39	82,40	94,67	77,60
РИФ _{abc-IgM}	53,93	86,30	68,52	82,76	60,58

Примечание:

* Показатели клинической информативности:

КЧ - клиническая чувствительность, КС - клиническая специфичность, ДЭ - диагностическая эффективность, ПЦ⁺ - предсказательная ценность положительных результатов и ПЦ⁻ - предсказательная ценность отрицательных результатов;

** выделение цветом соответствует требованиям уровня информативности в соответствии с Методическим рекомендациям «Постановка отборочных и диагностических тестов на сифилис» (Приказ Минздрава России № 87 от 26.03.2001 г., приложение №1).

4-а. - получение **отрицательного(ых) результата(ов)** иммунохимического(их) исследования(й) свидетельствует об отсутствии трепонемоспецифических антител класса М в образце крови пациента и позволяет врачу клинической лабораторной диагностики сделать обобщающее заключение о том, что **«серологические признаки сифилиса не обнаружены»**.

Врач-дерматовенеролог по результатам клинического лабораторного обследования пациента:

- по эпидемическим показаниям (наличие в анамнезе незащищенного полового контакта с больным сифилисом, с учетом длительности инкубаци-

онного периода заболевания) может рекомендовать проведение превентивного лечения, продолжить клинико-серологическое наблюдение пациента и назначить повторное иммунохимическое исследование через 7-10 дней (приоритет имеет исследование в РИФ_{abc}-IgM, так как при близких по величине показателях клинической чувствительности двух используемых методов, при его проведении определяется комплекс антител ко всем иммуногенным детерминантам возбудителя заболевания, в то время как в ИФА_{IgM} - только к тем рекомбинантным антигенам, являющимся аналогами антигенов *T. pallidum*, которые включены в иммуносорбент);

- при отсутствии клинических и анамнестических указаний на наличие сифилиса - закончить клинико-серологическое наблюдение.

4-б. - получение **положительного(ых) результата(ов)** исследования образца крови в иммунохимическом исследовании является свидетельством присутствия в кровотоке пациента трепонемоспецифических антител класса М и позволяет врачу клинической лабораторной диагностики сделать заключение о том, что **«установлен положительный результат серологического исследования на сифилис: трепонемоспецифические IgM выявлены»**.

Врач-дерматовенеролог по результатам обследования устанавливает клинический диагноз и назначает пациенту лечение.

4-в. - получение **сомнительного (неопределенного) результата** или **дискордантных результатов** в двух примененных методах исследования является основанием для проведения дополнительного или более углубленного обследования пациента с целью установления клинического диагноза. Врач клинической лабораторной диагностики выдает заключения о результатах исследования, полученных каждым методом соответственно, а в примечании может рекомендовать повторное исследование с новым образцом, полученным от пациента через 7-10 дней, или проведение дополнительного исследования методом иммуноблоттинга с определением антител класса М, что может позволить определить причины получения дискордантных результатов в ИФА_{IgM} и РИФ_{abc}-IgM.

Врач-дерматовенеролог по результатам клинического и лабораторного обследования:

- устанавливает клинический диагноз и назначает пациенту лечение;
- выбирает тактику клинико-серологического наблюдения для установления диагноза, назначает дополнительное исследование крови, в том числе в ИБ-IgM (с учетом показателей клинической информативности метода по ГОСТ Р 55022.3-2008) (таблица 23).

Таблица 23.

Клиническая информативность исследований в ИБ-IgM, основанном на определении в крови человека содержания IgM к антигенам *Treponema pallidum*

Предполагаемый диагноз и метод исследования	Величина показателя клинической информативности лабораторного метода (в %):				
	КЧ*	КС	ДЭ	ПЦ ⁺	ПЦ ⁻
Сифилис первичный					
ИБ-IgM	85,53	100	89,00	100	68,57

Примечание:

* Показатели клинической информативности:

КЧ - клиническая чувствительность, КС - клиническая специфичность, ДЭ - диагностическая эффективность, ПЦ⁺ - предсказательная ценность положительных результатов и ПЦ⁻ - предсказательная ценность отрицательных результатов;

** выделение цветом соответствует требованиям уровня информативности в соответствии с Методическим рекомендациям «Постановка отборочных и диагностических тестов на сифилис» (Приказ Минздрава России № 87 от 26.03.2001 г., приложение №1).

5. Интерпретация результатов дополнительного углублённого обследования крови пациента в иммуноблоттинге-IgM для диагностики сифилиса:

5-а. получение **отрицательного результата** исследования в ИБ-IgM свидетельствует об отсутствии трепонемоспецифических антител класса М в образце крови пациента и позволяет врачу клинической лабораторной диагностики сделать заключение о том, что ранее полученные положительные результаты в одном из иммунохимических исследований для диагностики

сифилиса являются «**ложноположительными**».

Врач-дерматовенеролог по результатам клинического и лабораторного обследования пациента устанавливает клинический диагноз и назначает по показаниям дополнительное клинико-серологическое наблюдение.

5-б. - получение **положительного результата** исследования образца крови пациента в ИБ-IgM является свидетельством присутствия в кровотоке пациента трепонемоспецифических антител класса М не менее чем к двум антигенам возбудителя заболевания, что позволяет врачу клинической лабораторной диагностики сделать заключение о том, что «**установлен положительный результат исследования в ИБ-IgM на сифилис**».

Врач-дерматовенеролог по результатам клинического и лабораторного обследования пациента устанавливает клинический диагноз и назначает необходимое лечение.

5-в. - получение **неопределенного результата** в ИБ-IgM является свидетельством определения иммунных антител в крови в значимых количествах только к одному из рекомбинантных антигенов *Treponema pallidum*, нанесенных на иммуносорбент. Врач клинической лабораторной диагностики выдает результаты исследования с каждым антигеном и делает обобщающее заключение о том, что «**установлен неопределенный результат исследования в ИБ-IgM для диагностики сифилиса**».

6. Врач-дерматовенеролог по результатам комплекса данных клинического и лабораторного обследования пациента устанавливает клинический диагноз.

Оценивая результаты исследования в ИБ-IgM, врач может оценить возможность развития у пациента на ранних этапах развития сифилитической инфекции (сифилис первичный) четырех различных профилей гуморального ответа иммунной системы (иммунологической реактивности), каждый из которых характеризуется преобладанием антителогенеза только к одному из антигенов *T. pallidum*, входящих в состав иммуносорбента, с учетом частоты встречаемости каждого из вариантов:

- в 65,79% случаев наблюдается максимально выраженный гуморальный ответ на антиген **TprA**;
- в 22,37% случаев - иммунный ответ с преобладанием содержания антител против антигена **TpN17**;
- в 9,21% случаев - преобладание антителообразования к **TpN47** по сравнению с другими антигенами;
- в 2,63% случаев наблюдается профиль преимущественного иммунного ответа **TpN15**.

7. Дополнительное углублённое обследование крови пациентов в ИБ-IgM для диагностики ранних форм сифилиса также может быть рекомендовано в случаях обследования с целью диагностики:

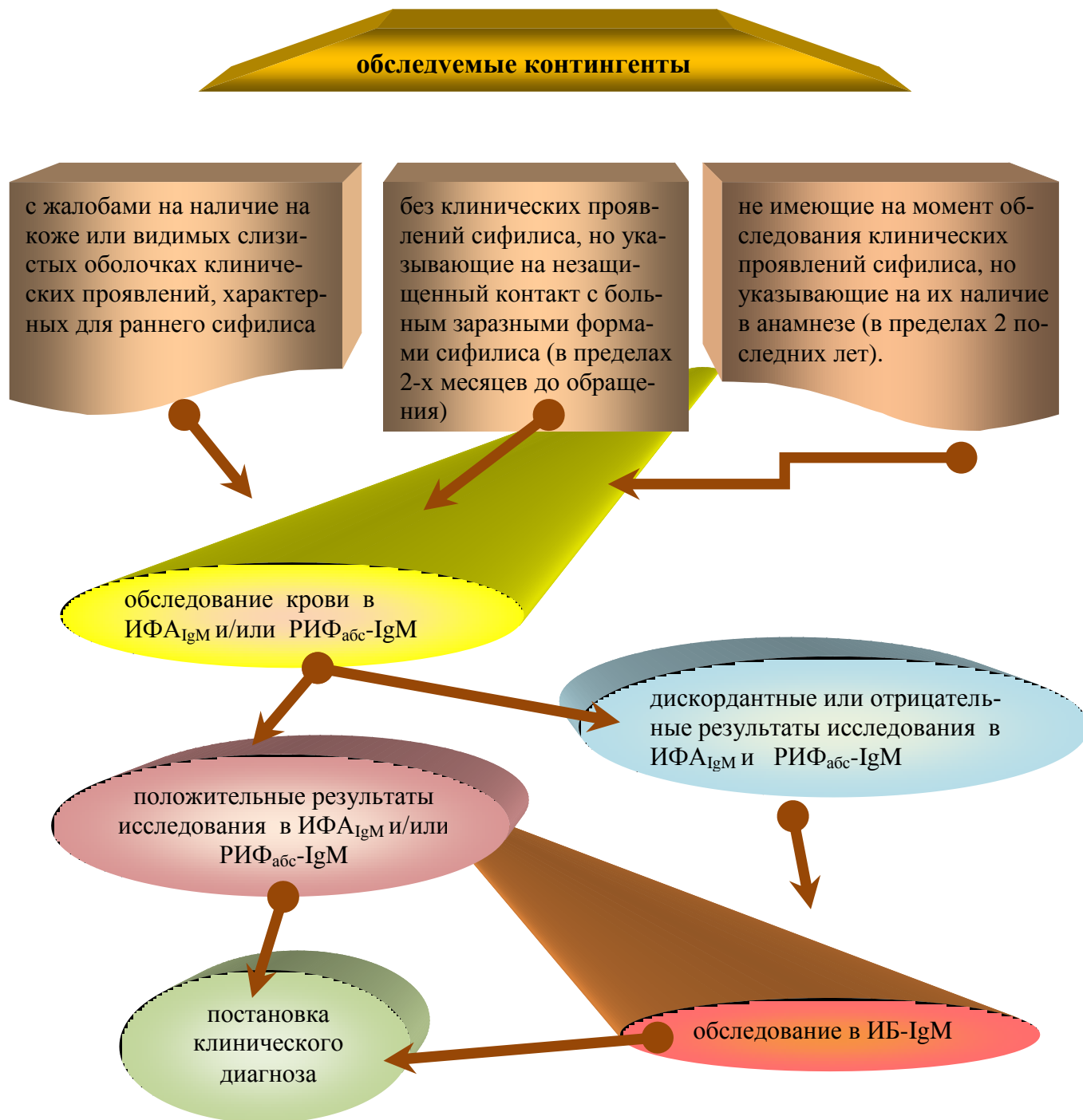
- раннего врождённого сифилиса;
- реинфекции.

Показания и диагностическая информативность исследований в ИБ-IgM при диагностике указанных клинических форм сифилиса должны быть дополнительно определены на основании проведенных клинических испытаний.

Таким образом, изучение клинического применения методик лабораторного исследования с определением специфических IgM для диагностики сифилиса на примере наборов реагентов российского производства позволило на основании показателей клинической информативности указанных методик и особенностей развития гуморального иммунитета у больных на начальных этапах развития сифилитической инфекции разработать Порядок применения этих методов при обследовании населения с целью диагностики ранних клинических форм сифилиса (сифилиса первичного, вторичного и скрытого раннего) (рис. 25).

Разработанный Порядок обследования предназначен для использования при оказании специализированной медицинской помощи дерматовенерологического профиля, так как основан на применении диагностических специфических тестов (ИФА_{IgM}, РИФ_{абс-IgM} и ИБ-IgM).

**Схема Порядка применения лабораторных методик,
основанных на определении специфических IgM,
при диагностике ранних клинических форм сифилиса**



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сифилис является антропонозной бактериальной инфекцией, вызываемой бледной трепонемой, *Treponema pallidum*. Для микроорганизма характерен не высокий уровень метаболизма, что обуславливает длительность цикла его развития: период времени от одного деления микроорганизма до последующего занимает в среднем около 33-34 часов (М.П. Фришман и др. 1984; Р.Р. Уилкоккс, 1981). Указанное обстоятельство находит своё отражение в длительном течении инкубационного периода (в среднем 3-4 недели) и медленном и постепенном развитии клинических признаков заболевания.

Развитие инфекционных процессов бактериальной природы у человека в подавляющем большинстве случаев сопровождается комплексом ответных иммунных реакций макроорганизма на наиболее выраженные антигены возбудителя заболевания. Одними из первых в крови больных сифилисом появляются специфические антитела – иммуноглобулины класса М, а затем к ним присоединяются иммуноглобулины класса G и A; в организме больного наблюдается постепенное замещение синтеза более крупных молекул IgM на синтез более мелких и мобильных молекул IgG и IgA. Указанные закономерности изучены и в настоящее время широко используются в практическом здравоохранении при обследовании населения с целью первичного выявления больных сифилисом или для дифференциальной диагностики и установления клинического диагноза.

К числу современных лабораторных иммунохимических методов исследования, применяемых для диагностики сифилиса, относят иммуноферментный анализ (ИФА), реакцию непрямой иммунофлюоресценции (РИФ) и иммуноблоттинг (ИБ). С использованием этих методов при постановке диагноза у больных сифилисом в крови осуществляют определение суммарного пула специфических антител к антигенам возбудителя *T. pallidum* (IgM+IgG+IgA) или же антител класса G, так как видоспецифические конъюгаты к ним технологически были разработаны первыми.

В последующие годы были получены моноклональные антитела к

тяжелой μ -цепи в составе IgM, что дало возможность сконструировать и осуществлять промышленное производство диагностических наборов реагентов для ИФА_{IgM}. В то же время необходимые наборы реагентов для определения трепонемоспецифических Ig M современными методами, такими как РИФ и ИБ, которые можно было бы использовать для ранней диагностики сифилиса, в России не выпускались.

Разработка технологий исследования и последующее проведение медицинских испытаний с целью регистрации в Российской Федерации наборов реагентов для РИФ_{abc}-IgM и ИБ-IgM отечественными производителями медицинских изделий (ЗАО «ЭКОлаб», г. Электрогорск, Московская обл., Россия) дали возможность нам осуществить планирование и выполнение данного научного исследования, целью которого явилось совершенствование ранней диагностики сифилиса с использованием медицинских технологий, основанных на определении специфических IgM к антигенам *T. pallidum*, и осуществление оценки их клинической информативности при разных клинических формах заболевания.

I. На начальном этапе нашего исследования нами была проведен опрос врачей клинической лабораторной диагностики и врачей дерматовенерологов специализированных медицинских организаций дерматовенерологического профиля субъектов Российской Федерации, в которых проводится обследование и лечение больных ранними формами сифилитической инфекции в Российской Федерации. Для проведения опроса была разработана анкета, содержащая вопросы о видах лабораторных исследований, которые врачи дерматовенерологии применяют при обследовании пациентов с целью своевременной диагностики ранних клинических форм сифилиса, а также количестве всех видов иммунохимических исследований, которые были выполнены в иммунологических (серологических) лабораториях соответствующих медицинских организаций в течение календарного (2012) года.

На наше обращение были получены заполненные анкеты от 60 (72,3%) из существовавших на момент проведения работы 83 медицинских органи-

заций дерматовенерологического профиля субъектов всех 8 федеральных округов Российской Федерации. Из 7 федеральных округов в анкетировании приняли участие от 54,5 до 85,7% соответствующих профилю обследования специализированных медицинских организаций и из 1 федерального округа (ЮФО) - только от 33,3%, что, тем не менее, позволило нам считать, что полученные при этом сведения могли характеризовать в полной мере состояние проблемы как в России в целом, так и по большинству федеральных округов.

В результате обработки полученных при анкетировании данных было установлено, что современные методы лабораторной диагностики на регулярной основе применяются в обследуемых организациях: ИФА – в 100%, а РИФ – в 75,00% лабораторий, в то время как ИБ – только в 28,33% лабораторий. Однако доли исследований, выполненных каждым методом, существенно отличались друг от друга: так, исследования методом ИФА составили большую часть – 23,08% - от общего количества иммунохимических тестов при обследовании населения на сифилис, а исследования в РИФ и в ИБ – только 1,36 и 0,03% соответственно.

Среди всего объёма выполненных иммунохимических исследований для диагностики сифилиса тесты, основанные на дифференцированном выявлении в крови пациентов только трепонемоспецифических IgM, составили 1,30% (167 451 исследований).

В структуре иммунохимических исследований, проведенных в 2012 году каждым методом при обследовании населения на сифилис, доли применения модификаций метода с определением антител только класса М также существенно различались между собою: исследования в ИФА_{IgM} составили 5,47% всех исследований методом ИФА, в модификации РИФ_{abc}-IgM - 1,82% всех исследований в РИФ, в то время как с использованием ИБ-IgM - почти треть (33,22%) - от всех исследований в ИБ. Установленные показатели подтвердили актуальность нашего исследования, так как продемонстрировали реальную потребность практического здравоохране-

ния в применении указанных модификаций для диагностики сифилиса.

Небольшое количество исследований методом РИФ-IgM и ИБ-IgM по сравнению с данными о применении ИФА_{IgM} безусловно являются отражением дефицита производственного выпуска наборов реагентов отечественного производства для этих методик, в то время как для исследований в ИФА_{IgM} соответствующие наборы реагентов представлены в довольно широком ассортименте, а сам метод успешно используется в лабораториях в течение длительного времени.

Для определения истинных потребностей практического здравоохранения в осуществлении исследований с определением трепонемоспецифических IgM для диагностики ранних форм сифилиса нами был осуществлён расчёт количества исследований, выполненных каждым методом при обследовании пациентов в 2012 году, относительно каждого вновь выявленного в этом году клинического случая раннего сифилиса.

Нами было установлено, что при обследовании населения и постановке клинического диагноза раннего сифилиса (сифилис первичный, вторичный, скрытый ранний, врождённый ранний) по России в целом проводилось 6,78 исследований с определением антител класса М к антигенам *T. pallidum*, в том числе: в ИФА_{IgM} – 6,59, в РИФ_{abc}-IgM – 0,14, а в ИБ-IgM – 0,05 единицы исследования. Проведен также анализ интенсивности применения указанных диагностических лабораторных методов исследования по Федеральным округам Российской Федерации с учетом числа вновь выявленных случаев заболевания населения ранними формами сифилитической инфекции.

Показано, что наиболее интенсивно указанные методики применялись в регионах с наиболее высокими показателями заболеваемости населения: в ЦФО, ПрФО, ДВФО и СФО, в которых осуществлено по 7,91; 7,90; 6,67 и 6,54 исследования соответственно в расчёте на один вновь диагностированный случай заболевания ранним сифилисом, которых было установлено в 2012 году 30 020, 50 526, 20 311 и 43 868 случаев соответственно.

II. Путём проведения лабораторных исследований с образцами крови,

полученными от 492 больных с диагнозом сифилис: сифилис первичный - 79, вторичный - 205, скрытый ранний - 114, скрытый неуточнённый как ранний или поздний - 32 и скрытый поздний - 62 человека (опытная группа) и 123 доноров крови без указаний на сифилитическую инфекцию и 30 пациентов с биологическими ложноположительными результатами в иммунохимических реакциях на сифилис (контрольная группа) нами были проведены исследования по изучению клинической информативности современных иммунохимических методов, позволяющих определять содержание в крови трепонемоспецифических антител класса М: ИФА_{IgM}, РИФ_{abc-IgM} и ИБ-IgM.

В соответствии с целью и задачами настоящего научного исследования в составе пациентов опытной группы преобладали больные ранними клиническими формами сифилиса (первичный, вторичный и скрытый ранний) - 80,90%; больные поздними скрытыми формами были представлены в 19,10% случаев. Анализ возрастной и гендерной характеристик пациентов опытной и контрольной групп позволило установить ряд различий: в опытной группе основную часть составили мужчины (63,21%), в то время как в контрольной группе - женщины (51,63%); в обеих группах преобладали пациенты в возрасте 31-40 и 41-50 лет. Установленные различия в составе пациентов опытной и контрольной групп, тем не менее, не явились основанием для реформирования групп исследования, так как отбор пациентов в группы осуществлялся по мере их обращения в медицинские организации.

Перед началом лабораторных исследований все образцы крови были аттестованы по уровню содержания в них антител к антигенам возбудителя сифилиса *T. pallidum* в ИФА_(IgG+IgM+IgA) и РИФ_{abc} (IgG).

В опытной группе в ИФА_(IgG+IgM+IgA) было получено 487 (98,98%) положительных результатов из 492 обследованных образцов, в том числе: в 77 (97,47%) из 79 случаев при сифилисе первичном, в 205 (100%) из 205- при вторичном, в 114 (100%) из 114 - при скрытом раннем, в 60 (96,77%) из 62 - при скрытом неуточнённом как ранний или поздний и в 31 (96,88%) из 32 случаев - при сифилисе скрытом позднем.

Отрицательные результаты в ИФА_(IgG+IgM+IgA) наблюдали с 5 (1,02%) образцами сыворотки крови опытной группы: при сифилисе первичном - в 2 (2,53%) из 79 случаев, скрытом неуточнённом как ранний или поздний - в 2 (3,22%) из 62, сифилисе скрытом позднем - в 1 (3,13%) из 32 случаев.

Исследование в ИФА_{IgG+IgM+IgA} 153 сывороток крови контрольной группы, полученных от лиц без указаний на наличие сифилиса, показало отрицательные результаты определения антител во всех случаях.

Изучение в РИФ_{abc} (IgG) этого же набора сывороток крови выявило положительные результаты в 483 (98,17%) случаях в опытной группе: при сифилисе первичном - в 75 (94,94%), вторичном - в 205 (100%), скрытом раннем - в 114 (100%), скрытом неуточнённом как ранний или поздний - в 59 (95,16%), скрытом позднем - в 30 (93,75%) образцах. Отрицательные результаты в РИФ_{abc} (IgG) с сыворотками крови опытной группы наблюдали в 9 (1,83%) случаях: при сифилисе первичном - в 4 (5,06%) из 79, скрытом неуточнённом как ранний или поздний - в 3 (4,84%) из 62, сифилисе скрытом позднем - в 2 (6,25%) из 32 случаев.

Аттестация в РИФ_{abc} (IgG) образцов крови группы контроля позволила получить 137 (89,54%) отрицательных и 16 (10,46%) слабоположительных («++») результатов, из числа которых 11 (7,19%) слабоположительных ответов были установлены с кровью здоровых доноров и 5 (3,27%) - с сыворотками крови, демонстрировавшими БЛПР.

Таким образом, при аттестации 492 сывороток крови основной группы содержание трепонемоспецифических антител при постановке ИФА_{IgG+IgM+IgA} было определено в 487 (98,98%) образцах, а при выполнении РИФ_{abc} - в 483 (98,17%) образцах. В контрольной группе, включавшей 153 сыворотки крови, в ИФА_{IgG+IgM+IgA} были получены отрицательные результаты в 153 (100%) случаях, в то время как в РИФ_{abc}(IgG) - только в 137 (89,54%) случаев.

В соответствии с задачами нашего исследования все образцы были изучены с применением методик, позволяющих определять содержание в них трепонемоспецифических антител класса М: ИФА_{IgM}, РИФ_{abc}-IgM и

ИБ-IgM, что, с точки зрения классической иммунохимии, должно являться весьма информативным для диагностики сифилиса.

III. Исследование 492 сывороток крови опытной группы в ИФА_{IgM} выявило присутствие специфических иммуноглобулинов класса М к *T. pallidum* только в 378 (76,83%) образцах (положительные результаты), в том числе: при сифилисе первичном – в 77 (97,47%) из 79, при вторичном – в 192 (93,66%) из 205, скрытом раннем – в 71 (62,28%) из 114, скрытом неуточнённом как ранний или поздний – в 33 (53,23%) из 62, скрытом позднем – в 5 (15,63%) из 32 случаев. Со 114 (23,17%) образцами сыворотки крови опытной группы в ИФА_{IgM} были получены отрицательные результаты исследования, свидетельствовавшие об отсутствии в этих образцах значимых количеств трепонемоспецифических IgM: при сифилисе первичном – в 2 (2,53%) из 79, вторичном – в 13 (6,34%) из 205, скрытом раннем – в 43 (37,72%) из 114, скрытом неуточнённом как ранний или поздний – в 29 (46,77%) из 62, скрытом позднем – в 27 (84,37%) из 32 случаев.

Одновременно была произведена оценка уровней содержания специфических IgM, выявляемых в образцах, по величине регистрируемого аналитического сигнала, представленного в формате коэффициента позитивности (КП) результата исследования в ИФА_{IgM}. Выявленные результаты соответствовали современным представлениям об динамике образования антител у больных бактериальными инфекциями: гуморальный иммунитет человека после инфицирования *T. pallidum* довольно рано и активно дебютирует выработкой специфических IgM, с постепенным присоединением гуморального ответа путём синтез антител класса G и класса A с одновременным снижением образования антител класса M.

Было установлено, что только при сифилисе первичном средний уровень аналитического сигнала (КП) в ИФА_{IgM} был достоверно выше, чем при постановке ИФА_{IgG+IgM+IgA} ($p < 0,01$); при исследованиях для диагностики каждой последующей клинической формы сифилиса значения КП в ИФА_{IgM} были достоверно ниже, чем средние уровни КП в ИФА_{IgG+IgM+IgA} ($p < 0,01$).

Исследование 153 сывороток крови контрольной группы в ИФА_{IgM} показало отрицательные результаты с 149 (97,39%) и ложноположительные с 4 (2,61%) образцами, в том числе: с 2 (1,63%) из 123 сывороток крови в подгруппе здоровых доноров и с 2 (6,67%) из 30 – в подгруппе лиц с БЛПР.

Полученные данные позволили определить клиническую информативность исследований в ИФА_{IgM} и ИФА_{IgG+IgM+IgA} при диагностике сифилиса (по ГОСТ Р 55022.3-2008) и сопоставить их друг с другом.

Анализ полученных показателей позволил установить, что клиническая чувствительность и диагностическая эффективность исследований в ИФА_{IgM} при диагностике сифилиса первичного достаточно высокие (по 97,47 и 97,41%) и соответствуют таковым при ИФА_{IgG+IgM+IgA} (по 97,47 и 97,41% соответственно). В то же время эти показатели в ИФА_{IgM} при сифилисе вторичном (93,66 и 95,25% соответственно) были ниже показателей в ИФА_{IgG+IgM+IgA} (100 и 98,88%), а при скрытых формах сифилиса установленный разрыв в показателях становился более выраженным: при скрытом раннем - 62,28 и 82,40% против 100 и 98,50%, при скрытом неуточнённом 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_{IgM} при дагностике сифилиса (97,39%) несколько уступали показателю в ИФА_{IgG+IgM+IgA} (100%).

IV. Исследование в РИФ_{abc}-IgM 423 из 492 образцов сыворотки крови опытной группы (больные сифилисом) позволило получить 319 (75,41%) положительных результатов, в том числе: 70 (95,89%) из 73 - в подгруппе больных с сифилисом первичным, 179 (89,50%) из 200 - с сифилисом вторичным, 48 (53,93%) из 89 - с сифилисом скрытым ранним, 16 (42,11%) из 38 - с сифилисом скрытым неуточнённом как ранний или поздний и 6 (26,09%) из 23 - с сифилисом скрытым поздним. В РИФ_{abc}-IgM с образцами крови опытной группы всего было получено 104 (24,59%) отрицательных результата: при сифилисе первичном наблюдали с 3 (4,29%) образцами, при сифилисе вторичном - с 21 (10,50%), при сифилисе скрытом раннем - с 41 (46,07%),

при сифилисе неуточнённом как ранний или поздний - с 22 (57,89%) и при скрытом позднем - с 17 (73,91%) образцами.

Изучение в РИФ_{abc}-IgM 73 сывороток крови из группы контроля (полученных от лиц без сифилиса) было выявлено 63 (86,30%) отрицательных и 10 (13,70%) положительных результатов; положительные результаты были получены с 3 (5,77%) из 52 исследованных образцов здоровых доноров крови и с 7 (33,33%) из 21 исследованного образца, представленного от лиц с БЛПР.

Полученные в этом разделе исследования результаты позволили нам в сравнительном аспекте охарактеризовать клиническую информативность исследований в РИФ_{abc} (IgG) и РИФ_{abc}-IgM при диагностике сифилиса (по ГОСТ Р 55022.3-2008).

При самой начальной форме инфекции - сифилисе первичном - клиническая чувствительность РИФ_{abc}-IgM (95,89%) превышала соответствующий показатель определения антител методом РИФ_{abc}(IgG) (94,94%); при сифилисе вторичном, скрытом раннем, скрытом неуточнённом как ранний или поздний и сифилисе скрытом позднем клиническая чувствительность исследований в РИФ_{abc}(IgG) была достоверно выше соответствующих показателей в РИФ_{abc}-IgM: 100, 100, 95,16 и 93,75% против 89,50, 53,93, 42,11 и 26,09%.

Клиническая специфичность обеих модификаций исследования в РИФ_{abc} при диагностике сифилиса составила: при РИФ_{abc}(IgG) - 89,54% и при РИФ_{abc}-IgM - 86,30%.

При манифестных ранних клинических формах диагностическая эффективность применения методики РИФ_{abc}-IgM была существенно выше: при сифилисе первичном и вторичном - 91,10 и 88,64%; однако при скрытых формах она инфекции была недостаточной - в рамках 68,52-71,88%.

Более высокая частота получения неспецифических положительных результатов в РИФ_{abc}-IgM по сравнению с РИФ_{abc} (IgG) обусловила также отставание показателя диагностической эффективности применения РИФ_{abc}-IgM при всех формах сифилиса (77,02%) в сравнении с РИФ_{abc} (IgG) (96,74%); так же соотносились между собою показатели диагностической

эффективности при выделяемых клинических формах инфекции: при сифилисе первичном, вторичном, скрытом раннем, скрытом неуточнённом как ранний или поздний и сифилисе скрытом позднем диагностическая эффективность исследований в РИФ_{abc}(IgG) были достоверно выше, чем в РИФ_{abc}-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 (ППР⁺) при определении антител класса М в РИФ_{abc} при диагностике сифилиса (96,96%) была выше, чем при определении антител класса G (96,79%), эта же тенденция была характерна для исследований при первичном и вторичном сифилисе: 87,50 и 94,71% - при РИФ_{abc}-IgM против 82,42 и 92,76% при РИФ_{abc} (IgG).

Предсказательная ценность отрицательного результата исследования (ППР⁻) в РИФ_{abc} (IgG) при всех клинических формах сифилиса была выше, нежели в РИФ_{abc}-IgM: при сифилисе первичном (97,16 против 95,45%), вторичном (100 против 75,00%), скрытом раннем (100 против 60,58%), скрытом неуточнённом как ранний или поздний (97,85 против 74,12%) и сифилисе скрытом позднем (98,56 против 78,75%).

Полученные данные позволили определить более точные показания к применению каждой модификации изучавшегося метода исследования. При сифилисе первичном показано применение как ИФА_{IgM}, так и РИФ_{abc}-IgM в связи с их высокой клинической чувствительностью (97,47 и 95,89% соответственно), при сифилисе вторичном – только для ИФА_{IgM} (клиническая чувствительность - 93,66%). Применение IgM-методов при диагностике сифилиса скрытого раннего представляется нецелесообразным ввиду их низкой клинической чувствительности (ИФА_{IgM} - 62,28 и РИФ_{abc}-IgM - 53,93%).

V. Исследования в ИБ-IgM и ИБ-IgG были проведены с 76 из 79 образцов сыворотки крови опытной группы, полученными от больных сифилисом первичным, и 24 образцами сыворотки крови доноров.

По окончании исследования в ИБ-IgM в опытной группе было получе-

но 65 (85,53%) положительных, 9 (10,84%) неопределенных и 2 (2,63%) отрицательных результатов и в контрольной группе - 24 (100%) отрицательных результата.

В результате исследования в ИБ-IgG сывороток крови опытной группы было получено 70 (92,11%) положительных, 5 (6,58%) - неопределенных и 1 (1,31%) отрицательный результат, а в контрольной группе - 24 (100%) отрицательных результата.

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

Полученные данные также позволили определить информативность определения иммунных антител к каждому из 4 рекомбинантных антигенов *T. pallidum*, наносимых на стрипы для проведения иммуноблоттинга. Наибольшую клиническую чувствительность, клиническую специфичность и диагностическую эффективность имели результаты исследования в ИБ-IgM и ИБ-IgG при первичном сифилисе 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), 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). Не установлено выраженной реактивности у больных сифилисом первичным на антиген TrN37.

VI. При изучении вариантов реактивности сыворотки больных сифилисом первичным к различным антигенам в составе иммуносорбента для иммуно-блоттинга (TrN15, TrN17, TrN47 и TmpA) нами было установлено, что на начальных этапах развития гуморального иммунитета в крови больных сифилисом определяется более выраженное содержание антител класса М, специфичных только к одному из изучаемых антигенов, при существенно более низких уровнях антител класса М против других антигенов. Нами про-

ведено изучение выявленного явления и установлено, что у больных сифилисом первичным приоритет антителообразования в отношении антигена TrpA наблюдался наиболее часто - в 65,79% случаев, в то время как в отношении других антигенов более выраженный антителогенез определяли существенно реже: к TrpN17 - в 22,37%, к TrpN47 - в 9,21% и к TrpN15 - в 2,63% случаев. Выявленную закономерность мы определили как варианты или профили иммунологической реактивности.

Сопоставление данных исследования в ИБ-IgM и результатами исследования этих же сывороток крови в ИБ-IgG позволило нам подтвердить справедливость установленного наблюдения. В сыворотке крови больных сифилисом первичным также определялись разные уровни антител в отношении изучавшихся антигенов *T. pallidum*, при этом преобладание содержания этих антител в отношении определенных антигенов имели симметричную конфигурацию, что и при формировании первичной иммунной реакции при участии антител класса М, отличавшуюся тем, что иммунный гуморальный ответ с участием антител класса G был более выраженным и исследование в ИБ-IgG без дополнительного разведения сыворотки (титрования) в некоторых случаях маскировало более высокое содержание антител на уровне максимально определяемого методом иммуноблоттинга («++++» условных единиц измерения).

VII. Использование в практическом здравоохранении современных разрешенных к применению методов иммунохимического исследования при диагностике сифилиса (ИФА_{IgM}) позволило нам запланировать и осуществить наблюдение за длительностью циркуляции трепонемоспецифических антител класса М у пациентов, которые получили полноценную антибактериальную терапию по поводу ранних форм сифилиса. Это исследование было обусловлено предположениями ряда исследователей и врачей дерматовенерологов, что антитела указанного класса без дополнительной поддержки в виде антигенной стимуляции быстро элиминируются из крови больных ранними клиническими формами сифилиса под воздействием адекватной антибак-

териальной терапии и могут служить ранними индикаторами оценки эффективности проведенного лечения или излеченности от сифилиса.

В ИФА_{IgM} был изучен 341 образец сыворотки крови, полученный от больных ранними клиническими формами сифилиса (первичный - 30, вторичный - 148 и скрытый ранний - 163 образца) в сроки от 3 месяцев до 3 лет после окончания антибактериального лечения по схемам, рекомендуемым методическими и клиническими рекомендациями, утвержденными Минздравом России (1999) или разработанными Экспертным советом Российского общества дерматовенерологов и косметологов (2010, 2012).

Проведенное изучение сывороток крови позволило определить, что действительно содержание антител в крови пациентов, получивших адекватную антибактериальную терапию по поводу ранних форм сифилиса, (измеряемое в ИФА_{IgM} по показателю КП) начинало постепенно понижаться уже при сроках наблюдения 3, 6 и 9 месяцев, однако положительные результаты исследования этим методом наблюдали вплоть до сроков наблюдения более 2-х лет; со всеми образцами крови, полученными у пациентов этой группы через 3 года, результаты исследования в ИФА_{IgM} результаты были отрицательными. Длительная циркуляция антител класса М к антигенам *T. pallidum* в крови пациентов не позволила нам рекомендовать это исследование в качестве индикатора эффективности проведенной терапии при клинко-серологическом наблюдении над больными ранними формами сифилиса, получившими адекватную антибактериальную терапию.

VIII. Результаты исследования образцов крови опытной и контрольной групп современными иммунохимическими методами, позволяющими определять содержание трепонемоспецифических антител класса М, и оценка информативности этих методов позволили нам разработать порядок применения изучавшихся нами методов (ИФА_{IgM}, РИФ_{abc-Ig} и ИБ-IgM) с целью своевременной диагностики ранних клинических форм сифилиса.

ВЫВОДЫ

1. Установлено недостаточное применение и современных модификаций иммунохимических методов, основанных на определении трепонемоспецифических антител класса М, при диагностике ранних клинических форм сифилиса в специализированных медицинских организациях по профилю «дерматовенерология» субъектов Российской Федерации: в 2012 году доля IgM-методов составила 1,30% общего количества исследований для диагностики сифилиса, а в их структуре преобладали ИФА_{IgM} – 97,27%, в то время как исследования в РИФ_{абс-IgM} и в ИБ-IgM составили 2,0 и 0,73% соответственно, что обусловлено отсутствием производственного выпуска разрешенных к применению отечественных наборов реагентов, а также клинически обоснованных рекомендаций их практического использования.

2. В сравнительном аспекте изучена клиническая информативность двух современных IgM-технологий (ИФА_{IgM}, и РИФ_{абс-IgM}). При сифилисе первичном установлена наиболее высокая КЧ для ИФА_{IgM} (97,47%) и РИФ_{абс-IgM} (95,89%), при сифилисе вторичном - только для ИФА_{IgM} (93,66%), что позволяет рекомендовать эти методы как приоритетные при выявлении соответствующей формы заболевания. Применение IgM-методов при диагностике сифилиса скрытого раннего представляется нецелесообразным ввиду низкой клинической чувствительности (ИФА_{IgM} - 62,28 и РИФ_{абс-IgM} -53,93%).

3. Определена клиническая информативность ИБ-IgM у больных сифилисом первичным: 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.

4. У больных сифилисом первичным установлены различные профили гуморального иммунитета, отличающиеся преобладанием в крови содер-

жания 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 TrN17 - в 22,37%, к TrN47 – в 9,21% и к TrN15 - в 2,63% случаев), что необходимо учитывать при разработке новых наборов реагентов для диагностики раннего сифилиса.

5. Методом ИФА_{IgM} установлено, что у больных ранними формами сифилиса, получивших адекватное специфическое лечение, в крови длительное время могут определяться трепонемоспецифические антитела класса М, полная их элиминация происходит к сроку наблюдения около 3 лет.

6. Разработан порядок обследования пациентов с целью диагностики ранних клинических форм сифилиса, основанный на использовании лабораторных методов, позволяющих определять в крови трепонемоспецифические антитела класса М (ИФА_{IgM}, РИФ_{abc}-IgM или ИБ-IgM).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аковбян В.А. Характеристика эпидемиологических закономерностей, определяющих распространение заболеваний, передаваемых половым путем, в России. / В.А. Аковбян, А.В. Резайкина, Л.И. Тихонова // Вестник дерматологии и венерологии 1998; 1: 4-6.
2. Аковбян В.А. Глава 7. Сифилис. Диагностика. / В кн.: В.А. Аковбян, В.Г. Нестеренко // Инфекции, передаваемые половым путем. - М.: Медиа Сфера, 2007: 306-323.
3. «Антипаллидум-Флюороген-IgM/IgG». Диагностикум для выявления антител классов М и G к *Treponema pallidum* в реакции иммунофлюоресценции» по ТУ 9398-128-70423725-2011 / ЗАО «ЭКОлаб» (г. Электрогорск, Московская обл., Россия); РУ № РЗН 2013/247 от 28.02.2013 г.
4. Беднова В.Н. Новая тест-система иммуноферментного анализа для серодиагностики сифилиса. / В.Н. Беднова, Г.А. Дмитриев, А.В. Бабий и др. // Вестник дерматологии и венерологии 1995; 1; 19-20.
5. Бондарева В.П. Современные подходы к лабораторной диагностике сифилиса. / В.П. Бондарева, В.П. Дерябина, Е.Н. Захарова и др. // Клиническая лабораторная диагностика 2010; 11: 46-48.
6. Вагнер В.П. К вопросу о совершенствовании серодиагностики сифилиса. / В.П. Вагнер, Н.Н. Крайнова, Г.И. Луговская // Новости «Вектор-Бест 2007; 3(45); URL: <http://www.vector-best.ru/nvb/n45.pdf>.
7. Гариб Ф.Ю. Т- и В-системы лимфоцитов человека: Текст лекций. Ташкент: Изд-во ТашМИ, 1987; 12 (1).
8. Государственный реестр медицинских изделий и организаций, осуществляющих производство и изготовление медицинских изделий. // Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения (Росздравнадзор); URL:http://www.roszdravnadzor.ru/national_foreign_medprod/search_medproduct.
9. Гусева С.Н. Использование теста IgM-РИФабс в обследовании беременных на активность сифилитической инфекции. / С.Н. Гусева, С.И. Дани-

лов // Российский журнал кожных и венерических болезней 2004: 6: 60-63.

10. Дмитриев Г.А. Состояние лабораторной диагностики сифилиса. Consilium medicum. 2004; 6(3) URL: http://www.consilium-medicum.com/media/consilium/04_03/211.shtml.

11. Дмитриев Г.А. СИФИЛИС. Дифференциальный клинико-лабораторный диагноз. / Г.А. Дмитриев, Н.В. Фриго // М.: Медицинская книга, 2004; 366 с.

12. Иванов А.М. Комплексный подход к повышению информативности серологической диагностики сифилиса. / А.М. Иванов, И.Н. Теличко, Е.В. Ходосевич и др. // IX Всероссийский съезд дерматовенерологов. Тезисы научных работ. М., 2005 а; II: 46-47.

13. Иванов А.М. Оптимизация серологической диагностики сифилиса: Дис. ... докт. мед. наук / А.М. Иванов // Санкт-Петербург, 2005 б; 371 с.

14. Иванов А.М. Особенности динамики противотрепонемных антител у больных сифилисом. / А.М. Иванов, М.В. Сердюцкая, Ф.А. Овсянников, В.Б. и др. // Медицинская иммунология 2007; 9 (2-3): 226.

15. Кашкин К.П. Иммунологические исследования в клинике инфекционных заболеваний. // Новости прикладной иммунологии и аллергологии 2004; 8: 1-10.

16. Киселева Г.А. Сравнительное изучение чувствительности и специфичности трех иммуноферментных тест-систем, предназначенных для выявления иммуноглобулинов класса М к возбудителю сифилиса. / Г.А. Киселёва, В.К. Ткачев, В.Н. Беднова и др. // Вестник дерматологии и венерологии 2000; 4: 6-10.

17. Китаева Н.В. Частота выявления трепонемоспецифических антител класса IgM у больных различными формами сифилиса. / Н.В. Китаева, С.В. Ротанов, Н.В. Фриго и др. // II Всероссийский конгресс дерматовенерологов. Тезисы научных работ. С-Пб., 2007: 159-160.

18. Китаева Н.В. Актуальные проблемы сифилидологии. Современные технологии диагностики сифилитической инфекции. / Н.В. Китаева, Н.В.

- Фриго, Л.Е. Мелёхина // Вестник дерматологии и венерологии 2008; 5: 51-59.
19. Конституция Российской Федерации (принята всенародным голосованием 12.12.1993) (с учетом поправок, внесенных в соответствии с Законами РФ № 6-ФЗК от 30.12.2008 и №7-ФЗК от 30.12.2008 о поправках к Конституции РФ). // М.: Изд. «Юридическая литература», 2009.
20. Корогодин Д.В. Новые рекомбинантные антигены: использование в серодиагностике сифилиса. / Д.В. Корогодин, П.Г. Богущ, Т.А. Казарова и др. // IX Всероссийский съезд дерматовенерологов. Тезисы научных работ. М., 2005; II: 47.
21. Корогодин Д.В. Новые рекомбинантные антигены: использование в серодиагностике сифилиса. / Д.В. Корогодин, С.В. Беневоленский и др. // Тезисы. 2 Всероссийский конгресс дерматовенерологов. СПб, 2007: 160-161.
22. Красносельских Т.В. Современный сифилис: эпидемиологические тенденции и достижения в области изучения *Treponema pallidum*. / Т.В. Красносельских, Е.А. Соколовский // Проблемы современной дерматологии, венерологии и косметологии 2010; 1: 84-87.
23. Кубанова А.А. Опыт использования метода иммуноблоттинга для диагностики сифилиса. / А.А. Кубанова, Н.В. Фриго, С.В. Ротанов и др. // Вестник дерматологии и венерологии 2006; 2: 4-11.
24. Кубанова А.А. (ред.). Сборник стандартных операционных процедур «Стандартизованный способ получения и доставки образцов сыворотки / плазмы крови больных различными формами сифилиса из субъектов Российской Федерации (СОП № 001/02 СИФ и СОП № 002/02 СИФ). Изд. 2-е, исправленное и дополненное. / А.А. Кубанова, С.В. Ротанов, Н.В. Фриго, Н.В. Китаева. - М.: ДЭКС-Пресс, 2008; (<http://www.cnikvi.ru>).
25. Кубанова А.А. Молекулярные маркеры в прогнозировании клинической эффективности инфликсимаба у больных псориазом. / А.А. Кубанова, И.Н. Лесная, Н.В. Фриго и др. // Вестник дерматологии и венерологии 2010 а; 1: 57-66.
26. Кубанова А.А. (ред.) Дерматовенерология, 2010: Клинические ре-

комендации. 4-е изд., переработанное и дополненное. М.: Изд. ДЕКС-Пресс, 2010 б: 347-386.

27. Кубанова А.А. Патент RU № 2 394 496 С1: Способ диагностики сифилиса путем одновременного определения реакиновых и трепонемо-специфических антител к *T. pallidum* на микроскопных альдегидных стеклах; по заявке № 2009108495/14 от 11.03.2009. / А.А. Кубанова, А.А. Кубанов, И.Н. Лесная и др. // Бюлл. ФИПС №20 от 20.07.2010 в.

28. Кубанова А.А. Современные направления и перспективы развития лабораторной диагностики инфекций, передаваемых половым путем. / А.А. Кубанова, Н.В. Фриго, С.В. Ротанов и др. // Вестник дерматологии и венерологии 2011; 5: 54-63.

29. Кубанова А.А. (ред.). Клинические рекомендации по ведению больных инфекциями, передаваемыми половым путем, и урогенитальными инфекциями. (Российское общество дерматовенерологов и косметологов). // М.: Изд. дом «ДЕЛОВОЙ ЭКСПРЕСС», 2012 а: 34-68.

30. Кубанова А.А. Полезная модель биочипа для одновременного определения антител к кардиолипину и специфическим антигенам *T. pallidum*. / Тезисы научных работ: XII Всероссийский съезд дерматовенерологов и косметологов. / А.А. Кубанова, А.А. Кубанов, Н.В. Фриго и др. // М.: РОДВК, 2012 б: 28.

31. Кубанова А.А. Ресурсы и деятельность медицинских организаций дерматовенерологического профиля в Российской Федерации в 2013 году. / А.А. Кубанова, Л.Е. Мелёхина, А.А. Кубанов, Е.В. Богданова // Вестник дерматологии и венерологии 2014; 3: 16-36.

32. Куляш Г.Ю. О роли отрицательных результатов ИФА на IgM к *Treponema pallidum* в ошибках при диагностике и оценке эффективности лечения сифилиса. // ИППП 2002; 2: 25-29.

33. Лазарев В.Н., Шкарупета М., Левицки С. И др. Экспрессия потенциальных антигенов *T. pallidum* в *E. coli*. Биотехнология. Теория и практика 2010; 4: 80-87.

34. Ломоносов К.С. Актуальное интервью. Новое в диагностике и терапии сифилиса. // Российский журнал кожных и венерических болезней 2002; 5: 56-60.
35. Лосева О.К. Сифилис и беременность. // В кн.: Современные методы диагностики, терапии и профилактики ИППП и других урогенитальных инфекций. Сб. материалов рабочих совещаний дерматовенерологов и акушеров-гинекологов 1999-2000 гг. // Базель: Хоффман ля Рош Лтд., 2000: 13-18.
36. Лосева О.К., Ловенецкий А.Н. Эпидемиология, клиника, диагностика и лечение сифилиса. Руководство для врачей. // В кн.: Опыт организации борьбы с сифилисом в субъекте Российской Федерации. - Екатеринбург: Чароид, 2002: 159-248.
37. Ляхов В.Ф. Динамика трепонемоспецифической иммуноглобулинемии при ранних формах сифилиса. / В.Ф. Ляхов, К.К. Борисенко, Н.С. Потекаев и др. // Вестник дерматологии и венерологии 1990; 8: 38-42.
38. «ЛюмиБест антипаллидум». Набор реагентов для выявления антител к *Treponema pallidum* методом иммунофлюоресценции по ТУ 9398-339-23548172-2012. // URL: http://www.zavlab.ru/catalog/reagents_for_lab/immunoferm_diag/sifiliz.
39. Марданлы С.Г. Разработка иммунофлюоресцентных диагностикумов для выявления антител классов G и M к *Treponema pallidum*. / С.Г. Марданлы, Н.Н. Шершнева // Тезисы научных работ: XII Всероссийский съезд дерматовенерологов и косметологов. М.: РОДВК, 2012 а: 36.
40. Марданлы С.Г. Разработка иммунофлюоресцентных диагностикумов для выявления антител классов G и M к *Treponema Pallidum*/ С.Г. Марданлы, Н.Н. Шершнева // II Конференция дерматовенерологов Сибирского Федерального округа: Сборник статей. Иркутск, 2012 б: 102-106.
41. Марданлы С.Г. Разработка нового набора реагентов для линейного иммуноблоттинга с целью диагностики сифилиса/ С.Г. Марданлы, С.В. Ротанов, Е.А. Амелина и др. // II Конгресс Евроазиатской ассоциации дерматовенерологов. М., 2012 в: 120.

42. Марданлы С.Г. Отечественная тест-система "Лайн-Блот Сифилис-IgM" для определения IgM-антител к *Treponema pallidum* методом линейного иммуноблоттинга/ С.Г. Марданлы, В.А. Арсеньева, И.Н. Анискова, А.Р. Жигаленко // Клиническая дерматология и венерология 2013; 5: 35-38.

43. Марданлы С.Г. Новая тест-система "Лайн-Блот Сифилис-IgM" для определения IgM-антител к *Treponema pallidum* методом линейного иммуноблоттинга/ С.Г. Марданлы, В.А. Арсеньева // Вестник службы крови 2014 а; 1: 44-47.

44. Марданлы С.Г. Разработка иммунофлюоресцентных диагностикумов для выявления антител классов G и M к *Treponema pallidum*. / С.Г. Марданлы, Н.Н. Шершнева // Тезисы научных работ: XIV Всероссийский съезд дерматовенерологов и косметологов. М.: МЗ РФ, РОДВК, 2014 б: 26.

45. Маркелов М.Л. Патент RU № 2397178 С1: Диагностическая тест-система в формате иммуночипа и способ серологической дифференциальной диагностики сифилиса; по заявке 2009106931/13 от 27.02.2009. / М.Л. Маркелов, Т.А. Чеканова, Г.А. Шипулин // Бюлл. ФИПС от 20.08.2010.

46. Масеткин И.П. Серодиагностика сифилиса. Учебно-методическое пособие. / И.П. Масеткин, Л.С. Резникова, Т.А. Лучникова, В.Д. Елькин // Пермь, 1977.

47. Монцевичуте-Эрингене Е.В. Упрощенные математико-статистические методы в медицинской исследовательской работе. // Патологическая физиология и экспериментальная медицина 1964; 4: 71-78.

48. Национальный стандарт Российской Федерации. ГОСТ Р 51352-99. «Наборы реагентов для клинической лабораторной диагностики. Методы испытаний» (Принят и введен в действие Постановлением Госстандарта России № 402-ст от 11 ноября 1999 г.).

49. Национальный стандарт Российской Федерации. ГОСТ Р 50779.10-2000 (ИСО 3534-1-93). Статистические методы. Вероятность и основы статистики. Термины и определения. (Утв. Постановлением Госстандарта России №429-ст. от 29.12.2000).

50. Национальный стандарт Российской Федерации. ГОСТ Р 53022.3-2008. «Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов». (Утв. Приказом Росстандарта № 557-ст от 18 декабря 2008 г. «Об утверждении национального стандарта»).

51. Национальный стандарт Российской Федерации. ГОСТ Р 53434-2009. «Принципы надлежащей лабораторной практики». (Утв. и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии № 544-ст от 02.12.2009 г.).

52. Новиков В.В. Иммунология: Учебное пособие. / В.В. Новиков, Н.А. Добротина, А.А. Бабаев // Н. Новгород: Изд. ННГУ им. Н.И. Лобачевского, 2005. - 212 с.

53. Новиков Ю.А. Особенности местного иммунного реагирования при нейросифилисе. / Ю.А. Новиков, Т.И. Новгородова, М.Б. Кидалов и др. // Тезисы научных работ: XII Всероссийский съезд дерматовенерологов и косметологов. Москва, 26-29.06.2012. М.: РОДВК, 2012: 42.

54. Нураденова Г.Р. Способ диагностики при раннем врожденном сифилисе. Патент № RU 2168177 по заявке: 99119944/14 от 22.09.1999. / Г.Р. Нураденова, Н.И. Рассказов, Р.И. Нурғалиев // Бюлл. ФИПС от 27.05.2001.

55. Обрядина А.П. Ультразвученные белки *Treponema pallidum* и их рекомбинантные аналоги в иммуноферментной диагностике сифилиса. / А.П. Обрядина, Н.В. Фриго, В.Д. Комарова и др. // Инфекции, передаваемые половым путем 1991; 1: 25-28.

56. Овчинников Н.М. Бледная спирохета. // Венерические болезни: Руководство для врачей). / Под ред. М.П. Демьяновича, Н.М. Туранова. // М.: Медгиз, 1956: 451-465.

57. Овчинников Н.М. Лабораторная диагностика заболеваний, передающихся половым путем. / Н.М. Овчинников, В.Н. Беднова, В.В. Делекторский // М.: Медицина, 1987; 303 с.

58. Петришина С.В. Лабораторная диагностика сифилиса. // Россий-

ский журнал кожных и венерических болезней 2004; 2: 46-49.

59. Плахова К.И. Цитокины в плазме крови пациенток с урогенитальной хламидийной инфекцией. / К.И. Плахова, Н.В. Фриго, С.В. Ротанов // Тезисы научных работ: XII Всероссийский съезд дерматовенерологов и косметологов. Москва 26-29.06.2012: РОДВК: 48.

60. Приказ Минздрава России №87 от 26.03.2001 г. «О совершенствовании серологической диагностики сифилиса»: Приложение №1 «Постановка отборочных и диагностических тестов на сифилис».

61. Приказ Минздрава России №327 от 25.07.2003 г. «Об утверждении протокола ведения больных «СИФИЛИС».

62. Приказ Минздравсоцразвития России №735 от 30.10.2006 г. «Об утверждении Административного регламента Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития по исполнению государственной функции по регистрации изделий медицинского назначения» (регистрация Минюста России №8542 от 30.11.2006 г., дата вступления приказа в силу 29.12.2006 г.).

63. Приказ Минздравсоцразвития России № 708н от 23.08.2010 г. «Об утверждении Правил лабораторной практики».

64. Приказ Минздравсоцразвития России №829 от 08.12.2006 г. «Об утверждении стандарта медицинской помощи больным с поздним сифилисом (при оказании специализированной помощи)».

65. Приказ Минздравсоцразвития России №830 от 08.12.2006 г. «Об утверждении стандарта медицинской помощи больным со скрытым сифилисом, неуточненным как ранний или поздний (при оказании специализированной помощи)».

66. Приказ Минздравсоцразвития России №860 от 18.12.2006 г. «Об утверждении стандарта медицинской помощи больным врожденным сифилисом (при оказании специализированной помощи)».

67. Приказ Минздравсоцразвития России №43 от 17.01.2007 г. «Об утверждении стандарта медицинской помощи больным с ранним сифилисом

(при оказании специализированной помощи)».

68. Рассказов Н.И. Применение: иммуноферментного анализа; для регистрации специфических IgM-антител у больных сифилисом / Н.И. Рассказов, Г.А. Ермолин, В.В. Чалов и др. // Вестник дерматологии и венерологии 1990; 11: 12-16.

69. Рассказов Н.И. Применение иммуноферментного анализа для регистрации; специфических суммарных антител у больных сифилисом / Н.И. Рассказов, Г.А. Ермолин, В.В. Чалов и др. // Вестник дерматологии и венерологии 1991; 8: 25-27.

70. Ресурсы и деятельность медицинских организаций дерматовенерологического профиля. Заболеваемость инфекциями, передаваемыми половым путем, заразными кожными болезнями и болезнями кожи за 2011-2012 годы [Статистические материалы]. // М.: Минздрав России, ФГБУ «ЦНИИОИЗ» Минздрава России, ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, 2013.

71. Ройт А. Иммунология: перевод с англ. / А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл // М.: Мир, 2000. - 592 с.

72. Ротанов С.В. Применение иммунохроматографических исследований для диагностики сифилитической инфекции. / С.В. Ротанов, С.Р. Османова // Современные проблемы дерматовенерологии, иммунологии и врачебной косметологии 2011-а; 5: 16-23.

73. Ротанов С.В. Современные методы первичного обследования для выявления больных сифилитической инфекцией в Российской Федерации. / С.В. Ротанов, С.Р. Османова // Вестник дерматологии и венерологии 2011-б; 6: 18-24.

74. Ротанов С.В. Оценка клинической значимости метода иммунохемилюминесценции при диагностике сифилитической инфекции. / С.В. Ротанов, Н.В. Фриго, Т.Е. Манукьян, Г.М. Подгурский // Вестник дерматологии и венерологии 2012-а; 1: 49-55.

75. Ротанов С.В. Изучение протеома *T. pallidum* с целью совершенствования лабораторных исследований для диагностики сифилиса. / С.В. Ротанов,

Р.Ф. Хайруллин, Н.В. Фриго // Вестник дерматологии и венерологии 2012-б; 4: 10-15.

76. Сердюцкая М.В. Эффективность иммуноблотинга при дифференциальной диагностике сифилиса у беременных. / М.В. Сердюцкая, А.М. Иванов, А.Б. Криворучко, Д.В. Заславский и др. // Журнал инфектологии 2009; 1 (2/3): 43-47.

77. Сердюцкая М.В. Метод повышения чувствительности детекции IgM-антител при диагностике врожденного сифилиса. / М.В. Сердюцкая, А.М. Иванов, Ф.А. Овсянников и др. // Russian journal of immunology 2007; 9 (Suppl 1): 128-129.

78. Сергиенко В.И. Математическая статистика в клинических исследованиях. / В.И. Сергиенко, И.Б. Бондарева // М.: Изд. дом «ГЭОТАР-МЕД», 2001.

79. Сидорова Е.В. Значение определения противотрепонемных IgM-антител в серодиагностике сифилиса. / Е.В. Сидорова, В.Ф. Ляхов // ЗППП 1995; 4: 11-14.

80. Скрипкин Ю.К. Кожные и венерические болезни. Руководство для врачей. / Ю.К. Скрипкин (ред.), В.Н. Мордовцев (ред.) // М.: Медицина, 1999; Т. I.: 466-503.

81. Скуинь Л.М. Некоторые механизмы иммунной защиты при туберкулезе. // Новости прикладной иммунологии и аллергологии 2004; 21-26.

82. Соколовский Е.В. Руководство по лабораторной диагностике сифилиса в странах Восточной Европы. / Е.В. Соколовский, Н.В. Фриго, С.В. Ротанов и др. // Вестник дерматологии и венерологии 2008; 5: 87-96.

83. Соколовский Е.В. Лабораторная диагностика сифилиса: Методические рекомендации. / Е.В. Соколовский, А.М. Савичева и др. // С-Пб.: Изд-во Н-Л., 2009; 72 с.

84. Старченко М.Е. Значение определения фракции IgM в диагностике сифилиса. / М.Е. Старченко, Р.И. Гранович, С.И. Данилов. // Вестник дерматологии и венерологии 1994; 1: 9-11.

85. Ткачев В.К. ИФА-диагностика сифилиса: информационно-методическое пособие. 3-е изд., 2005. / В.К. Ткачев, Т.Г. Вяткина // URL: <http://www.vector-best.ru/brosh/9607.htm>.

86. Ткачѐв В.К. Современный алгоритм серологической диагностики сифилиса: возможности и проблемы. / В.К. Ткачѐв // Новости «Вектор-Бест 2012; 3(65): 2-6. URL: http://www.vector-best.ru/nvb/n65/st65_1.htm.

87. Уилкоккс Р.Р. Лечение сифилиса. // Бюллетень Всемирной организации здравоохранения 1981; 59 (5): 8(536)-15(543).

88. Фахретдинова Х.С. О значимости современных серологических методов исследования сифилиса у детей и подростков. / Х.С. Фахретдинова, Э.А. Имельбаева, А.Ж. Гильманов // Тезисы научных работ XI Всероссийского съезда дерматовенерологов и косметологов Екатеринбург, 2010: 14.

89. Федеральный закон Российской Федерация № 323-ФЗ от 21 ноября 2011 года «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» (принят Государственной Думой 1 ноября 2011 года, одобрен Советом Федерации 9 ноября 2011 года; в ред. Федеральных законов № 89-ФЗ от 25.06.2012, № 93-ФЗ от 25.06.2012);

90. Федеральные клинические рекомендации по ведению больных сифилисом. // РОДВК, 2013; URL: http://www.cnikvi.ru/docs/clinic_recs/infektsii-peredavaemye-polovym-putem/.

91. Фриго Н.В. Сравнительные результаты иммуноферментного анализа, реакции пассивной гемагглютинации и микрореакции в серодиагностике сифилиса. / Н.В. Фриго, В.Д. Комарова, А.П. Обрядина, А.Н. Бурков // Вестник дерматологии и венерологии 2000; 4: 34-36.

92. Фриго Н.В. Стандарты и алгоритмы диагностики сифилиса в России и за рубежом. // Актуальные вопросы дерматологии, венерологии и дерматокосметологии: Материалы V съезда дерматовенерологии Республики Беларусь. Минск: «ДокторДизайн», 2006 а: 143-149.

93. Фриго Н.В. Результаты изучения диагностической эффективности новой тест-системы линейного иммуноферментного анализа «Inno- Lia™

Syphilis Score». / Н.В. Фриго, С.В. Ротанов, В.Г. Нестеренко и др. // Клиническая лабораторная диагностика 2006 б; 3: 36-41.

94. Фриго Н.В. Иммуноблоттинг в диагностике ранних форм сифилиса. / Н.В. Фриго, Л.А. Дударева, С.В. Ротанов и др. // Вестник дерматологии и венерологии 2008; 4: 57-62.

95. Фриго Н.В. Лабораторная диагностика сифилиса. // В кн.: Скрипкин Ю.К., Бутов Ю.С. (ред.). Клиническая дерматовенерология: в 2-х т. М.: Изд. ГЭОТАР-Медиа, 2009; Т. I: 617-642.

96. Фриго Н.В., Ротанов С.В., Манукьян Т.Е. и др. Лабораторная диагностика сифилиса: вчера, сегодня, завтра. // Вестник дерматологии и венерологии 2012; 4: 16-23.

97. Фришман М.П. Ускоренное лечение больных заразными формами сифилиса /М.П. Фришман, Б.А. Задорожный, В.П. Логунов и др. // Вестник дерматологии и венерологии 1984; 2: 71-75.

98. Хаитов Р.М. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009.

99. Хайруллин Р.Ф. Биоинформатический анализ специфических антигенов *T. pallidum*. / Р.Ф. Хайруллин, С.В. Ротанов, Н.В. Фриго, А.В. Белоусова // Вестник дерматологии и венерологии 2012; 5: 56-64.

100. Чеботарёв В.В. Серологические реакции в диагностике сифилиса: реальность и перспективы. / В.В. Чеботарев, М.А. Земцов, Н.В. Чеботарева // Российский журнал кожных и венерических болезней 2005; 4: 7-10.

101. Чеботарёв В.В. Проблема серорезистентности у больных сифилисом, леченных по современным методикам. / В.В. Чеботарев, М.А. Земцов, Л.В. Павлик, Н.В. Чеботарева // Клиническая дерматология и венерология 2006; 2: 101-106.

102. Чепурченко Н.В. Предварительные результаты апробации иммуноферментной тест-системы для определения трепонемоспецифических IgM. / Н.В. Чепурченко, М.В. Гладышева, А.Н. Бурков и др. // VIII Всероссийский съезд дерматовенерологов. М., 2001; II: 113-114.

103. Чепурченко Н.В., Гладышева М.В., Обрядина А.П. Новые воз-

возможности использования рекомбинантных антигенов в серодиагностике сифилиса. Клиническая дерматология и венерология 2006; 2: 28-31.

104. Черешнев В.А. Сифилис: Иммунология и лабораторная диагностика. / В.А. Черешнев, Н.Б. Патрушева, Я.Б. Бейкин и др. // Екатеринбург: УрО РАН, 2006.

105. Чернова Т.А. Линейный иммуноблот – новый диагностический тест для серодиагностики сифилиса. / Т.А. Чернова, Г.В. Гордеева, А.Е. Прокопьева // Клиническая дерматология и венерология 2005; 1: 21-22.

106. Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010.

107. Baker-Zander S.A. IgG and IgM antibody reactivity to antigens of *Treponema pallidum* after treatment of syphilis. / S.A. Baker-Zander, R.E. Roddy, H.H. Handsfield, S.A. Lukehart // Sex Transm Dis 1986; 13: 214-220.

108. Berm B. Cytokines, chemokines and growth factors in wound healing. / B. Berm, P. Babilas, M. Landthaler., S. Schreml // JEADV 2012; 26(7): 812-820.

109. Binnicker M.J. *Treponema*-Specific Tests for Serodiagnosis of Syphilis: Comparative Evaluation of Seven Assays. / M.J. Binnicker, D.J. Jespersen, and L.O. Rollins // J of Clin Microbiol 2011 (Apr); 49 (4): 1313–1317.

110. Brinkman M.B. Reactivity of Antibodies from Syphilis Patients to a Protein Array Representing the *Treponema pallidum* Proteome. / M.B. Brinkman, M. McKevitt, M. McLoughlin et al. // J Clin Microbiol 2006 (Mar); 44(3): 888-891.

111. Casal C.A.D. Molecular detection of *Treponema pallidum* in blood samples of women pregnancy. / C.A.D. Casal, M.O. da Silva, I.B. Costa et al. // Rev Soc Bras Med Trop 2011 (Jul-Aug); 44(4): 451-456.

112. Castro R. Evaluation of enzyme immunoassay technique for detection antibodies against *Treponema pallidum*. / R. Castro, E.S. Prieto, I. Santo et al. // J Clin Microbiol 2003; 41: 250-253/

113. Cox D.L., Luthra A., Dunham-Ems S., et al. Surface immunolabeling and consensus computational framework to identify candidate rare outer membrane proteins of *Treponema pallidum*. // Infection and immunity 2010; 78(12): 5178-5194.

114. Egglestone S.I. Serological diagnosis of syphilis. / S.I. Egglestone, A.J.L. Turner // *Commun Dis Public Health* 2000; 3: 158-162.
115. European Centre for Disease Prevention and Control. Sexually transmitted infections in Europe 1990–2010. // Stockholm: ECDC, 2012; URL: <http://www.cobas.com/home/news-room/news/syphilis-infections-in-europe.html#sthash.sbP6UCqM.dpuf>.
116. Goh B.T. European guidelines for the management of syphilis. / B.T. Goh, P.C. van Voorst Vader // *Int J STD AIDS* 2001; 12 (Suppl. 3): 63-68. URL: http://tutJ.Std/Aids_oct2004.v1253.
117. Goh B.T. Syphilis in adults. 2005. // *Sex Transm Infect* 2005; 81: 448-452. URL: <http://www.stijournal.com>.
118. Gomes E. Evaluation of the Bio-Rad BioPlex 2200 Syphilis Multiplex Flow Immunoassay for the Detection of IgG- and IgM-Class Antitreponemal Antibodies. / E. Gomes, D.J. Jespersen, J.A. Haring, M.J. Binniker // *Clin and Vaccin Immunol* 2010; 17(6): 966-968.
119. Haake D.A. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. // *Microbiology* 2000; 146 (7): 1491-1504.
120. Hagedorn H.J. et al. Evaluation of INNO-LIA syphilis assay as a confirmatory test for syphilis. / H.J. Hagedorn, A. Kraminer-Hagedorn, K. De Bosschere et al. // *J. Clin Microbiol* 2002; 40(3): 973-978.
121. Hemmings W.A. Motherfoetal transmission of immunoglobulins. // Cambridge, 1975.
122. Ho E.L. Syphilis: using modern approaches to understanding an old disease. / E.L. Ho, S.A. Lukehart // *J of Clin Invest* 2011 (Dec); 121 (12): 4584-4592.
123. Isinaga M. Clinical survey of syphilis at the Dermatological Clinic of Nippon Medical School Hospital from 1984 to 1988, with special reference to the recent clinical manifestation and evaluation of IgM antibodies to *Treponema pallidum*. / M. Isinaga, E. Sasaki // *J Dermatol* 1990; 17(10): 618-629.
124. Kern A. Fundamentals and prospects of syphilis serology. // *Dermatol Monatsschr* 1979; 165 (11): 769-782.

125. Kubanova A.A. On experience of application of immunoblotting technique in diagnosis of syphilis in the Russian Federation. / A.A. Kubanova, N.V. Frigo, S.V. Rotanov, V.G. Nesterenko // RECIPE 2005 (suppl.): 41-44 (Беларусь).
126. LaFond R.E. Biological Basis for Syphilis. / R.E. LaFond, S.A. Lukehart // Clin Microbiol Rev 2006 (Jan); 19(1): 29-49.
127. Larsen S.A. Laboratory diagnosis and interpretation of test for syphilis. / S.A. Larsen, B.M. Steiner, A.H. Rudolph // Clin Microbiol Rev 1995; 8 (1): 1-21.
128. Larsen S.A. Manual of tests for syphilis. 9-th Ed. / S.A. Larsen (Ed.), V. Pope, R.E. Johnson, E.J. Kennedy // Washington: DC, American Health Association, 1998.
129. Lefevre J.-C. Evaluation of Capture Enzyme Immunoassays for Detection Immunoglobulins G and M to *Treponema pallidum* in Syphilis. / J.-C. Lefevre, M.-A. Bertrand, R. Bauriaud // J Clin Microbiol 1990; 28(8): 1704-1707.
130. Lewis L.L. Evaluation of immunoglobulin M Western blot analysis in diagnosis of congenital syphilis. / L.L. Lewis, L.H. Taber, R.E. Baughn // J Clin Microbiol 1990; 28: 296-302.
131. Luger A. Serological diagnosis of syphilis; current methods. // In Young H., McMillan A. (Eds.). Immunological diagnosis of sexually transmitted diseases. N-Y: Marcel Dekker, 1998: 249-274.
132. Ly T.D. Evaluation of four fulli-automated immunoassays for diagnosis of syphilis. / T.D. Ly, C. Marcenaro, M. Dautigny // 20th Eur Congress of Clin Microbiol and Infect Dis 2010. URL: http://registration.akm.ch/2010eccsmit_einsicht.php?XNABSTRACT_ID=99115&XNSPRACHE_ID2.
133. Maple P.A.C. Characterization of *Treponema pallidum* Particle Agglutination Assay-Negative Sera following Screening by Treponemal Total Antibody Enzyme Immunoassays. / P.A.C. Maple, D. Ratcliffe, E. Smit // Clin & Vaccine Immunol 2010 (Nov): 1718-1722.
134. Mayer M.P. Analysis of Western Blotting (Immunoblotting) Technique

in Diagnosis of Congenital Syphilis. / M.P. Mayer, T. Eddy, R.E. Baughn // J Clin Microbiol 1994; 32(3): 629-633.

135. McElborough D.J. Guidelines for serological testing for syphilis. / D.J. McElborough // Sex Transm Infect 2001; 77 (1): 79-85.

136. McGill M.A. Characterization and Serologic Analysis of the *Treponema pallidum* Proteome. / M.A. McGill, D.G. Edmondson, J.A. Carroll et al. // Infection and immunity 2010; 78 (6): 2631-2643.

137. McMillan A. Qualitative and quantitative aspects of serologic diagnosis of syphilis. / A. McMillan, H. Young // Int J STD AIDS 2008; 19: 620-624.

138. Merlin S. Importance of specific IgM antibodies in 116 patients with various stages of syphilis. / S. Merlin, J. Andre, B. Alacoque et al. // Genitourin Med 1985; 61(2): 82-87.

139. Miyakawa H. False positive reaction in ELISA for IgM class anti-M2 antibody and its prevention. / H. Miyakawa, N. Kawaguchi, K. Kikuchi et al. // Hepatol Res 2001; 20(3): 279-287.

140. Moskophidis M. Analysis of the humoral immune response to *Treponema pallidum* in the different stages of untreated human syphilis. / M. Moskophidis // Zentralbl Bakteriol 1989; 271(2): 171-179.

141. Moskophidis M. Molecular analysis of immunoglobulins M and G immune response to protein antigens of *Treponema pallidum* in human syphilis. / M. Moskophidis, F. Muller // Infect Immun 1984; 43(1): 127-132.

142. Muller F., Hagedorn H.J. Syphilis. In: Thomas L. (Editor) Clinical Laboratory Diagnostics. // TH Books Frankfurt, 1998: 1203-1212.

143. Muller F. Evaluation of an enzyme immunoassay for IgM antibodies to *Treponema pallidum* in syphilis in man. / F. Muller, M. Moskophidis // Brit J vener Dis 1984; 60: 288-292.

144. O'Naill P. IgM class antitreponemal antibody in treated and untreated syphilis. / P. O'Naill, C.S. Nicol // Brit J Vener Dis 1972; 48: 460-463.

145. Pedersen N.S. Enzyme-linked Immunosorbent Assays for Detection of Immunoglobulin M to Nontreponemal and Treponemal Antigens for the Diagnosis

of Congenital Syphilis. / N.S. Pedersen, J.P. Sheller, A.V. Ratnam, S.K. Hira // J Clin Microbiol 1989; 27(8): 1835-1840.

146. Ratnam S. The laboratory diagnosis of syphilis. // Can J Infect Dis Med Microbiol 2005; 16 (1): 45-51.

147. Rostopira N. Elaboration of Enzyme Immunoassay based on recombinant antigens and intended for diagnostics of syphilis. / N. Rostopira, L. Tkachikova, G. Rayevska et al. // Folia Microbiol 2003; 48 (4): 549-53.

148. Schmidt B.L. Spezifische IgM-Teste in der Syphilis-Diagnose. / B.L. Schmidt, A. Luger, P. Duschet et al. // Hautarzt 1994; 45(10): 685-689.

149. Schmidt B.L. Comparative evaluation of nine different enzyme-linked immunosorbent assays for determination of antibodies against *Treponema pallidum* in patients with primary syphilis. / B.L. Schmidt, M. Edjlalipour, A. Luger // J Clin Microbiol 2000; 38(3): 1279-1282.

150. Schmitz J.L. Laboratory diagnosis of congenital syphilis by immunoglobulin M (IgM) and IgA Immunoblotting. / J.L. Schmitz, K.S. Gertis, C. Mauney et al. // Clin Diagn Lab Immunol 1994; 1: 32-37.

151. Seña A.C. Novel *Treponema pallidum* Serologic Tests: A Paradigm Shift in Syphilis Screening for the 21st Century. / A.C. Seña, B.L. White, P.F. Sparling // Clin Infect Dis 2010; 51(15): 700-708.

152. Sexually Transmitted Infections: UK National Screening and Testing Guidelines. / Screening Guideline Steering Group, BASHH Clinical Effectiveness Group. London, 2006. URL: <http://www.sti.org/guidelines/2006>.

153. Tomson F.L. Assessment of cell-surface exposure and vaccinogenic potentials of *Treponema pallidum* candidate outer membrane proteins. / F.L. Tomson, P.G. Conley, M.V. Norgard et al. // Microbes and infection 2007; 9(11): 1267-1275.

154. UK National Guidelines on the Management of Syphilis, 2008. // (<http://www.bashh.org/documents/1879>).

155. Wang L.N. (Sensitivity and specificity of ELISA based on recombinant *Treponema pallidum* antigen and rapid plasma reagin test in diagnosis of syphilis:

a comparative study). / L.N. Wang, H.Y. Zheng, J. Li et al. // *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2007 (Jun); 87 (24): 1721-1722.

156. Wilkinson A.E. IgM-FTA test in treated in adults: its relation to clinical findings. / A.E. Wilkinson, P. Rodiv // *Brit J Venereal Dis* 1976; 52: 219-223.

157. Zrein M. Recombinant antigen-based enzyme immunoassay for screening of *Treponema pallidum* antibodies in blood bank routine. / M. Zrein, I. Maure, F. Boursier, L. Soufflet // *J Clin Microbiol* 1995; 33(3): 525-527.

158. Young H. Syphilis: new diagnostic directions. // *Int J of STD AIDS* 1992; 3: 391-413.

159. Young H. Guidelines for serologic testing for syphilis. // *Sex Transm Inf* 2000; 76: 403-405.

160. Young H. A new recombinant latex agglutination test (Syphilis Fast) for the rapid serological diagnosis of syphilis. / H. Young, A. Moyes, I. de Ste Croix, A. McMillan // *Int J STD AIDS* 1998; 9: 196-200.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Приложение 1.

ВОПРОСЫ АНКЕТЫ

об использовании современных иммунологических методов исследования для ранней диагностики клинических форм сифилиса в медицинских организациях субъектов Российской Федерации по профилю дерматовенерология

Уважаемые коллеги!

Для оценки эффективности и повышения качества оказания населению Российской Федерации специализированной медицинской помощи по профилю «дерматовенерология» по выявлению сифилитической инфекции просим Вас ответить на вопросы анкеты 2013 года:

1. Раздел вопросов для врачей клинической диагностической (серологической лаборатории)

1.1. Какие из перечисленных методов исследования для диагностики сифилиса применяются в серологической лаборатории Вашего учреждения (отметьте «Да» или «Нет» в соответствующей графе)

Темно- поль- ная микро- скопия	ПЦР	РМП	RPR	РСКк	РСКт	ИФА			РПГА	РИФ IgG		РИФ IgM	РИТ	Имму- но- блот- тинг IgG	Имму- но- блот- тинг IgM	Им- муно- хеми- люми- нес- цен- ция
						IgG+ M+A	IgG	IgM		abc	200					

1.2. Укажите количество исследований по диагностике и выявлению сифилиса, проведенных в **2012 году** в серологической лаборатории Вашего учреждения, **ВСЕГО** (включая прямые и непрямые методы исследования, не-трепонемные и трепонемные тесты):

- 1.3.** Укажите общее количество исследований по диагностике и выявлению сифилиса, выполненных в **2012 году** каждым методом в серологической лаборатории Вашего учреждения (напишите цифрой в каждой графе, соответствующей методу исследования)

Темно- поль- ная микро- скопия	ПЦР	РМП	RPR	РСК _к	РСК _т	ИФА			РПГА	РИФ IgG		РИФ IgM	РИТ	Имму- но- блот- тинг IgG	Имму- но- блот- тинг IgM	Им- муно- хеми- люми- нес- ценция
						IgG+ M+A	IgG	IgM		abc	200					

- 1.4.** Укажите количество исследований по диагностике и выявлению нейросифилиса, проведенных в **2012 году** в серологической лаборатории Вашего учреждения, **ВСЕГО** (включая серологические и клинические методы исследования (цитоз, белок):

из них положительных (или выше нормы)

- 1.5.** Укажите общее количество обслуживаемых лабораторией лечебных подразделений своего учреждения (проставить цифрой)

--

- 1.6.** Укажите *количество* (цифрой) видов медицинских изделий (тест-систем, наборов реagens, диагностикумов) для диагностики сифилиса, используемых в серологической лаборатории Вашего учреждения в повседневной практике

--

2.4. Какие *виды лабораторных исследований* используются в учреждении при клинико-серологическом наблюдении пациентов, получивших специфическое лечение по поводу сифилиса?

(отметьте «Да» или «Нет» в соответствующей графе)

Исходный клинический диагноз сифилис:	РМП	RPR	PCKк	PCKт	ИФА			РПГА	РИФ IgG		РИФ IgM	РИТ	Иммуно- блот- тинг IgG	Имму- ноб- лотт-инг IgM	Им- муно- хеми- люми- нес- ценция
					IgG+ M+A	IgG	IgM		abc	200					
превентивное лечение															
первичный															
вторичный															
скрытый ранний															
скрытый неуточненный как ранний или поздний															
скрытый поздний															
врожденный															

**Спасибо за участие в проведении исследования и
ответы на вопросы анкет !**

Данные о числе вновь выявленных случаев заболевания ранними формами сифилиса и количестве проведенных лабораторных исследований для диагностики сифилиса в медицинских организациях дерматовенерологического профиля субъектов Российской Федерации в 2012 году

Субъект Российской Федерации	Число вновь выявленных случаев больных ранними формами сифилиса в 2012 году				
	первичный	вторичный	скрытый ранний	ранний врожд.	всего
Белгородская обл.	23	30	98	0	151
Брянская обл.	30	80	209	0	319
Владимирская обл.	21	64	132	0	217
Воронежская обл.	12	38	184	1	235
Ивановская обл.	38	108	199	0	345
Калужская обл.	4	15	34	1	54
Костромская обл.	17	41	47	1	106
Курская обл.	34	145	226	1	406
Липецкая обл.	27	104	270	1	402
Московская обл.					
Орловская обл.	35	51	118	1	205
Рязанская обл.	12	17	166	2	197
Смоленская обл.	25	70	184	1	280
Тамбовская обл.	27	46	139	0	212
Тверская обл.					
Тульская обл.	37	108	204	2	351
Ярославская обл.	23	70	221	2	316
Москва					
ВСЕГО ЦФО	365	987	2 431	13	3 796
Республика Карелия	11	15	26	1	53
Республика Коми	23	68	94	1	186
Архангельская обл.					
Ненецкая АО					
Вологодская обл.					
Калининградская обл.	35	72	284	3	394
Ленинградская обл.	9	134	81	0	224
Мурманская обл.	11	26	109	1	147
Новгородская обл.					
Псковская обл.	10	25	91	0	126
Санкт-Петербург					
ВСЕГО СЗФО	162	432	833	6	1 130

Субъект Российской Федерации	Число вновь выявленных случаев больных ранними формами сифилиса в 2012 году				
	первичный	вторичный	скрытый ранний	ранний врожд.	всего

Респ. Адыгея					
Респ. Калмыкия					
Краснодарский край					
Астраханская обл.					
Волгоградская обл.	17	62	177	0	256
Ростовская обл.	62	179	330	2	573
ВСЕГО ЮВО	79	241	507	2	829
Республика Дагестан	6	23	60	0	89
Респ. Ингушетия					
Кабард.-Балк. респ.	11	51	119	0	181
Р. Карач-Черкессия	30	28	26	0	84
Р. С-Осетия Алания	7	25	91	3	126
Чеченская респ.	4	43	60	1	108
Ставропольск. край	20	113	199	2	334
ВСЕГО СКВО	78	283	555	6	922
Р. Башкортостан	58	402	577	0	1037
Р. Марий-Эл	38	55	186	0	279
Р. Мордовия	21	58	96	5	180
Р. Татарстан					
Удмуртская респ.	122	305	404	2	833
Чувашская респ.	66	106	132	1	305
Кировская обл.	238	400	960	0	1598
Нижегородская обл.	64	200	162	1	427
Оренбургская обл.	69	207	431	1	708
Пермский край	63	183	356	0	602
Пензенская обл.	14	27	180	0	221
Самарская обл.					
Саратовская обл.					
Ульяновская обл.	25	27	149	1	202
ВСЕГО ПрФО	778	1 970	3 633	11	6 392

Субъект Российской Федерации	Число вновь выявленных случаев больных ранними формами сифилиса в 2012 году				
	первичный	вторичный	скрытый ранний	ранний врожд.	всего

Курганская обл.					
Свердловская обл.					
Тюменская обл.	46	86	138	0	270
Ханты-Манс. АО	35	372	150	0	557
Ям-Ненецк АО Югра	22	162	67	0	251
Челябинская обл.	89	76	330	1	496
ВСЕГО УФО	192	696	685	1	1 574
Республика Алтай	21	19	64	0	104
Р. Бурятия	133	181	392	2	708
Р. Тува	46	325	239	1	611
Р. Хакасия	62	90	229	3	384
Алтайский край	113	281	522	3	919
Забайкальский край	88	126	407	5	626
Красноярский край					
Иркутская обл.	289	683	828	4	1804
Кемеровская обл.					
Новосибирская обл.	130	262	589	4	985
Омская обл.	26	294	242	2	564
Томская обл.					
ВСЕГО СФО	908	2 261	3 512	24	6 705
Респ. Якутия (Саха)	52	147	235	0	434
Камчатский край	2	68	77	0	147
Приморский край	204	304	708	7	1223
Хабаровский край	138	357	317	1	813
Амурская обл.					
Магаданская обл.	2	8	6	0	16
Сахалинская обл.	42	69	114	1	226
Еврейская АО	38	54	101	1	194
Чукотский АО					
ВСЕГО ДВФО	478	1 007	1 558	10	3 053
ВСЕГО РОССИЯ	3 040	7 877	13 714	73	24 401

Примечание: и выделение цветом данных **ВСЕГО** по **ФО** или **РФ**
 выделение цветом отсутствие данных по **ФО**

Количество иммунохимических исследований, проведенных в медицинских организациях дерматовенерологического профиля субъектов России в 2012 году											
Всего (РСКтр, ИФА, РПГА, РИФ, РИБТ ИБ)	Методом ИФА				Методом РИФ				Методом ИБ		
	ИФА (сум)	ИФА -IgG	ИФА -IgM	всего	РИФ абс	РИФ 200	РИФ IgM	всего	ИБ IgG	ИБ IgM	всего
321 481	125 403	520	18	125 941	260	260	0	520	0	0	0
247 646	1 217	0	1 217	2 434	1 348	1 348	0	2 696	0	0	0
142 996	0	499	500	999	2 708	2 708	0	5 416	0	0	0
54 705	4 500	1 500	3 670	9 670	1 807	1 807	0	3 614	24	0	24
30 091	5 809	817	828	7 454	50	0	0	50	0	0	0
144 079	3 397	3 397	3 397	10 191	0	0	0	0	0	0	0
183 719	28 126	623	623	29 372	830	823	0	1 653	0	0	0
301 199	89 621	14 314	2 035	105 970	210	0	0	210	101	0	101
269 258	112 151	0	488	112 639	945	945	0	1 890	0	0	0
102 808	3 450	40	59	3 549	4 905	4 905	40	9 850	0	0	0
403 969	23 622	3 877	1 862	29 361	1 562	0	0	1 562	16	16	32
128 886	34 307	0	2 494	36 801	1 141	0	0	1 141	0	0	0
408 881	74 777	1 500	500	76 777	14 952	14 952	500	30 404	0	0	0
359 675	132 836	18 744	8 872	160 452	2 681	2 681	0	5 362	24	0	24
175 632	73 758	2 963	2 901	79 622	2 957	2 957	0	5 914	0	0	0
3 275 025	712 974	48 794	29 464	791 232	36 356	33 386	540	70 282	165	16	181
51 554	9 177	0	0	9 177	584	584	0	1 168	0	0	0
154 533	605	118	263	986	2 107	2 062	440	4 609	0	0	0
176 409	37 737	10 432	864	49 033	286	0	0	286	84	0	84
177 201	68 353	0	0	68 353	0	0	0	0	0	0	0
86 203	27 583	0	5 782	33 365	307	24	0	331	347	0	347
274 053	72 100	120	400	72 620	2 090	400	0	2 490	0	0	0
919 953	215 555	10 670	7 309	233 534	5374	3070	440	8 884	431	0	431

Количество иммунохимических исследований, проведенных в медицинских организациях дерматовенерологического профиля субъектов России в 2012 году											
Всего (РСКтр, ИФА, РПГА, РИФ, РИБТ ИБ)	Методом ИФА				Методом РИФ				Методом ИБ		
	ИФА (сум)	ИФА -IgG	ИФА -IgM	всего	РИФ абс	РИФ 200	РИФ IgM	всего	ИБ IgG	ИБ IgM	всего
144 432	12 254	5 945	1 564	19 763	2 077	2 077	0	4 154	0	0	0
425 402	152 364	2 449	1 901	156 714	2 698	729	0	3 427	12	12	24
566 369	164 618	8 394	3 465	176 477	4 775	2 806	0	7 581	12	12	24
1 294 515	1 058	0	0	1 058	1 592	1 592	0	3 184	0	0	0
257 481	1 048	0	0	1 048	0	0	0	0	0	0	0
121 456	0	888	888	1 776	0	0	0	0	0	0	0
300 442	1 290	0	0	1 290	0	0	0	0	0	0	0
21 823	15 360	0	0	15 360	0	0	0	0	0	0	0
149 264	12 755	0	3 981	16 736	0	0	0	0	21	0	21
2 140 628	31 511	888	4 869	37 268	1 592	1 592	0	3 184	21	0	21
68 330	0	3 569	2 638	6 207	2 644	0	0	2 644	0	0	0
267 933	4 520	1 352	2 152	8 024	490	490	0	980	451	412	863
139 871	17 131	5 627	5 627	28 385	1 419	1 420	0	2 839	0	0	0
330 974	159 055	16 652	7 721	183 428	3 126	0	0	3 126	11	11	22
661 394	79 834	6 100	6 100	92 034	6 100	0	0	6 100	0	0	0
134 724	44 018	4 025	1 349	49 392	4 550	0	0	4 550	400	289	689
207 411	59 837	5 160	5 160	70 157	0	0	0	0	0	0	0
658 397	28 090	580	578	29 248	163	0	0	163	0	0	0
117 790	55 648	7 598	4 256	67 502	2 877	0	0	2 877	0	0	0
421 783	233 275	8 795	8 795	250 865	1 255	1 255	0	2 510	179	297	3 706
166 563	0	2 766	2 766	5 532	2 375	2 375	2 375	7 125	0	0	0
3 128 028	681 408	62 224	47 142	790 774	24 999	5 540	2 375	32 914	1 041	1 009	2 050

Количество иммунохимических исследований, проведенных в медицинских организациях дерматовенерологического профиля субъектов России в 2012 году											
Всего (РСКтр, ИФА, РПГА, РИФ, РИБТ ИБ)	Методом ИФА				Методом РИФ				Методом ИБ		
	ИФА (сум)	ИФА -IgG	ИФА -IgM	всего	РИФ абс	РИФ 200	РИФ IgM	всего	ИБ IgG	ИБ IgM	всего
134 489	20 147	12 218	5 782	38 147	3 759	3 759	0	7 518	0	0	0
12 155	0	2 221	406	2 627	1 241	0	0	1 241	75	70	145
8 212	0	346	0	346	0	0	0	0	0	0	0
123 843	43 884	348	373	44 605	226	226	0	452	0	0	0
272 138	64 031	15 133	6 561	85 725	5 226	3 985	0	9 211	75	70	145
32 043	7 664	2 858	1 429	11 951	0	0	0	0	0	0	0
176 874	7 701	1 542	1 542	10 785	385	385	0	770	0	0	0
241 562	18 448	5 060	5 060	28 568	225	0	0	225	0	0	0
115 211	23 775	8 976	8 976	41 727	638	0	0	638	0	0	0
92 524	65 715		1 520	67 235	591	591	0	1 182	0	0	0
132 266	17 809	6 999	6 999	31 807	0	0	0	0	0	0	0
119 901	11 147	7 663	3 458	22 268	180	29	0	209	97	10	107
337 773	239 870	18 230	7 766	265 866	18 053	0	0	18 053	0	0	0
182 458	53 644	7 293	7 059	67 996	0	7 674	0	7 674	327	49	376
1 430 612	445 773	58 621	43 809	548 203	20 072	8 679	0	28 751	424	59	483
33 458	0	6 950	4 963	11 913	0	0	0	0	40	40	80
121 299	37 110	2 574	2 574	42 258	0	0	0	0	237	11	248
74 787	22 808	6 086	6 086	34 980	4 054	4 051	0	8 105	0	0	0
405 845	195 470	0	0	195 470	2 514	2 514	0	5 028	0	0	0
81 167	672	1 830	1 130	3 632	0	0	0	0	0	0	0
407 944	0	3 033	3 033	6 066	996	0	0	996	0	0	0
36 737	13 793	2 474	2 474	18 741	0	0	0	0	0	0	0
161 237	269 853	22 947	20 260	313 060	7 564	6 565	0	14 129	277	51	328
12 893 990	2 585 723	227 671	62 879	2 976 273	105 958	65 623	3 355	174 936	2 446	1 217	3 663

**Медицинское изделие «Набор реагентов
«Антипаллидум-Флюороген-IgM/IgG». Диагностикум
для выявления антител классов М и G к *Treponema pallidum*
в реакции иммунофлюоресценции»
по Техническим условиям ТУ 9398-128-70423725-2011»
производства ЗАО «ЭКОлаб» (г. Электрогорск)**

комплект 1: «Антипаллидум-Флюороген IgM», диагностикум для выявления антител класса М к *Treponema pallidum* в реакции иммунофлюоресценции»



комплект 2: «Антипаллидум-Флюороген IgG», диагностикум для выявления антител класса G к *Treponema pallidum* в реакции иммунофлюоресценции»



Инструкция по применению медицинского изделия
«Набор реагентов «Антипаллидум-Флюороген-IgM/IgG»; комплект 1: «Антипаллидум-Флюороген IgM»,
Диагностикум для выявления антител класса М к *Treponema pallidum* в реакции иммунофлюоресценции» - стр. 1 и 2

ЗАО "ЭКОлаб"
<p>ИНСТРУКЦИЯ по применению набора реагентов</p> <p>"Антипаллидум-Флюороген-IgM"</p> <p>Диагностикум для выявления антител класса М к <i>Treponema pallidum</i> в реакции иммунофлюоресценции</p> <p>Регистрационное удостоверение № от "..." 20__ г.</p>
ЗАО "ЭКОлаб"

НАЗНАЧЕНИЕ		
Выявление в реакции иммунофлюоресценции (РИФ) антител класса М к <i>Treponema pallidum</i> в сыворотке (плазме) крови (модификация РИФ _{abc}) и спинно-мозговой жидкости человека (модификация РИФ _d). Рекомендуется для подтверждения результатов отборочных тестов и специфической серодиагностики сифилиса.		
СОСТАВ И КОМПЛЕКТАЦИЯ НАБОРА		
Антиген <i>Treponema pallidum</i> на стекле предметном	инактивированные <i>Treponema pallidum</i> (штамм Nicols), фиксированные в лунках предметных стекол	8 шт.
ФИТЦ-конъюгат-IgM	козы антитела к IgM человека, меченные флюоресцеин-5-изотиоцианатом (ФИТЦ); прозрачная жидкость с желтоватым оттенком или пористая аморфная масса белого или желтоватого цвета, после восстановления - прозрачная жидкость с желтоватым оттенком	2,2 мл в 1 фл или по 1,1 мл в 2 фл.
Контрольный положительный образец (К⁺)	сыворотка крови человека, содержащая антитела класса М к <i>Treponema pallidum</i> , инaktivированная; прозрачная бесцветная или слабо желтого цвета жидкость	0,25 мл в 1 фл.
Контрольный отрицательный образец (К⁻)	сыворотка крови человека, не содержащая антитела к <i>Treponema pallidum</i> , инaktivированная; прозрачная бесцветная или слабо желтого цвета жидкость	0,25 мл в 1 фл.
РФ-сорбент	козы антитела к IgG человека - прозрачная жидкость с желтоватым оттенком или пористая аморфная масса белого или желтоватого цвета, после восстановления - мутная, бесцветная жидкость	4,5 мл в 1 фл. или по 2,3 мл в 2 фл.
Ультрасорбент	лиофилизированный солевой экстракт из культуральных бледных трепонем (штаммы V, VII, VIII, IX и Рейтера), дезинтегрированных ультразвуком; пористая аморфная масса светло-серого цвета, после восстановления - мутная бесцветная жидкость	10 мл в 1 фл.
Разводящий буферный раствор (РБР)	прозрачная бесцветная жидкость	12,0 мл в 1 фл
Монтирующая жидкость	прозрачная бесцветная вязкая жидкость	2,0 мл в 1 фл.
Концентрат отмывающего раствора [(OP)к]	прозрачная, слегка опалесцирующая жидкость, возможно выпадение осадка солей белого цвета, растворяющегося при температуре 37 °С в течение 30 мин	80 мл в 1 фл. или по 40 мл в 2 фл.

Инструкция по применению медицинского изделия
«Набор реагентов «Антипаллидум-Флюороген-IgM/IgG»; комплект 1: «Антипаллидум-Флюороген IgM»,
Диагностикум для выявления антител класса М к *Treponema pallidum* в реакции иммунофлюоресценции» - стр. 3 и 4

Набор может быть дополнительно укомплектован вспомогательным планшетом для предварительного разведения образцов (1 шт).

Компоненты набора упакованы в коробку, в коробку вложена инструкция по применению.

Запрещается использование предметных стекол с антигеном, контрольных образцов, ФИТЦ-конъюгата, ультрасорбента, РФ-сорбента из разных серий наборов. Остальные реагенты могут быть использованы для всех постановок РИФ.

По желанию потребителя базовая комплектация набора (число индивидуальных упаковок с реагентами и их объемы) может быть изменена.

ОСНОВНЫЕ ПОТРЕБИТЕЛЬСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Базовый вариант комплектации рассчитан на исследование 80 образцов, включая контрольные (на контрольные образцы используется 2 лунки). Возможно проведение отдельных исследований с использованием необходимого количества предметных стекол:

Число предметных стекол	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Число иссл. обр.	1-8	9-18	19-28	29-38	39-48	49-58	59-68	69-78	79-88	89-98

ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Используется метод непрямого иммунофлюоресцентного анализа.

При выявлении антител класса М к *Treponema pallidum* в модификации РИФ_{абс} исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови предварительно обрабатываются ультрасорбентом (для удаления из образца групповых антител к йерсиниозным трепонемам и исключения ложноположительного результата за счет неспецифической перекрестной реакции).

Далее исследуемые образцы обрабатываются РФ-сорбентом для предотвращения возможного влияния ревматоидного фактора класса М и исключения вытеснения специфических антител класса М антителами класса G, что может привести к получению ложноположительного и соответственно ложноотрицательного результатов.

При наличии в предварительно исследуемых образцах антител к *Treponema pallidum* они связываются с антигеном на предметном стекле. После введения в реакционную смесь ФИТЦ-конъюгата образуются комплексы "антиген-антитело к *Treponema pallidum*-антитело конъюгата", наличие которых определяется по флюоресценции (желто-зеленое свечение *Treponema pallidum*) при просмотре стекол в люминесцентном микроскопе.

ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Исследуется сыворотка (плазма) крови человека и спинно-мозговая жидкость человека.

3

Не допускается исследование образцов с признаками липемии, гемолиза и желтухи, образцов с микробной контаминацией, образцов, подвергшихся многократному замораживанию и оттаиванию, поскольку могут возникнуть неспецифичные результаты.

Допускается исследование гепаринизированных образцов и образцов с ЭДТА.

Допускается исследование сыворотки (плазмы) крови, инактивированной прогреванием при 56°C в течение 30 минут. Образцы СМЖ не инактивируют.

Образцы, содержащие взвешенные частицы, могут дать некорректный результат. Такие образцы перед использованием следует центрифугировать 10-15 мин при 3000 об/мин.

Перед исследованием образцы могут храниться до 7 сут при температуре от 2 до 8 °С и до 3 мес при температуре минус 20 °С.

Разведенные образцы могут храниться при температуре от 2 до 8 °С не более 8 ч.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Диагностическая специфичность при определении на образцах сывороток доноров крови, не содержащих иммуноглобулины класса М к *Treponema pallidum* – 100%.

Диагностическая чувствительность при определении на клинических образцах сывороток больных сифилисом, содержащих иммуноглобулины класса М к *Treponema pallidum* – 95 %.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ОСНОВНЫЕ ПРАВИЛА РАБОТЫ С НАБОРОМ

Набор биологически безопасен, однако с исследуемыми образцами необходимо обращаться как с потенциально инфицированным материалом.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

Оборудование и материалы

Цилиндр мерный.

Емкость Коллина или аналогичная для отмывки предметных стекол.

Микропробирки для разведения проб (при отсутствии в комплекте вспомогательного планшета).

Покровные стекла (24x60 мм).

Микропипетки (10-1000мкм) с наконечниками.

Таймер.

Влажная камера (емкость с крышкой и с фильтровальной бумагой или марлей, смоченной водой, на дне).

Емкость полистиленовая для промывания с канюлей.

Термостат на 37°C

Микроскоп люминесцентный с ртутно-кварцевой лампой и иммерсионной системой, фильтрами СЗС-7 или СЗС-14, ФС-1, БС-8 и ЖС-18.

Вода очищенная (дистиллированная или деионизированная).

Спирт этиловый ректификованный (96 %).

4

Инструкция по применению медицинского изделия
«Набор реагентов «Антипаллидум-Флюороген-IgM/IgG»; комплект 1: «Антипаллидум-Флюороген IgM»,
Диагностикум для выявления антител класса М к *Treponema pallidum* в реакции иммунофлюоресценции» - стр. 5 и 6

Подготовка реагентов и материалов

Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все реагенты перед проведением анализа не менее 30 мин при температуре от 20 до 25 °С.

Приготовление отмывающего раствора (ОР)

(ОР)_к интенсивно перемешать (в случае выпадения осадка – прогреть при температуре 37 °С в течение 30 мин до полного растворения солей).

80 мл (ОР)_к растворить в 1,92 л воды очищенной.

При дробном использовании набора развести концентрат водой очищенной в 25 раз, используя объемы концентрата и воды, указанные в табл. 1 для заданного числа предметных стекол.

Таблица 1

Число предм. стекол	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
(ОР) _к , мл	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80
Вода очищ. мл	до 200	до 400	до 600	до 800	до 1000	до 1200	до 1400	до 1600	до 1800	до 2000

Допускается хранение раствора в течение 14 сут при температуре от 2 до 8 °С и до 7 сут при температуре от 18 до 25 °С.

Растворение сухого РФ-сорбента

Содержимое флакона с лиофильно-высушенным РФ-сорбентом растворить в 2,3 мл воды очищенной.

Допускается хранение раствора в течение 1 мес при температуре от 2 до 8 °С.

Приготовление раствора ультрасорбента

Содержимое флакона растворить в 10,0 мл РБР.

Допускается хранение раствора в течение 1 мес при температуре от 2 до 8 °С.

Растворение сухих конъюгатов

Сухой ФИТЦ-конъюгат растворить, добавив во флаконы по 1,1 мл воды очищенной.

Допускается хранение раствора в течение 1 мес при температуре от 2 до 8 °С.

Подготовка исследуемых образцов

Развести исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови раствором ультрасорбента в соотношении 1:5 (10 мкл образца внести в 40 мкл раствора ультрасорбента). При комплектации набора планшетом для предварительного разведения рекомендуется разводить образцы в нем. Инкубировать 10-15 мин при комнатной температуре.

К полученному объему разведенного образца добавить 50 мкл РФ-сорбента и тщательно перемешать. Инкубировать в течение 15 мин при комнатной температуре. Для анализа использовать надосадочную жидкость (супернатант).

Внимание! Образцы СМЖ (ликворы) не требуют разведения.

5

Подготовка других реагентов

Контрольные образцы, РБР, монтирующая жидкость, жидкие конъюгат и РФ-сорбент готовы к применению.

Проведение анализа

Внимание!

Во время работы со стеклами допускается держать их только за маркированный участок или края. Не допускайте прикосновения к лункам!

Непосредственно перед постановкой проверить целостность вакуумной упаковки (использование стекол с нарушенной вакуумной упаковкой не допускается!), извлечь необходимое число стекол и промаркировать их.

Рекомендуемая схема постановки

1 лунка – К ⁺
2 лунка – К ⁻
3-10 лунки – исследуемые образцы сыворотки (плазмы), обработанные ультрасорбентом и РФ-сорбентом.

1. Осторожно внести по 25 мкл контрольных и подготовленных исследуемых образцов в соответствующие лунки (полностью покрывая поверхность лунки и не касаясь кончиком пипетки поверхности стекла). Поместить предметные стекла во влажную камеру.

Инкубировать 45 мин при температуре 37 °С.

Внимание! Не допускать пересыхания лунок во время инкубаций!

2. Осторожно, пользуясь емкостью для промывания с канюлей, один раз промыть предметное стекло ОР. Для предупреждения перекрестной контаминации избегайте промывания одной лунки через другую, промывайте, направляя струю ОР от средней линии предметного стекла последовательно вдоль обоих рядов и не фокусируя ее непосредственно на лунках.

После этого 3 раза промыть предметное стекло ОР в емкости Коплина или аналогичной, предназначенной для отмывки предметных стекол, выдерживая их в ОР при каждой промывке 5 мин и меняя ОР после каждой промывки. Предметное стекло при промывке должно быть полностью погружено в раствор.

Стряхнуть избыток ОР с предметного стекла, нижнюю сторону его осторожно протереть фильтровальной бумагой для удаления влаги.

3. На препараты нанести по 25 мкл ФИТЦ-конъюгата-IgM и вновь поместить стекла во влажную камеру.

Инкубировать 30 мин при температуре 37°С в темноте.

4. Промыть стекло, как указано в п. 2. Нанести на предметное стекло по средней линии (между лунками) монтирующую жидкость, затем сверху осторожно положить покрывное стекло, избегая возникновения под ним пузырьков воздуха и убрать излиш-

6

Инструкция по применению медицинского изделия
«Набор реагентов «Антипаллидум-Флюороген-IgM/IgG»; комплект 1: «Антипаллидум-Флюороген IgM»,
Диагностикум для выявления антител класса М к *Treponema pallidum* в реакции иммунофлюоресценции» - стр. 7 и 8

ки монтирующей жидкости фильтровальной бумагой. Провести микроскопию препарата под люминесцентным микроскопом при общем увеличении 400х-1000х.

Учет результатов

Результаты учитывать по наличию и интенсивности желто-зеленого свечения клеток *Treponema pallidum* в поле зрения микроскопа, используя шкалу интенсивности, приведенную в табл. 2.

Таблица 2

Шкала интенсивности свечения	
Характер свечения	Запись результата
Блестящее зелено-желтое свечение	(4+)
Яркое свечение	(3+)
Слабое свечение	(2+)
Трепонемы в препарате окрашены интенсивнее фона	(1+)
Полное отсутствие свечения	(-)

Примечание: Различные оптические системы могут давать различия в интенсивности свечения до 1+ и более, поэтому интенсивность свечения следует рассматривать только как ориентировочный показатель титра.

Наличие и интенсивность свечения в лунках с исследуемыми образцами можно оценивать только при соблюдении следующих условий:

Свечение в лунке с К+ интенсивностью от 2+ до 4+ и полное отсутствие свечения в лунке с К-.

В противном случае исследование необходимо повторить.

Интерпретация результатов:

	Результат
Интенсивность свечения равна или выше 1+	Положительный (образец содержит соответствующие антитела к <i>Treponema Pallidum</i>)
Полное отсутствие свечения	Отрицательный (образец не содержит соответствующие антитела к <i>Treponema Pallidum</i>)

При более слабом свечении трепонем, которое не может быть идентифицировано по шкале интенсивности как 1+ результат следует считать сомнительным, и соответствующие образцы должны быть исследованы повторно. При повторном получении сомнительных результатов рекомендуется мониторинг антителообразования у пациента, чтобы исключить возможные неспецифические или перекрестные реакции.

СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности 1 год. Набор с истекшим сроком годности использованию не подлежит.

ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ

Хранение

В упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается.

После вскрытия упаковки неиспользованные реагенты хранить в плотно закупоренной таре при температуре от 2 до 8 °С до истечения срока годности набора.

Транспортирование

При температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается. Допускается транспортирование при температуре от 9 до 20 °С в течение 10 сут.

УСЛОВИЯ ОТПУСКА

Для учреждений здравоохранения.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться по адресу 142530 Московская обл., г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1, ЗАО "ЭКОлаб"; тел. (49643) 3-23-11, факс (49643) 3-30-93 – отдел сбыта, (49643) 3-37-30 – ОБТК

**КРАТКАЯ СХЕМА ПОСТАНОВКИ РИФ
(Антипаллидум-Флюороген-IgM)**

Подготовка образцов	Восстановление сухого ультрасорбента в 10 мл РБР Восстановление сухого РФ-сорбента в 2,3 мл воды очищенной Разведение исследуемых образцов сыворотки (плазмы) ультрасорбентом в 5 раз. Экспозиция 10-15 мин при комнатной температуре Разведение исследуемых образцов сыворотки (плазмы) РФ-сорбентом в 2 раза. Образцы СМЖ не разводятся. Экспозиция 15 мин при комнатной температуре
Нанести	На лунки по 25 мкл контрольных образцов и супернатанта исследуемых образцов сыворотки (плазмы) или неразведенных образцов СМЖ.
Инкубация	45 мин, 37 °С, во влажной камере
Промыть	1 раз ОР с помощью емкости для промывания с канюлей, далее 3 раза по 5 мин в ОР в емкости Коплина;
Нанести	На каждую лунку по 25 мкл ФИТЦ-конъюгата
Инкубация	30 мин, 37 °С, во влажной камере, в темноте
Промыть	1 раз ОР с помощью емкости для промывания с канюлей, далее 3 раза по 5 мин в ОР в емкости Коплина;
Нанести	Монтирующую жидкость, покровное стекло
Провести люминесцентную микроскопию (400х-1000х).	

Инструкция по применению медицинского изделия
«Набор реагентов «Антипаллидум-Флюороген-IgM/IgG»; комплект 2: «Антипаллидум-Флюороген IgG»,
Диагностикум для выявления антител класса М к *Treponema pallidum* в реакции иммунофлюоресценции» - стр. 1 и 2

ЗАО "ЭКОлаб"

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов

"Антипаллидум-Флюороген- IgG "

Диагностикум для выявления антител класса G
к *Treponema pallidum* в реакции иммунофлюоресценции

ЗАО "ЭКОлаб"
НАЗНАЧЕНИЕ

НАЗНАЧЕНИЕ		
Выявление в реакции иммунофлюоресценции (РИФ) антител класса М к <i>Treponema pallidum</i> в сыворотке (плазме) крови (модификация РИФа _{бс}) и спинно-мозговой жидкости человека (модификация РИФ _ц). Рекомендуется для подтверждения результатов отборочных тестов и специфической серодиагностики сифилиса.		
СОСТАВ И КОМПЛЕКТАЦИЯ НАБОРА		
Антиген <i>Treponema pallidum</i> на стекле предметном	инактивированные <i>Treponema pallidum</i> (штамм Nicols), фиксированные в лунках предметных стекол	8 шт.
ФИТЦ-конъюгат-IgM	козы антитела к IgM человека, меченные флюоресцеин-5-изотиоционатом (ФИТЦ); прозрачная жидкость с желтоватым оттенком или пористая аморфная масса белого или желтоватого цвета, после восстановления - прозрачная жидкость с желтоватым оттенком	2,2 мл в 1 фл или по 1,1 мл в 2 фл.
Контрольный положительный образец (К⁺)	сыворотка крови человека, содержащая антитела класса М к <i>Treponema pallidum</i> , инктивированная; прозрачная бесцветная или слабо желтого цвета жидкость	0,25 мл в 1 фл.
Контрольный отрицательный образец (К⁻)	сыворотка крови человека, не содержащая антитела к <i>Treponema pallidum</i> , инактивированная; прозрачная бесцветная или слабо желтого цвета жидкость	0,25 мл в 1 фл.
РФ-сорбент	козы антитела к IgG человека - прозрачная жидкость с желтоватым оттенком или пористая аморфная масса белого или желтоватого цвета, после восстановления – мутная, бесцветная жидкость	4,5 мл в 1 фл. или по 2,3 мл в 2 фл.
Ультрасорбент	лиофилизированный солевой экстракт из культуральных бледных трепонем (штаммы V, VII, VIII, IX и Рейтера), дезинтегрированных ультразвуком; пористая аморфная масса светло-серого цвета, после восстановления – мутная бесцветная жидкость	10 мл в 1 фл.
Разводящий буферный раствор (РБР)	прозрачная бесцветная жидкость	12,0 мл в 1 фл
Монтирующая жидкость	прозрачная бесцветная вязкая жидкость	2,0 мл в 1 фл.
Концентрат отмывающего раствора [(OP)к]	прозрачная, слегка опалесцирующая жидкость, возможно выпадение осадка солей белого цвета, растворяющегося при температуре 37 °С в течение 30 мин	80 мл в 1 фл. или по 40 мл в 2 фл.

Инструкция по применению медицинского изделия

«Набор реагентов «Антипаллидум-Флюороген-IgM/IgG»; комплект 2: «Антипаллидум-Флюороген IgG»,
 Диагностикум для выявления антител класса М к *Treponema pallidum* в реакции иммунофлюоресценции» - стр. 3 и 4

Монтирующая жидкость	прозрачная бесцветная вязкая жидкость	2,0 мл в 1 фл.
-----------------------------	---------------------------------------	----------------

Компоненты набора упакованы в коробку, в коробку вложена инструкция по применению.

Запрещается использование предметных стекол с антигеном, контрольных образцов, ФИТЦ-конъюгата, ультрасорбента из разных серий наборов. Остальные реагенты могут быть использованы для всех постановок РИФ.

По желанию потребителя базовая комплектация набора (число индивидуальных упаковок с реагентами и их объемы) может быть изменена.

ОСНОВНЫЕ ПОТРЕБИТЕЛЬСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Все базовые варианты комплектации рассчитаны на исследование 80 образцов, включая контрольные (на контрольные образцы используется 4 лунки). Возможно проведение отдельных исследований с использованием необходимого количества предметных стекол:

Число предметных стекол	1	2	3	4	5	6	7	8
Число иссл. обр.	1-6	7-16	17-26	27-36	37-46	47-56	57-66	67-76

ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Используется метод непрямого иммунофлюоресцентного анализа.

При выявлении антител класса G к *Treponema pallidum* в модификации РИФ_{abc} исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови предварительно обрабатываются ультрасорбентом (для удаления из образца групповых антител к непатогенным трепонемам и исключения ложноположительного результата за счет неспецифической перекрестной реакции).

При наличии в исследуемых образцах антител к *Treponema pallidum* они связываются с антигеном на предметном стекле. После введения в реакционную смесь ФИТЦ-конъюгата образуются комплексы "антиген-антитело к *Treponema pallidum*-антитело конъюгата", наличие которых определяется по флюоресценции (желто-зеленое свечение клеток *Treponema pallidum*) при просмотре стекол в люминесцентном микроскопе.

ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Исследуется сыворотка (плазма) крови человека и спинно-мозговая жидкость человека.

Не допускается исследование образцов с признаками липемии, гемолиза и желтухи, образцов с микробной контаминацией, образцов, подвергшихся многократному замораживанию и оттаиванию, поскольку могут возникнуть неспецифические результаты.

Допускается исследование гепаринизированных образцов и образцов с ЭДТА.

Допускается исследование сыворотки (плазмы) крови, инактивированной прогреваем при 56°C в течение 30 минут. Образцы СМЖ не инактивируют.

Образцы, содержащие взвешенные частицы, могут дать некорректный результат. Такие образцы перед использованием следует центрифугировать 10-15 мин при 3000 об/мин.

Перед исследованием образцы могут храниться до 7 сут при температуре от 2 до 8 °C и до 3 мес при температуре минус 20 °C.

Разведенные образцы могут храниться при температуре от 2 до 8 °C не более 1 сут.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Диагностическая специфичность и диагностическая чувствительность при проверке на сыворотках стандартизированной панели предприятия, не содержащих IgG-антитела к *Treponema pallidum*, и содержащих указанные антитела, – 100 %.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ОСНОВНЫЕ ПРАВИЛА РАБОТЫ С НАБОРОМ

Набор биологически безопасен, однако с исследуемыми образцами необходимо обращаться как с потенциально инфицированным материалом.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

Оборудование и материалы

Цилиндр мерный.

Емкость Колпина или аналогичная для отмывки предметных стекол.

Микропипетки для разведения проб.

Покровные стекла (24x60 мм).

Микропипетки (10-1000 мкм) с наконечниками.

Таймер.

Влажная камера (емкость с крышкой и с фильтровальной бумагой или марлей, смоченной водой, на дне).

Емкость полистиленовая для промывания с канюлей.

Термостат на 37°C

Микроскоп люминесцентный с ртутно-кварцевой лампой и иммерсионной системой, окуляром 4x или 5x, фильтрами СЗС-7 или СЗС-14, ФС-1, БС-8 и ЖС-18.

Вода дистиллированная.

Спирт этиловый ректификованный (96 %).

Подготовка реагентов и материалов

Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все реагенты перед проведением анализа не менее 30 мин при температуре от 20 до 25 °C.

Приготовление отмывающего раствора (ОР)

(ОР)_к интенсивно перемешать (в случае выпадения осадка – прогреть при температуре 37 °C в течение 30 мин до полного растворения солей).

80 мл (ОР)_к растворить в 1,92 л воды очищенной.

Инструкция по применению медицинского изделия
«Набор реагентов «Антипаллидум-Флюороген-IgM/IgG»; комплект 2: «Антипаллидум-Флюороген IgG»,
Диагностикум для выявления антител класса М к *Treponema pallidum* в реакции иммунофлюоресценции» - стр. 5 и 6

При дробном использовании набора развести концентрат водой дистиллированной. в 25 раз, используя объемы концентрата и воды, указанные в табл. 1 для заданного числа предметных стекол.

Число предм. стекл	1	2	3	4	5	6	7	8
(ОР) _ж , мл	10	20	30	40	50	60	70	80
Вода	до	до	до	до	до	до	до	до
дистиллированная., мл	250	500	750	1000	1250	1500	1750	2000

Допускается хранение раствора в течение 14 сут при температуре от 2 до 8 °С и до 7 сут при температуре от 18 до 25 °С.

Приготовление раствора ультрасорбента

Содержимое флакона с ультрасорбентом растворить в 5,0 мл РБР.

Допускается хранение раствора в течение 1 мес при температуре от 2 до 8 °С.

Растворение сухого конъюгата

Сухой ФИТЦ-конъюгат-IgG растворить, добавив во флакон 1,1 мл воды очищенной.

Допускается хранение раствора в течение 1 мес при температуре от 2 до 8 °С.

Подготовка контрольных и исследуемых образцов

Развести:

- исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови раствором ультрасорбента в 5 раз (15 мкл образца внести в 60 мкл раствора ультрасорбента);
- контрольный положительный образец (К⁺) в 5 раз РБР (15 мкл контрольного образца внести в 60 мкл РБР);
- контрольный слаболожительный образец (К^{+слаб}) раствором ультрасорбента в 5 раз (15 мкл контрольного образца внести в 60 мкл раствора ультрасорбента);
- контрольный неспецифический образец (К_{несп}) в 5 раз РБР (15 мкл контрольного образца внести в 60 мкл РБР);
- контрольный неспецифический образец (К_{несп}) раствором ультрасорбента в 5 раз (15 мкл контрольного образца внести в 60 мкл раствора ультрасорбента);

Рекомендуемая схема постановки

- 1 лунка – К⁺ в РБР (1:5)
- 2 лунка – К^{+слаб} в ультрасорбенте(1:5)
- 3 лунка - К_{несп} в РБР(1:5)
- 4 лунка - К_{несп} в ультрасорбенте(1:5)
- 5-10 лунки исследуемые образцы сыворотки(плазмы) в ультрасорбенте(1:5)

Внимание! Образцы СМЖ (ликворь) не требуют разведения.

Подготовка других реагентов

РБР и монтирующая жидкость готовы к применению.

Проведение анализа

Внимание!

Во время работы со стеклами допускается держать их только за маркированный участок или края. Не допускайте прикосновения к лункам!

Непосредственно перед постановкой проверить целостность вакуумной упаковки (использование стекол с нарушенной вакуумной упаковкой не допускается!), извлечь необходимое число стекол и промаркировать их.

1. Осторожно внести по 20 мкл (для лунок диаметром 4 мм) или 25 мкл (для лунок диаметром 6 мм) подготовленных контрольных и исследуемых образцов в соответствующие лунки (полностью покрывая поверхность лунки и не касаясь кончиком пипетки поверхности стекла). Поместить предметное стекло во влажную камеру.

Инкубировать 30 мин при температуре 37°С.

Внимание! Не допускать пересыхания лунок во время инкубаций!

2. Осторожно, пользуясь емкостью для промывания с канюлей, один раз промыть предметное стекло ОР. Для предупреждения перекрестной контаминации избегайте промывания одной лунки через другую, промывайте, направляя струю ОР от средней линии предметного стекла последовательно вдоль обоих рядов и не фокусируйте ее непосредственно на лунках.

После этого 3 раза промыть предметное стекло ОР в емкости Коплина или аналогичной, предназначенной для отмывки предметных стекол, выдерживая их в ОР при каждой промывке 5 мин и меняя ОР после каждой промывки. Предметное стекло при промывке должно быть полностью погружено в раствор.

Стряхнуть избыток ОР с предметного стекла, нижнюю сторону его осторожно протереть фильтровальной бумагой для удаления влаги.

3. Высушить предметное стекло при температуре 20 – 25 °С в течение 10 мин.

4. На сухие препараты нанести по 20-25 мкл ФИТЦ-конъюгата-IgG, и вновь поместить стекло во влажную камеру.

Инкубировать 30 мин при температуре 20 – 25 °С в темноте.

5. Промыть стекло, как указано в п. 1.2, высушить, как указано в п.1.3. Нанести на предметное стекло по средней линии (между лунками) монтирующую жидкость, затем сверху осторожно положить покровное стекло, избегая возникновения под ним пузырьков воздуха и убрать излишки монтирующей жидкости фильтровальной бумагой. Провести микроскопию препарата под люминесцентным микроскопом при общем увеличении 400х-1000х

Учет результатов

Результаты учитывать по наличию и интенсивности желто-зеленого свечения клеток *Treponema pallidum* в поле зрения микроскопа, используя шкалу интенсивности, приведенную в табл. 2.

Шкала интенсивности свечения

Таблица 2

Характер свечения	Запись результата
Блестящее зелено-желтое свечение	(4+)
Яркое свечение	(3+)
Слабое свечение	(2+)
Трепонемы в препарате окрашены интенсивнее фона	(1+)
Полное отсутствие свечения	(-)

Инструкция по применению медицинского изделия
«Набор реагентов «Антипаллидум-Флюороген-IgM/IgG»»; комплект 2: «Антипаллидум-Флюороген IgG»»,
Диагностикум для выявления антител класса М к *Treponema pallidum* в реакции иммунофлюоресценции» - стр. 7 и 8

Примечание: Различные оптические системы могут давать различия в интенсивности свечения до 1+ и более, поэтому интенсивность свечения следует рассматривать только как ориентировочный показатель титра.

Наличие и интенсивность свечения в лунках с исследуемыми образцами можно оценивать только при соблюдении следующих условий:

Свечение в лунке с K^+ интенсивностью от 3+ до 4+ (положительная реакция), в лунке с $K^{\text{слаб}}$ интенсивностью 2+ (специфическая положительная реакция);
 свечение в лунке с $K_{\text{несп}}$, разведенным в РБР, интенсивностью от 1+ до 3+ (неспецифическая положительная реакция);
 полное отсутствие свечения в лунке с абсорбированным $K_{\text{несп}}$ (отрицательная реакция)

В противном случае исследование необходимо повторить.

Интерпретация результатов:

	Результат
Интенсивность свечения равна или выше 2+	Положительный (образец содержит соответствующие антитела к <i>Treponema Pallidum</i>)
Интенсивность свечения равна 1+ или полностью отсутствует	Отрицательный (образец не содержит соответствующие антитела к <i>Treponema Pallidum</i>)

При более слабом свечении трепонем, которое не может быть идентифицировано по шкале интенсивности как 2+, но более интенсивном, чем 1+, результат следует считать сомнительным, и соответствующие образцы должны быть исследованы повторно. При повторном получении сомнительных результатов рекомендуется мониторинг антителообразования у пациента, чтобы исключить возможные неспецифические или перекрестные реакции.

Проведение РИФ₂₀₀

При выявлении антител класса G в сыворотке (плазме) крови при необходимости параллельно с РИФ_{абс} можно провести РИФ₂₀₀. В этом случае набор позволяет исследовать 40 образцов, включая контрольные.

Для постановки РИФ₂₀₀ исследуемые и контрольные образцы (K^+ и $K_{\text{несп}}$) необходимо развести в 200 раз в ОР. Это удобнее делать в два этапа: сначала развести образец в 10 раз (например: к 90 мкл ОР добавить 10 мкл образца и тщательно перемешать пипетированием), а затем еще в 20 раз (например: к 190 мкл ОР добавить 10 мкл предыдущего разведения образца).

Далее провести анализ, как описано выше для комплекта № 2.

В том случае, когда клиницистов интересует титр антител в сыворотке крови больного, РИФ-абс и РИФ-200 следует ставить с последовательными разведениями испытуемых сывороток крови и титром антител считать то наибольшее разведение, которое еще дает положительный результат реакции. Обозначать титр принято числом, характеризующим степень разведения испытуемой сыворотки крови, например, 5, 10, 20, 40 и т.д. (РИФ-абс) или 200, 400, 800 и т.д. (РИФ-200).

СРОК ГОДНОСТИ

7

Срок годности 1 год. Набор с истекшим сроком годности использованию не подлежит.

ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ

Хранение

В упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается.

После вскрытия упаковки неиспользованные реагенты хранить в плотно закупоренной таре при температуре от 2 до 8 °С до истечения срока годности набора.

Транспортирование

При температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается. Допускается транспортирование при температуре от 9 до 20 °С в течение 10 сут.

УСЛОВИЯ ОТПУСКА

Для учреждений здравоохранения.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться по адресу 142530 Московская обл., г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1, ЗАО "ЭКОлаб"; тел. (49643) 3-23-11, факс (49643) 3-30-93 – отдел сбыта, (49643) 3-37-30 – ОБТК и в учреждение, уполномоченное Росздравнадзором на проведение государственного контроля качества указанной продукции

**КРАТКАЯ СХЕМА ПОСТАНОВКИ РИФ
(Антипаллидум-Флюороген-IgG)**

Подготовка образцов	Развести ультрасорбент в 5 мл. РБР. Исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови и контрольные образцы $K^{\text{слаб}}$ и $K_{\text{несп}}$ развести в 5 раз ультрасорбентом. $K_{\text{несп}}$ и K^+ развести в 5 раз РБР. Образцы СМЖ использовать без разведения.
Нанести	На лунки предметного стекла с фиксированным антигеном по 20-25 мкл подготовленных исследуемых и контрольных образцов или цельного ликвора.
Инкубация	30 мин, 37 °С, во влажной камере
Промыть	1 раз ОР с помощью емкости для промывания с канюлей, далее 3 раза по 5 мин в ОР в емкости Коплина; высушивание (20-25)°С 10 мин
Нанести	На каждую лунку по 20-25 мкл ФИТЦ-конъюгата
Инкубация	30 мин, 18-25 °С, во влажной камере, в темноте
Промыть	1 раз ОР с помощью емкости для промывания с канюлей, далее 3 раза по 5 мин в ОР в емкости Коплина; высушивание (20-25)°С 10мин
Нанести	Монтирующую жидкость, покрывное стекло
Провести люминесцентную микроскопию (400х-1000х).	

8

Регистрационное удостоверение на медицинское изделие

«Набор реагентов «Антипаллидум-Флюороген-IgM/IgG» Диагностикум для выявления антител класса М к *Treponema pallidum* в реакции иммунофлюоресценции» по ТУ 9398-128-70423725-2011

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАРОВООХРАНЕНИЯ
(РОСЗДРАВНАДЗОР)

**РЕГИСТРАЦИОННОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ
НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ**

28 февраля 2013 года № РЗН 2013/247

Настоящее регистрационное удостоверение выдано
Закрытое акционерное общество "ЭКОлаб", (ЗАО "ЭКОлаб"), Россия,
142530, Московская область, г. Электрогорск, ул. Буденного, д.1
и подтверждает, что медицинское изделие
Набор реагентов "Антипаллидум-Флюороген-IgM/IgG" диагностикум
для выявления антител классов М и Gтк *Treponema pallidum* в реакции
иммунофлюоресценции по ТУ 9398-128-70423725-2011
производства
Закрытое акционерное общество "ЭКОлаб", (ЗАО "ЭКОлаб"), Россия,
142530, Московская область, г. Электрогорск, ул. Буденного, д.1
место производства
сменилось.

класс идентификационного знака 26 ОКП 93 9817
вид медицинского изделия
ссылка на полное регистрационное удостоверение № 35-001 от 10.10.2011

Приложение: ил. 1 лист

В соответствии с приказом Росздравнадзора от 28 февраля 2013 года № 46-П/У/11
допускаю к обращению на территории Российской Федерации.

Врио руководителя Федеральной службы
по надзору в сфере здравоохранения Е.А. Тельнова

0000005

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАРОВООХРАНЕНИЯ
(РОСЗДРАВНАДЗОР)

**ПРИЛОЖЕНИЕ
К РЕГИСТРАЦИОННОМУ УДОСТОВЕРЕНИЮ
НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ**

№ РЗН 2013/247 Лист 1

I. Набор реагентов "Антипаллидум-Флюороген-IgM/IgG" диагностикум для выявления
антител классов М и Gтк *Treponema pallidum* в реакции иммунофлюоресценции по ТУ
9398-128-70423725-2011
набор выпускается в двух базовых вариантах комплектации:
Комплект № 1:
"Антипаллидум-Флюороген-IgM", Диагностикум для выявления антител класса М к
Treponema pallidum в реакции иммунофлюоресценции.
Комплект № 2:
"Антипаллидум-Флюороген-IgG", Диагностикум для выявления антител класса G к
Treponema pallidum в реакции иммунофлюоресценции.
в состав набора входят следующие реагенты:
антисывороток *Treponema pallidum* на стекле предметном,
ФИТЦ-конъюгат-IgM (только в комплекте № 1),
ФИТЦ-конъюгат-IgG (только в комплекте № 2),
контрольный положительный образец (К⁺),
контрольный слабоположительный образец (К^с слаб) (только в комплекте № 2),
контрольный отрицательный образец (К⁻) (только в комплекте № 1),
контрольный неспецифический образец (только в комплекте № 2),
РФ-сорбент (только в комплекте № 1),
ультрасорбент,
разводящий буферный раствор (РБР),
монтирующая жидкость,
концентрат отмывающего раствора [(ОР)ж].

II. Место производства: Закрытое акционерное общество "ЭКОлаб",
Московская обл., г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1.

Врио руководителя Федеральной службы
по надзору в сфере здравоохранения Е.А. Тельнова

28 февраля 2013 года 0000005

**Медицинское изделие «Набор реагентов "Лайн-Блот-Сифилис".
Тест-система для выявления антител к отдельным антигенам
возбудителя сифилиса методом иммунного блоттинга
с использованием рекомбинантных антигенов»
по Техническим условиям ТУ 9398-118-70423725-2012
(введены взамен ТУ 9398-118-70423725-2009)
производства ЗАО «ЭКОлаб» (г. Электрогорск)**

**комплект 1: "Лайн-Блот-Сифилис-IgG" для выявления антител класса G к
отдельным антигенам возбудителя сифилиса методом иммун-
ного блоттинга с использованием рекомбинантных антигенов»**



комплект 2: "Лайн-Блот-Сифилис-IgM" для выявления антител класса М к отдельным антигенам возбудителя сифилиса методом иммунного блоттинга с использованием рекомбинантных антигенов»



**Инструкция по применению медицинского изделия «Набор реагентов
"Лайн-Блот-Сифилис" комплект 2: "Лайн-Блот-Сифилис-IgM" для выявления антител класса М к отдельным антигенам
возбудителя сифилиса методом иммунного блоттинга с использованием рекомбинантных антигенов» - стр. 1 и 2**

ЗАО "ЭКОлаб"

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
"Лайн-Блот СИФИЛИС-IgM"

ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ IgM АНТИТЕЛ К ОТДЕЛЬНЫМ
АНТИГЕНАМ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИФИЛИСА МЕТОДОМ ИММУННОГО БЛОТ-
ТИНГА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕКОМБИНАНТНЫХ
АНТИГЕНОВ

ЗАО "ЭКОлаб"

НАЗНАЧЕНИЕ

Выявление антител класса IgM (являющихся показателем острого и активного инфекционного процесса) к отдельным антигенам возбудителя Треропета Pallidum методом линейного иммуноблота; подтверждение результатов скрининговых исследований (в ИФА IgM) образцов сыворотки, плазмы крови человека или образцов ликвора; для диагностики врожденного сифилиса. Возможна как "ручная" постановка, так и постановка с использованием систем для автоматизации иммуноблоттинга.

СОСТАВ И КОМПЛЕКТАЦИЯ НАБОРА

Иммунсорбент	тест-полоски (стрипы) из нитроцеллюлозной мембраны, на каждую из которых в виде поперечных полос нанесены рекомбинантные аналоги антигенов Треропета pallidum (TrpN15, TrpN17, TrpA, TrpN47), а также пять контрольных линий: контроль интенсивности окрашивания: • линия с минимальной интенсивностью окрашивания ("0,5+"); • линия со средней интенсивностью окрашивания ("1+"); • линия с максимальной интенсивностью окрашивания ("3+"); контроль внесения образца (K _{во}) контроль специфичности реакции (K _{сп}) (см. рис. 1). <u>Примечания:</u> Линия "0,5+" соответствует критическому уровню интенсивности окрашивания. Неокрашенная линия K _{во} означает отсутствие образца, либо его сильное разведение, что свидетельствует о низкой концентрации IgM Нанесенные на стрипы антигены визуально не определяются. Стрипы промаркированы и находятся в пластмассовом контейнере (пробирке с крышкой).	комплектация 24 стрипа
Контрольный положительный образец (K ⁺)	инактивированный; прозрачная жидкость светло-желтого цвета	1 фл. (0,1 мл)
Контрольный отрицательный образец (K ⁻)	инактивированный; прозрачная жидкость светло-желтого цвета	1 фл. (0,2 мл)
Конъюгат	антитела козы к IgM человека, конъюгированные со щелочной фосфатазой в стабилизирующем растворе; прозрачная жидкость фиолетового цвета	1 фл. (45 мл)
Раствор для разведения образцов (РРО)	мутная, пенящаяся жидкость зеленого цвета	1 фл. (30 мл)
10-кратный концентрат промывочного раствора [ПР(х10)]	прозрачная слегка пенящаяся жидкость желтого цвета	1 фл. (50 мл)
РФ-сорбент	прозрачная, слегка опалесцирующая жидкость, бесцветная	1 фл. (2 мл)
Субстратный раствор (СР)	прозрачная жидкость светло-зеленого цвета	1 фл. (45 мл)

Примечание. Набор включает все реагенты, необходимые для анализа, кроме очищенной (дистиллированной или деионизированной) воды.

2

**Инструкция по применению медицинского изделия «Набор реагентов
"Лайн-Блот-Сифилис" комплект 2: "Лайн-Блот-Сифилис-IgM" для выявления антител класса М к отдельным антигенам
возбудителя сифилиса методом иммунного блоттинга с использованием рекомбинантных антигенов» - стр. 3 и 4**

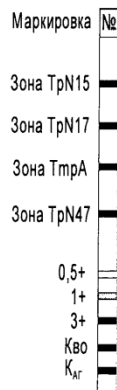


Рис. 1. Стандартная схема нанесения антигенов *Treponema pallidum* и контролей на стрип

В каждый комплект поставки входят также планшеты пластмассовые с канавками – 3 шт. (по 8 канавок), клейкая пленка для планшетов – 4 шт., пинцет пластиковый – 1 шт.

Компоненты набора упакованы в коробку, в коробку вложены инструкция по применению и стандартный протокол учета результатов.

По желанию потребителя базовая комплектация набора (число индивидуальных упаковок с реагентами и их объемы) может быть изменена.

ОСНОВНЫЕ ПОТРЕБИТЕЛЬСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Комплектация набора позволяет одновременно исследовать 24 образца, включая контрольные (на контрольные образцы используется 2 стрипа). Предусмотрена возможность проведения отдельных исследований с использованием необходимого количества стрипов. При этом допускается исследование контрольных образцов только в первой постановке после вскрытия набора.

ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

При наличии в исследуемом образце IgM антител к *Treponema pallidum* они связываются с антигенами иммуносорбента; образовавшиеся комплексы антиген-антитело связываются с конъюгатом – козыми антителами к IgM человека, мечеными щелочной фосфатазой, и выявляются по цветной реакции с хромогеном, которая приводит к появлению в соответствующих зонах стрипа окрашенных полос. Интенсивность окрашивания пропорциональна содержанию антител в исследуемой пробе.

ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Нативная сыворотка (плазма) крови или спинномозговая жидкость человека объемом не менее 20 мкл.

Образцы до исследования можно хранить не более 7 сут при температуре от 2 до 8 °С или до 3 мес при температуре минус 20 °С или более низкой. Допускается только однократное замораживание-размораживание образцов. Размороженные образцы перед исследованием тщательно перемешать.

Не допускается использование для исследования образцов с повышенным содержанием липидов и (или) с признаками гемолиза, и (или) с видимым микробным проростом.

Образцы, содержащие осадок, перед анализом отцентрифугировать в течение 10-15 мин при 2500-3000 об/мин.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Набор биологически безопасен, однако с исследуемыми образцами необходимо обращаться как с потенциально инфицированным материалом.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

Оборудование и материалы

Дозаторы пипеточные (пипетки полуавтоматические одно- и многоканальные переменного объема) для внесения реагентов в лунки планшета с погрешностью дозирования не более 5 % с наконечниками полипропиленовыми одноразовыми.

Ручные, или автоматические промыватели, или восьми- и двенадцатиканальные пипеточные дозаторы для промывания лунок планшета.

Центрифуга лабораторная на 2,5-3,0 тыс. об/мин, термостат на 37 °С, холодильник бытовой, фильтровальная бумага.

Вода очищенная (дистиллированная или деионизированная).

70 %-ный раствор спирта этилового и 6 %-ный раствор перекиси водорода (дез.растворы) или растворы иных дезинфектантов, разрешенных к применению СП 1.32322-08, кроме хлорсодержащих.

Мерные стаканы или цилиндры вместимостью от 25 до 500 мл.

Насос вакуумный.

Автоматическое качающее устройство (20-60 колебаний в минуту).

Пинцет для работы со стрипами (пластмассовый или металлический).

Приготовление рабочих растворов реагентов для ИБ

Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все реагенты перед проведением анализа не менее 30 мин при температуре от 18 до 25 °С.

Приготовление рабочего промывочного раствора (ПР)

При использовании системы для автоматизации иммуноблоттинга или при одновременном использовании всех стрипов в "ручной" постановке содержимое флакона с ПР(х10) перелить в мерную емкость (вместимостью 500 мл) и водой очищенной довести объем жидкости до метки; тщательно перемешать.

При дробной "ручной" постановке отобрать необходимый объем ПР(х10), довести до заданного объема водой очищенной, тщательно перемешать; объемы ПР(х10) и воды, необходимые для постановки с использованием разного числа стрипов, приведены в табл. 1.

**Инструкция по применению медицинского изделия «Набор реагентов
"Лайн-Блот-Сифилис" комплект 2: "Лайн-Блот-Сифилис-IgM" для выявления антител класса М к отдельным антигенам
возбудителя сифилиса методом иммунного блоттинга с использованием рекомбинантных антигенов» - стр. 5 и 6**

Таблица 1

Количество стрипов	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22
ПР(х10), мл	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44
Вода очищенная, до ...мл	80	120	160	200	240	280	320	360	400	440

Примечание. При использовании числа стрипов, не указанного в таблице, необходимые объемы реагентов определять, исходя из расчета 1 мл ПР(х10) и до 10 мл воды очищенной на 1 стрип.

Готовый раствор хранить при температуре от 18 до 25 °С не более 48 ч; при температуре от 2 до 8 °С – не более 14 сут.

Приготовление остальных реагентов

Иммуносорбент, К*, К-, РРО, конъюгат, РФ-сорбент, СР – готовы к применению. Растворы перед использованием обязательно перемешать осторожным встряхиванием флаконов.

После вскрытия упаковок неиспользованные реагенты (кроме иммуносорбента) хранить в плотно закрытой упаковке при температуре от 2 до 8 °С до истечения срока годности.

Проведение анализа

Ручная постановка

1. Подготовить необходимое количество планшетов. Открыть пробирку со стрипами. Необходимо число стрипов (один стрип на каждый исследуемый и контрольный образец) осторожно по одному извлечь из контейнера пинцетом и поместить в канавки планшета (планшетов) маркированной стороной вверх. Плотно закрыть контейнер с неиспользованными стрипами и поместить его для последующего хранения при температуре от 2 до 8 °С.

Неиспользованные стрипы хранить в плотно закрытом контейнере при температуре от 2 до 8 °С не более 6 мес.

2. В канавки планшета (планшетов) со стрипами внести по 1 мл РРО, выдержать 3-5 мин при встряхивании на шейкере при скорости качания платформы 20-60 об/мин при температуре от 18 до 25 °С.

Внимание! Следите, чтобы при инкубациях и отмывках стрипы были полностью погружены в жидкость, а реагенты во избежание смешивания не переливались через бортики канавок.

3. Отдельными наконечниками внести по 20 мкл контрольных (К* и К-) и исследуемых образцов.

Внимание! Внесение образцов должно сопровождаться быстрым и тщательным перемешиванием автоматической пипеткой. При внесении каждого (исследуемого и контрольного) образца необходимо регистрировать номер соответствующего ему стрипа.

4. Заклеить занятые дорожки клейкой пленкой или закрыть крышкой. Поместить планшет на шейкер. Инкубировать 2 ч при скорости качания платформы 20-60 об/мин при температуре от 18 до 25 °С.

5. Не позднее, чем за 5-10 мин до окончания инкубации приготовить рабочий промывочный раствор (см. п. **Приготовление рабочего промывочного раствора**).

6. После инкубации удалить жидкость из канавок планшета, используя автоматическую пипетку или вакуумный насос, в емкость, содержащую дезинфицирующий раствор.

Внимание! Следует соблюдать осторожность, чтобы при удалении растворов из канавки не выпал стрип. Наконечник отсасывающего устройства после каждого контакта с различными образцами следует промывать дистиллированной водой или использовать для каждого образца отдельный одноразовый наконечник.

5

ник во избежание перекрестной контаминации. Следите, чтобы капли влаги не оставались под стрипом. При необходимости осторожно приподнимите стрип пинцетом и удалите из-под него остатки влаги.

7. Промывать каждый стрип 4 раза рабочим промывочным раствором, внося в канавку по 2 мл раствора.

При первой промывке раствор удалить из лунки, как указано в п. 6, сразу после внесения.

При последующих трех промывках после внесения промывочного раствора выдерживать планшет по 5 мин на шейкере при скорости качания платформы 20-60 об/мин. Удаление промывочного раствора проводить, как указано в п.6.

8. Во все использованные канавки планшета внести по 1,0 мл рабочего разведения конъюгата (для комплекта № 1) или конъюгата, готового к использованию (для комплекта № 2).

9. Инкубировать в течение 30 мин при температуре от 18 до 25 °С на шейкере при скорости качания платформы 20-60 об/мин.

10. После инкубации удалить жидкость из канавок планшета, как указано в п. 6. Промывать стрипы, как указано в п.7.

Внимание! Промывку и удаление жидкости после реакции с конъюгатом выполняйте особенно аккуратно, т.к. даже следы конъюгата при контакте с хромозеном могут привести к неспецифическому окрашиванию всего стрипа, а не отдельных полос.

11. Внести во все использованные канавки по 1,0 мл субстратного раствора. Инкубировать 10 мин на шейкере при скорости качания платформы 20-60 об/мин в защищенном от света месте при температуре от 18 до 25°С до появления на стрипе окрашенных полос.

12. Для остановки реакции удалить субстратный раствор, как указано в п. 6.

Промывать стрипы 4 раза, внося в канавки по 2 мл воды очищенной и выдерживая планшет по 1 мин на шейкере при скорости качания платформы 20-60 об/мин. Воду удалять, как указано в п. 6.

13. Поместить стрипы между двумя листами фильтровальной бумаги маркированной стороной вверх и выдерживать в защищенном от света месте до полного высыхания, после чего сразу же зарегистрировать результаты.

Регистрация и учет результатов

Регистрацию результатов проводить визуально, сравнивая интенсивность окраски антигенных линий с интенсивностью окраски контрольных линий по табл. 3.

Таблица 3

Интенсивность окрашивания антигенных линий	Оценка
Окрашивание отсутствует или менее интенсивно, чем "0,5+"	-
Интенсивность окрашивания равна "0,5+"	0,5+
Интенсивность окрашивания выше, чем "0,5+", но ниже или равна "1+"	1+
Интенсивность окрашивания выше, чем "1+", но ниже, чем "3+"	2+
Интенсивность окрашивания равна "3+"	3+
Интенсивность окрашивания выше, чем "3+"	4+

Результаты, полученные на стрипах с исследуемыми образцами, учитывать только при соблюдении следующих условий:

- контрольная линия внесения образца (K₀) окрашена;
- контрольная линия специфичности реакции (K₁) не окрашена;
- хорошо различимы контрольные линии интенсивности окрашивания с четкой их дифференциацией (контрольная линия "3+" окрашена интенсивнее, чем линия "1+"; а линия "1+" окрашена интенсивнее, чем линия "0,5+");
- окрашивание контрольных образцов соответствует табл. 4.

6

**Инструкция по применению медицинского изделия «Набор реагентов
"Лайн-Блот-Сифилис" комплект 2: "Лайн-Блот-Сифилис-IgM" для выявления антител класса М к отдельным антигенам
возбудителя сифилиса методом иммунного блоттинга с использованием рекомбинантных антигенов» - стр. 7 и 8**

Таблица 4

Образец	Окрашивание линии					
	ТрN15	ТрN17	ТрpA	ТрN47	К _{во}	К _{кг}
К-	-	-	-	-	+	-
К+	не ниже "0,5+"	не ниже "1+"	не ниже "0,5+"	не ниже "0,5+"	+	-

Если данные условия не соблюдаются, исследование необходимо повторить.

Окрашивание линии контроля специфичности реакции (К_{кг}) означает, что образец дает неспецифическую реакцию (из-за наличия большого количества антител к бактериальным антигенам или вследствие несоблюдения правил приготовления и хранения сывороток). В этом случае повторное исследование необходимо проводить со вновь полученным образцом.

Интерпретация результатов

Для оптимального учета результатов проявленные стрипы рекомендуется приклеплять к протоколу так, чтобы контрольные линии интенсивности 3+ у всех стрипов и соответствующая линия на рисунке протокола были на одном уровне. В этом случае проявленные антигенные линии будут находиться на уровне линий соответствующих антигенов на рисунке протокола. Для закрепления стрипов на протоколе можно использовать полосы из защитной пленки для планшет, которыми комплектуется набор.

При соблюдении вышеперечисленных условий интерпретировать результаты, полученные на стрипах с исследуемыми образцами, используя табл. 5.

Таблица 5

Наличие и интенсивность антигенных полос на стрипе	Результат исследования
Нет окрашенных линий или есть только одна линия с интенсивностью окрашивания, равной "0,5+"	Отрицательный
Наличие только одной линии с интенсивностью окрашивания, не меньше "1+"	Неопределенный
Наличие двух и более линий с интенсивностью окрашивания, не меньше "0,5+"	Положительный

При получении неопределенного результата рекомендуется провести повторное исследование; если в нем вновь будет получен неопределенный результат, рекомендуется взятие крови через 3-4 недели с проведением нового исследования на выявление антител к антигенам Treponema pallidum.

Примечание:

При повышенном уровне ревматоидного фактора в крови (что наиболее характерно для ревматоидного артрита) его следует удалить из сыворотки для получения более достоверного результата. Удаление ревматоидного фактора осуществляют с помощью РФ-сорбента.

Для этого перед проведением реакции ИБ исследуемый образец сыворотки предварительно разводят 1:1 с РФ-сорбентом, инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре и затем центрифугируют 5 мин при 2000 об/мин при комнатной температуре и сразу используют супернатант для проведения реакции ИБ.

Например:

К 80 мкл РФ-сорбента добавляют 80 мкл исследуемого образца сыворотки; инкубируют 30 мин при комнатной температуре; центрифугируют 5 мин при 2000 об/мин при комнатной температуре; для проведения реакции ИБ 40 мкл супернатанта вносят в канавку планшета со стрипом и 1 мл РРО (см п. 3 Проведения анализа).

Далее реакцию проводят согласно последующим пунктам данной инструкции.

7

Постановка с использованием систем для автоматизации иммуноблоттинга

Подготовить прибор в соответствии с инструкцией по его эксплуатации, ввести программу анализа, соответствующую используемому набору, и провести анализ.

СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности набора – 1 год. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ

Хранение
В упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается.

Транспортирование
При температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается. Допускается транспортирование при температуре от 9 до 20 °С в течение 10 сут.

УСЛОВИЯ ОТПУСКА

Для лечебно-профилактических и санитарно-эпидемиологических учреждений.
По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться по адресу 142530 Московская обл., г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1, ЗАО "ЭКОЛаб"; тел. (49643) 3-23-11, факс (49643) 3-30-93 – отдел сбыта, (49643) 3-37-30 – ОБТК и в учреждение, уполномоченное Росздравнадзором на проведение государственного контроля качества указанной продукции.

КРАТКАЯ СХЕМА ПОСТАНОВКИ (Лайн-Блот СИФИЛИС)

Внести	в канавки планшета по одному стрипу для каждого контрольного и исследуемого образца; в каждую канавку – по 1 мл РРО
Инкубация	3-5 мин, 18-25 °С, на шейкере (20-60 об/мин)
Внести	по 20 мл контрольных и исследуемых образцов
Инкубация	2 ч, 18-25 °С, на шейкере (20-60 об/мин)
Промыть	4 раза ПР
Внести	в каждую канавку по 1,0 мл конъюгата
Инкубация	30 мин, 18-25 °С, на шейкере (20-60 об/мин)
Промыть	4 раза ПР
Внести	в каждую канавку по 1,0 мл СР
Инкубация	10 мин, 18-25 °С, на шейкере (20-60 об/мин)
Промыть	4 раза водой очищенной
Высушить стрипы между листов фильтровальной бумаги и зарегистрировать результаты	

8

Протокол №1 результатов исследования с «Набором реагентов "Лайн-Блот-Сифилис-IgM" для выявления антител класса М к отдельным антигенам возбудителя сифилиса методом иммунного блоттинга с использованием рекомбинантных антигенов»

Протокол № _____

Дата: 12 НОЯ 2012 Ответственный: Ротанов С.В.

Название тест-системы: «Лайн-Блот Сифилис-IgM»

Серия тест-системы: 01/2012

Цель проведения реакции ИБ: общая антигенообразование у б-а Lues I

Схема стрипа	Иммун-т с <u>01/12</u> ; Конъюгат IgM с <u>01/12</u> ; PRx10 с <u>01/12</u> ; СБ с <u>01/12</u> ;	PPO с <u>01/12</u> ; К- с <u>01/12</u> ; К+ с <u>01/12</u> .	№ стрипа	№ и характеристика образца	p15	p17	TmpA	p47	K Ag	Результат																
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24		
		№ 2	№ 62	№ 82	№ 84	№ 87	№ 103	№ 128	№ 144	№ 146	№ 157	№ 168	№ 208	№ 209	№ 215	№ 217	№ 225	№ 226	№ 246	№ 347	№ 352	№ 411	№ 423	№ 441	№ 453	
		<0,5	0,5	0,5	0,5	<0,5	0,5	1,0	0,5	1,0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	<0,5	0,5	0,5	<0,5	<0,5	1+	0,5	0,5	0,5	0,5	
		0,5	0,5	<0,5	0,5	1,0	0,5	1,0	<0,5	0,5	1+	1+	0,5	0,5	0,5	2+	0,5	0,5	0,5	0,5	1+	0,5	0,5	0,5	0,5	
		4+	<0,5	3+	2+	0,5	4+	3+	4+	4+	1+	3+	1+	1+	0,5	0,5	1+	4+	3+	2+	0,5	0,5	0,5	0,5		
		0,5	0,5	1+	1+	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	
		Положительный (+)	Неопределенный (-)	Положительный (+)	Положительный (+)	Положительный (+)	Положительный (+)	Положительный (+)	Положительный (+)	Положительный (+)	Положительный (+)	Положительный (+)	Положительный (+)	Неопределенный (-)	Положительный (+)	Положительный (+)	Положительный (+)	Положительный (+)	Положительный (+)	Положительный (+)	Положительный (+)	Положительный (+)	Положительный (+)	Положительный (+)	Положительный (+)	Положительный (+)

Доп. замечания:

ЗАКЛЮЧЕНИЕ Ротанов С.В.

Протокол №2 результатов исследования с «Набором реагентов "Лайн-Блот-Сифилис-IgM" для выявления антител класса М к отдельным антигенам возбудителя сифилиса методом иммунного блоттинга с использованием рекомбинантных антигенов»

Протокол № _____											
Ротанов С.В.											
Дата: 12 НОЯ 2012			Ответственный:								
Название тест-системы: «Лайн-Блот Сифилис-IgM» дата изгот. 08.2012 год изгот 09.2013											
Серия тест-системы: 01/2012											
Цель проведения реакции ИБ: оценка антителобразования у д-х Lues I											
Схема стрипа	Иммун-т с 01/12 ; Конъюгат IgM с 01/12 ; ПРх10 с 01/12 ; СБ с 01/12 ;	РРО с 01/12 ; К- с 01/12 ; К+ с 01/12 .	№ стрипа	№ и характеристика образца	p15	p17	ТрпА	p47	К Ag	Результат	
	Доп. замечания:		1	1205	отр	QS	1+	отр	отр	Положительный (+)	
	2	1236	с QS	2+	1+	2+	отр		Положительный (+)		
	3	1243	отр	1+	4+	QS	отр		Положительный (+)		
	4	1244	QS	1+	2+	2+	отр		Положительный (+)		
	5	1252	QS	2+	3+	1+	отр		Положительный (+)		
	6	1287	отр	отр	с QS	с QS	отр		Отрицательный (-)		
	7	1261	с QS	отр	с QS	отр	отр		Отрицательный (-)		
	8	1282	QS	отр	QS	2+	отр		Положительный (+)		
	9	1287	QS	2+	4+	1+	отр		Положительный (+)		
	10	1299	с QS	с QS	1+	QS	отр		Положительный (+)		
	11	1302	QS	1+	3+	1+	отр		Положительный (+)		
	12	1309	1+	QS	1+	QS	отр		Положительный (+)		
	13	1334	2+	с QS	3+	QS	отр		Положительный (+)		
	14	1349	с QS	4+	1+	QS	отр		Положительный (+)		
	15	1369	1+	3+	2+	1+	отр		Положительный (+)		
	16	1382	QS	QS	1+	с QS	отр		Положительный (+)		
	17	1414	1+	1+	4+	2+	отр		Положительный (+)		
	18	1419	с QS	с QS	с QS	1+	отр		Неопределенный		
	19	1433	2+	с QS	с QS	1+	отр		Положительный (+)		
	20	1610	с QS	1+	2+	1+	отр		Положительный (+)		
	21	1619	QS	1+	QS	QS	отр		Положительный (+)		
	22	1626	с QS	1+	1+	QS	отр		Положительный (+)		
	23	1629	с QS	2+	QS	2+	отр		Положительный (+)		
	24	1634	отр	2+	1+	1+	отр		Положительный (+)		

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ротанов С.В.

**Регистрационное удостоверение на медицинское изделие «Набор реагентов
"Лайн-Блот-Сифилис" Тест-система для выявления антител к отдельным антигенам возбудителя сифилиса
методом иммунного блоттинга с использованием рекомбинантных антигенов»**



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАРОВООХРАНЕНИЯ
(РОСЗДРАВНАДЗОР)

**РЕГИСТРАЦИОННОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ
НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ**
от 05 июня 2014 года № РЗН 2014/1657

На медицинское изделие
Набор реагентов: "Лайн-Блот Сифилис". Тест-система для выявления антител к отдельным антигенам возбудителя сифилиса методом иммунного блоттинга с использованием рекомбинантных антигенов по ТУ 9398-118-70423725-2012

Настоящее регистрационное удостоверение выдано
Закрытое акционерное общество "ЭКОлаб" (ЗАО "ЭКОлаб"), Россия,
142530, Московская область, г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1

Производитель
Закрытое акционерное общество "ЭКОлаб" (ЗАО "ЭКОлаб"), Россия,
142530, Московская область, г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1

Место производства медицинского изделия
142530, Московская область, г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1

Номер регистрационного дела № РД-933/15569 от 15.05.2013

Вид медицинского изделия -

Класс потенциального риска применения медицинского изделия 2б

Код Общероссийского классификатора продукции для медицинского изделия 93 981

Настоящее регистрационное удостоверение имеет приложение на 1 листе

приказом Росздравнадзора от 05 июня 2014 года № 4006
допущено к обращению на территории Российской Федерации.

Врио руководителя Федеральной службы
по надзору в сфере здравоохранения  М.А. Мурашко

0007875

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАРОВООХРАНЕНИЯ
(РОСЗДРАВНАДЗОР)

**ПРИЛОЖЕНИЕ
К РЕГИСТРАЦИОННОМУ УДОСТОВЕРЕНИЮ
НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ**
от 05 июня 2014 года № РЗП 2014/1657

Лист 1

На медицинское изделие
Набор реагентов: "Лайн-Блот Сифилис". Тест-система для выявления антител к отдельным антигенам возбудителя сифилиса методом иммунного блоттинга с использованием рекомбинантных антигенов по ТУ 9398-118-70423725-2012 в вариантах исполнения:

- Комплект № 1 "Лайн-Блот Сифилис-1pG" для выявления антител класса G, в составе:

1. Иммуносорбент.
2. К¹ - контрольный положительный образец.
3. КС - контрольный отрицательный образец.
4. Коллоидат.
5. РМО - раствор для разделения образцов.
6. ПР(х10) - 10-кратный концентрат промыточного раствора.
7. СР - субстратный раствор.

- Комплект № 2 "Лайн-Блот Сифилис-1pM" для выявления антител класса M, в составе:

1. Иммуносорбент.
2. Коллоидат.
3. РРО - раствор для разделения образцов.
4. ПР(х10) - 10-кратный концентрат промыточного раствора.
5. РФ-сорбент.
6. СР - субстратный раствор.
7. Референс-стрип.

Врио руководителя Федеральной службы
по надзору в сфере здравоохранения  М.А. Мурашко

0006938

Выражаю искреннюю и глубокую благодарность директору ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, заведующему кафедрой дерматовенерологии лечебного факультета ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, академику Российской академии медицинских наук, доктору медицинских наук, профессору Анне Алексеевне КУБАНОВОЙ за предоставленную возможность выполнения научных исследований в лабораторном центре руководимого ею Научного центра, за внимание и поддержку при обучении в аспирантуре и выполнении данной научной работы, а также за предоставленную возможность защиты диссертации на Диссертационном совете Д 208.115.01 при головном по профилю «дерматовенерология» научном учреждении России.

Особую благодарность и искреннюю признательность выражаю моему научному руководителю профессору кафедры дерматовенерологии лечебного факультета ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, доктору медицинских наук, доценту Сергею Владимировичу РОТАНОВУ за повседневную помощь, заботу и творческую поддержку в проведении научных исследований, креативное обсуждение полученных результатов и доброе отношение.