

ЗАО «ЭКОлаб»
ГУЗ «Саратовский областной
кожно-венерологический диспансер»

С.Г. Марданлы, Г.Ю. Куляш

Реакция пассивной геммагглютинации в серологической диагностике сифилиса

Учебно-методическое пособие

Издание третье

г. Электрогорск
2011 г.

УДК 616.972
ББК 55.811-4
М25

Авторы:

С.Г. Марданлы — президент ЗАО «ЭКОлаб», академик РАМНТ, кандидат медицинских наук;

Г.Ю. Куляш — заведующий централизованной серологической лабораторией ГУЗ «Саратовский областной кожно-венерологический диспансер», кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник, врач высшей категории.

Марданлы С.Г., Куляш Г.Ю.

М25 Реакция пассивной гемагглютинации в серологической диагностике сифилиса: учебно-методическое пособие / С.Г. Марданлы, Г.Ю. Куляш. — Электргорск: ЗАО «ЭКОлаб», 2011. — 40 с.

ISBN 5-8311-0246-7

ББК 55.811-4

ISBN 5-8311-0246-7

© Марданлы С.Г., Куляш Г.Ю., 2011

ВВЕДЕНИЕ

Сифилис, вызываемый бледной трепонемой (*Treponema pallidum*, подвид *pallidum*), по-прежнему является одной из наиболее актуальных социально-значимых инфекций, передаваемых преимущественно половым путем. К настоящему моменту активные профилактические и лечебные мероприятия позволили в несколько раз снизить заболеваемость сифилисом по сравнению с ее пиком в конце 90-х годов XX столетия. Однако до сих пор уровень инфицированности *T.pallidum*, регистрируемый в России (более 50 случаев на 100 тыс. населения), остается высоким и по-прежнему дает основание оценивать эпидемиологическую ситуацию по сифилитической инфекции как тревожную [Кубанова А.А. и др., 2010].

Заболевание без лечения, как правило, протекает длительно и характеризуется последовательной сменой периодов первичного, вторичного и, не часто в настоящее время, третичного сифилиса. Каждой из стадий свойственны характерные клинические проявления, которые учитываются при установлении диагноза. Наряду с этим современный сифилис обнаруживает стойкую тенденцию к бессимптомному, или скрытому, течению. Последнее существенно осложняет диагностику и увеличивает эпидемический потенциал сифилитической инфекции в связи с заразностью ранних форм скрытого сифилиса. В перечень наиболее неблагоприятных социальных и клинических исходов как симптоматического, так и скрытого сифилиса, входят внутриутробное заражение плода, инвалидизация части инфицированных в связи со специфическим повреждением органов слуха, зрения, центральной нервной системы, а также возможность развития топоческих и системных нарушений при висцеральном и кардиоваскулярном сифилисе, которые в ряде случаев могут приводить к летальному исходу.

Изложенное предъявляет особые требования к надежности результатов серологического обследования на сифилис, по-прежнему составляющего основу лабораторных анализов при скрининге и диагностике всех форм сифилитической инфекции. При этом применение реакции пассивной гемагглютинации (РПГА) для определения АТ к *T.pallidum* даже в лабораториях с невысоким уровнем оснащения способствует получению достоверных результатов благодаря удачному сочетанию высокой диагностической эффективности предлагаемых отечественных наборов с простотой выполнения аналитической процедуры. Информативность и объективность РПГА могут быть увеличены при титровании позитивных сывороток и автоматизации тестирования с применением ридеров отечественного или зарубежного производства для учета результатов агглютинации.

Предлагаемое учебно-методическое пособие предназначено для врачей клиничко-диагностических лабораторий, врачей-дерматовенерологов, преподавателей и слушателей курсов подготовки и повышения квалификации по клинической лабораторной диагностике, врачей-интернов, а также студентов медицинских ВУЗов, интересующихся проблемами диагностики инфекций, передаваемых половым путем.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ	— антиген
АТ	— антитело
ИФА	— иммуноферментный анализ
КВД	— кожно-венерологический диспансер
КСР	— комплекс серологических реакций, состоящий из РМП с кардиолипидным АГ, а также РСК с кардиолипидным и трепонемным АГ
КЭ	— контрольные эритроциты в наборах для РПГА
ЛПУ	— лечебно-профилактическое учреждение
МИБП	— медицинский иммунобиологический препарат
НД	— нормативная документация
РА	— реакция агглютинации
РИТ	— реакция иммобилизации трепонем
РМП	— реакция микропреципитации с кардиолипидным АГ
РПГА	— реакция пассивной гемагглютинации
РПГА-набор	— набор для проведения РПГА
РСК _к	— реакция связывания комплемента с кардиолипидным АГ
РСК _т	— реакция связывания комплемента с трепонемным АГ
СМЖ	— спинномозговая жидкость
ТЭ	— тест-эритроциты в наборах для РПГА
IgG	— иммуноглобулины класса G
IgM	— иммуноглобулины класса M
RPR	— тест быстрых плазменных реагенов (rapid plasma reagins)
ТРНА	— тест гемагглютинации на АТ к бледной трепонеме (Treponema pallidum haemagglutination)
ТРПА	— тест агглютинации искусственных частиц на АТ к бледной трепонеме (Treponema pallidum particle agglutination)

1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О РЕАКЦИИ АГГЛЮТИНАЦИИ

Под агглютинацией понимают специфическое склеивание частиц, на поверхности которых присутствуют АГ. Агглютинация частиц может вызываться различными биомолекулами (например, лектинами), однако в практической медицине наиболее известными и широко применяемыми факторами агглютинации (агглютининами) являются АТ классов G и M. Механизм РА объясняется «теорией решетки», согласно которой двухвалентное АТ (IgG) или поливалентное АТ (IgM) взаимодействует одним активным центром с антигенной детерминантой первой частицы, а другим — с детерминантой аналогичного АГ второй частицы [Кульберг А.Я., 1985]. Устойчивость агглютината растет по мере формирования решетки, обеспечивающей связывание клеток по многим точкам. Образование «решетки» невозможно при дефиците или избытке АТ, а оптимальной средой для РА является забуференный раствор изотонического хлорида натрия [Иммунология, 1981; Медицинская микробиология, 1999].

Агглютинация подразделяется на прямую (активную) и непрямую (пассивную). Феномен прямой (активной) агглютинации реализуется при специфическом взаимодействии узнающих АТ с собственными структурными антигенами мембран эритроцитов или бактериальных клеток. При этом прямая агглютинация в лабораторной диагностике инфекционных заболеваний фактически не используется. Непрямая, или пассивная, агглютинация, напротив, нашла самое широкое применение в диагностике бактериальных и вирусных инфекций. При непрямой агглютинации собственные АГ природных частиц не вступают в реакцию, а сами частицы (например, эритроциты) выполняют исключительно индикаторную, т.е. вспомогательную, функцию. Специфичность непрямой РА обеспечивается антигенной индивидуальностью биомолекул, которые фиксируются на поверхности частиц с помощью различных модифицирующих соединений (танин, глутаровый альдегид, CrCl_3 и др.). В отличие от активной РА для пассивной агглютинации могут быть использованы не только природные частицы-носители (эритроциты), но и искусственные полимерные сферические образования (частицы латекса, полиакриламида, бентонита, желатина). Название реакции пассивной агглютинации определяется природой используемых в конкретном диагностикуме частиц — РПГА, или ТРНА (англ.), если носителями АГ являются эритроциты; ТРРА (англ.), если в качестве носителей использованы нейтральные искусственные частицы. В любом случае, при реализации специфического взаимодействия «АГ-АТ»,

т.е. при положительном результате, формируется молекулярно-корпускулярная решетка, которая визуально определяется как «зонтик», равномерно выстилающий дно U-образного пространства (например, пробирки или лунки планшета). В отсутствии специфического иммунологического взаимодействия частицы, несущие АГ, решетки не образуют и скатываются на дно U-образного пространства в виде плотной «пуговки». Чувствительность всех модификаций реакции пассивной агглютинации значительно превосходит таковую реакции преципитации, составляя в среднем 0,02–0,04 мкг определяемого вещества/мл [Иммунология, 1981; Медицинская микробиология, 1999].

2. ОСНОВНЫЕ МОДИФИКАЦИИ РЕАКЦИИ АГГЛЮТИНАЦИИ И НАБОРА НА ОСНОВЕ РА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ К T.PALLIDUM

Среди рассмотренных выше модификаций непрямой агглютинации наибольшее распространение для серодиагностики сифилиса в России получили наборы отечественных и зарубежных производителей, в которых в качестве частиц-носителей трепонемных АГ используются эритроциты. Такие наборы предназначены для проведения реакции пассивной **гемагглютинации** (РПГА, или ТРНА). О возможности применения РПГА для определения АТ к T.pallidum впервые сообщили G. Blumental и W. Bachman в 1932 г. Значительно позже (в 1965–1967 гг.) результаты более детального изучения РПГА при сифилисе были представлены T.Rathlev и T.Tomizawa с соавторами [цит. по Овчинникову Н.М., Бедновой В.Н., Делекторскому В.В., 1987]. Принцип РПГА заключается в том, что при специфическом взаимодействии суммарных АТ (IgG и IgM) к T.pallidum исследуемой сыворотки крови с трепонемными АГ, фиксированными на поверхности индикаторных эритроцитов, наблюдается их характерная агглютинация. Важно отметить, что в большинстве современных наборов для РПГА и ТРНА на сифилис используются не эритроциты барана, как ранее, а эритроциты птиц, поскольку они быстрее оседают, сокращая время учета результата более чем в 2 раза [Акопова З.П., 2000]. Кроме того, по данным фирмы «Fujiyebio INC» (Япония), их поверхность содержит меньше собственных (природных) АГ, которые способны увеличивать риск получения недостоверных результатов РПГА. В связи с тем, что на искусственных полимерных частицах нет собственных АГ, обуславливающих биологическую актив-

ность, наборы для серодиагностики сифилиса на их основе (ТРРА) имеют основания считаться более совершенными. Однако зарегистрированные отечественные аналоги ТРРА-наборов на сегодня отсутствуют, а стоимость зарубежных наборов для проведения ТРРА выше стоимости РПГА-наборов. При этом показатель корреляции результатов ТРРА и РПГА достигает 97,8%, что свидетельствует о сопоставимой диагностической эффективности обеих модификаций непрямой РА [Deguchi M. et al., 1994].

В действующем приказе МЗ РФ №87 от 26.03.2001 г. «О совершенствовании серологической диагностики сифилиса» перечислены следующие РПГА-наборы, которые были допущены на Российский рынок МИБП на момент выхода этого документа:

1. Гемагглютинационный тест для качественного и количественного определения антител против *Treponema pallidum* («Syphilis ТРНА-test»), фирма «Human», страна-производитель — Германия, распространители — фирмы: «Биохиммак», «Лабораторная диагностика», г. Москва.

2. Гемагглютинационный тест для качественного и количественного определения антител против *Treponema pallidum* («ТРНА-posticon»), фирма «Organon», страна-производитель — Голландия, распространитель — фирма «Organon-technics» г. Москва.

3. Гемагглютинационный тест для качественного и количественного определения антител против *Treponema pallidum* («Syphilis ТРНА 200»), фирма «Sanofi diagnostic Pasteur», страна-производитель — Франция, распространитель-фирма «Sanofi diagnostic Pasteur», г. Москва.

4. Гемагглютинационный тест для качественного и количественного определения антител против *Treponema pallidum* («Syphilis ТРНА»), фирма «Randox», страна-производитель — Великобритания, распространитель — фирма ЗАО «Protea», г. Москва.

5. Диагностикум для выявления антител к *Treponema pallidum* в реакции пассивной гемагглютинации («ЛЮИС РПГА тест»), фирма «Нирмедик Плюс», г. Москва.

Большинство из перечисленных наборов продолжают производиться и имеют необходимую НД, определяющую возможность их использования в практическом здравоохранении РФ. В то же время следует иметь в виду, что приказ МЗ РФ №87 существует без поправок фактически 10 лет. За это время диагностический набор «Syphilis ТРНА 200», в котором использовались эритроциты барана, а время постановки достигало 2 часов, был заменен на «РПГА НЬЮ М 200» с птичьими эритроцитами, что позволяет учитывать результат через 45 минут. На отечест-

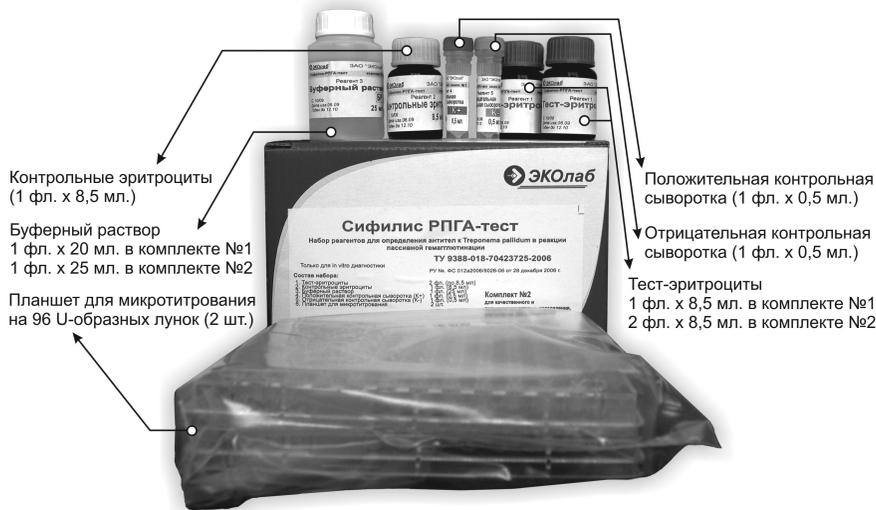


Рис. 1. Состав набора «Сифилис-РПГА-тест» производства ЗАО «ЭКОлаб»

венном рынке диагностических препаратов появились и другие высоко эффективные РПГА-наборы, не упомянутые в приказе МЗ РФ №87. Так, «Сифилис-РПГА-тест» (рис. 1) производства ЗАО «ЭКОлаб», г. Электрогорск Московской области, имеющий всю необходимую для практического применения НД, уже более 5 лет с успехом используется для скрининга и диагностики сифилиса в различных регионах РФ. Примером высокоэффективного набора для непрямо́й РА на основе искусственных частиц (ТРРА), не вошедшей в перечень приказа МЗ РФ №87, является набор «Serodia-TR-PA» фирмы «Fujirebio INC», Япония, который также зарегистрирован в РФ.

Таким образом, не упомянутые в приказе МЗ РФ №87 отечественные и зарубежные наборы для постановки различных модификаций непрямо́й РА на АТ к *T. pallidum* могут использоваться в Российских ЛПУ при условии наличия НД, подтверждающей необходимую надежность этих диагностических наборов (регистрационное удостоверение Федеральной службы по надзору в сфере ЗО и СР и/или сертификат производства МИБП). Аналогичным образом, приобретение РПГА- и ТРНА-наборов, перечисленных в приказе №87, также должно проводиться с учетом их соответствия вышеперечисленным требованиям.

3. ПРИНЦИПЫ ПРОВЕДЕНИЯ И УЧЕТА РЕЗУЛЬТАТОВ РПГА, ПРИМЕНЯЕМОЙ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ СИФИЛИСА

Современные РПГА-наборы для определения АТ к *T.pallidum*, допущенные к применению в практическом здравоохранении РФ, используют планшетную микромодификацию этого метода, обеспечивающую экономичность, быстроту постановки и надежность регистрации результатов. При выполнении РПГА с использованием любых наборов должны строго соблюдаться общие требования к обеспечению необходимых материально-технических условий, а также к подготовке исследуемых образцов, проведению аналитической процедуры, учету и формулировке полученных результатов.

Материально-техническое обеспечение метода

Для постановки РПГА в лаборатории должны иметься:

- холодильники для хранения наборов и сывороток крови при 2–8 °С;
- центрифуга и термостат для получения сывороток крови, взятой у обследуемых;
- полистироловые 96-луночные планшеты для иммунологических реакций однократного применения с **У-образным (круглым)** дном отечественного («Медполимер», г. С.-Петербург) или зарубежного (Dunatech M24A или др.) производства;
- автоматические пипетки, обеспечивающие дозирование в пределах от 10 до 200 мкл;
- пластиковые наконечники однократного применения с объемом до 200 мкл для автоматических пипеток;
- стол, обеспечивающий неподвижное горизонтальное положение 96-луночного планшета во время инкубации внесенных реагентов.

Несмотря на то, что Российские РПГА-наборы укомплектованы микропланшетами однократного применения, требуется самостоятельное приобретение их дополнительного количества, поскольку часть лунок прилагаемого к набору планшета непосредственно не включается в процедуру тестирования, а служит для предварительного разведения образцов и постановки обязательных проб на спонтанную агглютинацию контрольных эритроцитов.

Получение исследуемого материала

Для проведения РПГА преимущественно используется непрогретая сыворотка крови. Однако Инструкции по применению некоторых

РПГА-наборов, в том числе «Сифилис РПГА-теста» (ЗАО ЭКОлаб), допускают постановку РПГА с прогретой сывороткой, а также плазмой крови и СМЖ.

С целью получения сыворотки взятие крови производят натощак или не ранее 6 часов после приема пищи. Кровь из локтевой вены в количестве 7–10 мл берут в сухую чистую маркированную пробирку, не содержащую антикоагулянтов. Снятие сыворотки со сгустка рекомендуется проводить в течение первых нескольких часов после забора крови во избежание инактивации АТ к *T.pallidum* протеолитическими ферментами форменных элементов. Взятая кровь помещается в термостат при 37 °С на 30–60 мин, а затем выдерживается при температуре 4 °С в течение 1–1,5 часов. При необходимости образовавшийся сгусток отделяют стеклянной палочкой от стенок пробирки и центрифугируют 15 минут при 1000 об/мин. Не допускается применение одного инструмента для обведения сгустков крови от разных обследуемых во избежание ложноположительных результатов.

Желтушные, хилезные, гемолизированные и проросшие сыворотки для исследований не применяются.

Кровь или сыворотка должны доставляться в лабораторию в маркированных закрытых пробирках с соответствующей сопроводительной документацией. Время транспортировки во всех случаях должно быть, по возможности, минимальным. Не допускается замораживание крови и ее транспортировка при температуре выше 30 °С.

Срок хранения снятых сывороток крови, предназначенных для постановки РПГА, не должен превышать 5 суток при 2–8 °С.

Сыворотки крови могут быть однократно заморожены при –20 °С, что допускает их хранение без потери активности АТ к *T.pallidum* не более 6 недель; повторное замораживание сывороток после оттаивания недопустимо.

Для получения плазмы используют капиллярную или венозную кровь с добавлением 3-х замещенного цитрата натрия, ЭДТА или гепарина в качестве антикоагулянтов. Форменные элементы крови осаждают отстаиванием или центрифугированием, как описано выше. Исследование надосадочной жидкости (плазмы крови) на АТ к *T.pallidum* в РПГА выполняется по схеме анализа сыворотки крови (если это допускается производителем РПГА-наборов).

Процедура получения СМЖ проводится врачами неврологами, хирургами, инфекционистами. Ликвор собирают в сухую стерильную маркированную пробирку, которая в максимально короткий срок доставляется в лабораторию на исследование. Как правило, СМЖ прозрачна

и пригодна для анализа в РПГА без предварительной обработки. При наличии примесей эритроцитов или других клеточных элементов требуется ее центрифугирование до получения прозрачной надосадочной жидкости. Правила транспортировки и хранения СМЖ, в том числе и в замороженном состоянии, аналогичны таковым для сыворотки крови. При выполнении РПГА необходимо помнить о том, что начальные и конечные разведения ликвора уменьшаются (см. ниже), поскольку титры специфических АТ в СМЖ значительно меньше таковых в крови.

Подготовка компонентов набора для РПГА и исследуемых сывороток

Комплект компонентов различных отечественных и зарубежных наборов для постановки РПГА (ТРНА) с целью определения АТ к *T.pallidum* практически одинаков и содержит:

1. Флакон с птичьими тест-эритроцигами (ТЭ), сенсibilизированными АГ *T.pallidum* (как правило, патогенного штамма Nichols). С целью предотвращения ложноположительных ответов РПГА в результате перекрестного взаимодействия ТЭ набора с АТ к непатогенным трепонемам в суспензию эритроцитов могут быть добавлены экстракты культуры *Treponema Reiter*.

2. Флакон с птичьими контрольными эритроцитами (КЭ), не сенсibilизированными АГ *T.pallidum*;

3. Буфер для разведения;

4. Жидкую или лиофилизированную контрольную положительную сыворотку человека (К+), содержащую АТ к *T.pallidum*;

5. Жидкую или лиофилизированную контрольную отрицательную сыворотку человека (К-), не содержащую АТ к *T.pallidum*.

Большинство РПГА-наборов отечественного производства рассчитано на 100 определений, включая контроли. Наборы «Сифилис РПГА-тест» производства ЗАО «ЭКОлаб» позволяют выбрать 2 варианта диагностических препаратов — комплект 1 для проведения качественного варианта РПГА и комплект 2 для качественного и количественного вариантов анализа (рис. 1).

При работе с компонентами наборов для РПГА от любого производителя следует соблюдать меры предосторожности, принятые при контактировании с токсичными веществами и инфицированным материалом. Это связано с тем, что жидкие реагенты РПГА-набора наиболее часто содержат 0,095–0,1% азид натрия в качестве консерванта, который может быть токсичным при попадании внутрь. Несмотря на то, что положительный и отрицательный контроли являются инактивированными

человеческими сыворотками, не содержащими HBsAg, а также АТ к ВИЧ-1 и ВИЧ-2, работать с ними следует как с потенциально опасными, соблюдая меры предосторожности согласно СП 3.3.2.1288-03.

Компоненты набора для проведения РПГА и тестируемые сыворотки перед постановкой должны быть выдержаны при комнатной температуре (22–25 °С) в течение не менее 15–20 минут. Особое внимание необходимо уделять тщательному перемешиванию (ручное встряхивание) содержимого флаконов с КЭ и ТЭ до образования гомогенной суспензии и исчезновения плотного осадка эритроцитов на дне или стенках флаконов. Перед процедурой встряхивания необходимо убедиться в том, что КЭ и ТЭ не подсохли на стенках флаконов в процессе хранения набора. В связи с тем, что оседание эритроцитов приготовленной суспензии происходит достаточно быстро, в процессе работы следует поддерживать сохранение ее однородности во флаконе, из которого производится раскапывание. При образовании осадка или намечающегося расслаивания необходимо встряхивать флакон.

Аналитическая процедура

Принципиальное сходство РПГА-наборов на сифилис от различных производителей позволяет обобщить наиболее важные моменты в проведении аналитического этапа данного вида исследования. При этом следует помнить, что выполнение преаналитических и аналитических процедур, а также учет результатов РПГА должны осуществляться только в точном соответствии с Инструкциями по применению к конкретным диагностическим наборам.

Все РПГА-наборы дают возможность проведения первоначальной качественной оценки исследуемых сывороток на наличие АТ к T.pallidum, а при получении позитивного ответа — выполнения количественного варианта анализа, или титрования первично-положительных сывороток. Последнее позволяет исключить ошибку при первой постановке и дать полуколичественную оценку содержания противотрепонемных АТ в пробах.

Выполнение РПГА на наличие АТ к T.pallidum в **качественном варианте** (рис. 2) включает:

- 1) Приготовление начального и рабочего разведений контрольных и тестируемых сывороток с применением разводящего буфера. Начальное разведение производится либо непосредственно в лунках микропланшета, либо во вспомогательных микропробирках (последнее позволяет использовать U-образные планшеты более рационально). Необходимо строго соблюдать требование использования индивиду-

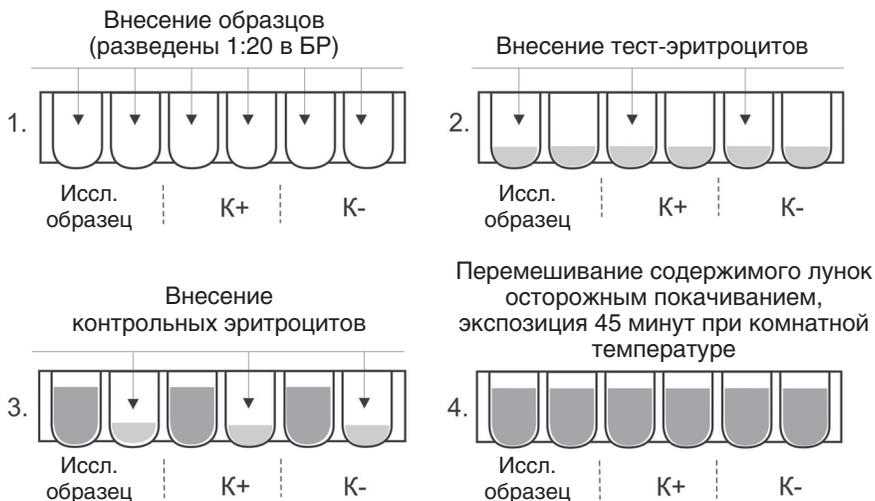


Рис. 2. Схема постановки для качественного определения антител к *Treponema pallidum* при использовании тест-системы «Сифилис-РПГА-тест» производства ЗАО «ЭКОлаб»

альных наконечников для буферного раствора и каждой из сывороток, а также проводить тщательное пипетирование содержимого лунок, в которых готовятся разведения образцов. Рабочее разведение контрольных и исследуемых сывороток в двух лунках, предназначенных для последующего добавления в них КЭ и ТЭ, как правило, составляет 1:20. Конкретные рекомендации по оптимальному использованию лунок горизонтального и вертикального рядов планшета для процедур подготовки начального и рабочего разведений приведены в «Инструкциях по применению» к различным наборам.

2) Добавление с помощью автоматического дозатора 75 мкл суспензии ТЭ в первый ряд лунок контрольных (К+ и К-) и тестируемых сывороток с рабочим разведением 1:20, а затем 75 мкл суспензии КЭ в смежный второй ряд лунок, содержащих те же сыворотки в аналогичном рабочем разведении. Конечное разведение во всех лунках после добавления КЭ и ТЭ составляет 1:80.

3) Осторожное покачивание планшета вручную после раскапывания реагентов с целью перемешивания содержимого лунок до гомогенной суспензии. Затем необходимо закрыть планшет и после экспозиции в течение 45–60 минут при комнатной температуре на горизонтальной

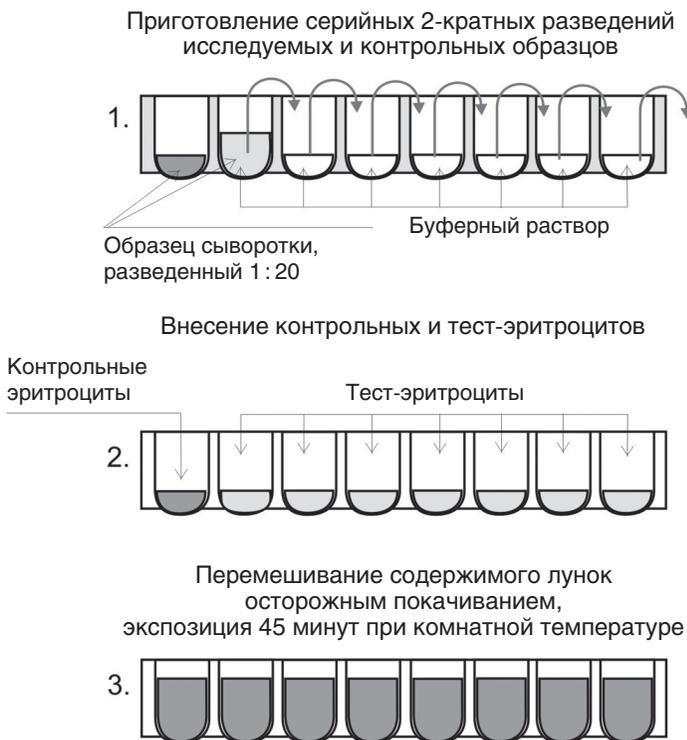


Рис. 3. Схема постановки для определения титра антител к *Treponema pallidum* при использовании тест-системы «Сифилис-РПГА-тест» производства ЗАО «ЭКОлаб»

неподвижной поверхности оценить характер агглютинации КЭ и ТЭ. Планшет может быть оставлен на ночь, при этом результат РПГА не искажается.

Постановка РПГА на наличие АТ к *T.pallidum* в **количественном варианте** (рис. 3) производится для установления титра контрольной положительной сыворотки с целью оценки пригодности РПГА-набора, а также при получении первичного положительного результата (в том числе слабopоложительного) в качественной реакции с исследуемыми сыворотками пациентов. Процедура титрования сывороток включает:

1) Выделение для титрования положительных сывороток 8 лунок в смежных рядах планшета и маркировку выбранных рядов.

2) Внесение исследуемых сывороток и выполнение 2-кратных серийных разведений (начиная со 2-й лунки) сывороток фосфатно-солевым буфером для получения их рабочих разведений с 1:40 до 1:2560 (в РПГА-наборах других производителей могут быть рекомендованы рабочие разведения 1:20 – 1:1280).

3) Внесение 75 мкл КЭ в первые (разведение 1:20) лунки смежных рядов и по 75 мкл ТЭ во вторые (1:40) и последующие лунки для получения конечных 2-кратных серийных разведений от 1:160 до 1:10240. Следует иметь в виду, что рекомендуемое конечное разведение контрольных положительных сывороток в различных РПГА-наборах может варьировать от 1:2560 (например, «Syphilis TRNA TEST», Human) до 1:10240 («Сифилис РПГА-тест», ЭКОлаб). Более «растянутый» ряд последовательных разведений, дающих положительный результат, свидетельствует о более высокой чувствительности набора.

4) Покачивание планшета и соблюдение условий экспозиции, обеспечивающих достоверные результаты (не отличаются от приведенных выше для качественной реакции).

Как уже отмечалось, схема постановки любых модификаций РПГА с плазмой крови при использовании набора производства ЗАО «ЭКОлаб» не отличается от представленной выше. В то же время, в соответствии с результатами совместной работы коллектива соавторов из ЦНИКВИ (г. Москва) и Саратовского ОКВД [Фриго Н.В. и соавт., 2007], а также в соответствии с данными независимо выполненных научно-производственных разработок специалистов ЗАО «ЭКОлаб», тестирование СМЖ требует снижения начального разведения ликвора в 4 раза (с 1:20 до 1:5). Дальнейшая схема постановки качественного и количественного вариантов РПГА при тестировании ликвора аналогична процедуре РПГА с сыворотками крови. При этом, однако, необходимо учитывать, что все конечные разведения в лунках после внесения КЭ и ТЭ также уменьшаются в 4 раза (от 1:20 до 1:2560 в случае титрования СМЖ).

*Важно! Перед тем, как начать тестирование плазмы или СМЖ в РПГА, убедитесь, что Производитель оговаривает возможность использования этого материала в Инструкции по применению, а сам РПГА-набор имеет Регистрационное удостоверение. В связи с этим следует отметить, что набор «Сифилис РПГА-тест» производства ЗАО «ЭКОлаб» для анализа сыворотки, плазмы и СМЖ на наличие в них специфических АТ к *T.pallidum* находится на заключительной стадии утверждения необходимой НД.*

Учет реакции пассивной гемагглютинации

Учет результатов РПГА, выполненной **в качественном варианте**, проводится следующим образом (рис. 4). В случае положительной реакции образуется ровный слой («зонтик») агглютинированных эритроцитов по всей поверхности лунки, а при отрицательной реакции — компактный осадок («пуговка») эритроцитов в центре лунки. При слаболожительной реакции эритроциты образуют характерное кольцо с небольшим просветом в центре компактного осадка. Согласно приказу МЗ РФ №87 от 26.03.2001 г. и рекомендациям Инструкций по при-



Рис. 4. Учет результатов при использовании тест-системы «Сифилис-РПГА-тест» производства ЗАО «ЭКОлаб»

менению многих производителей, оценка степени позитивности РПГА проводится визуально по привычной для практических специалистов 4-х крестовой системе:

“4+” ⇒ положительная РПГА — эритроциты равномерно выстилают всю поверхность лунки, иногда в виде зонтика со складчатым краем (последнее может быть следствием высокой концентрации антитрепонемных АТ в исследуемой сыворотке);

“3+” ⇒ положительная РПГА — эритроциты выстилают всю поверхность лунки, но часть их соскальзывает к центру, формируя тонкое кольцо по периферии образовавшегося «зонтика»;

“2+” ⇒ слаболожительная РПГА — эритроциты образуют характерное широкое кольцо с небольшим просветом в центре;

“1+” ⇒ эритроциты образуют плотное кольцо небольшого размера с незначительным просветом в центре; трактовка в подобных случаях требует особой осторожности, и наиболее правильным решением

является установление сомнительного результата с рекомендацией повторного исследования пациента в том же РПГА-наборе через 1–2 недели поскольку:

– признание такого результата слабopоложительным при визуальной оценке может не быть свидетельством истинной позитивности тестируемой сыворотки, что согласуется с указанием приказа МЗ РФ №87 по трактовке ответа РПГА на 1+ как негативного;

– данный результат, однако, способен отражать начавшуюся сероконверсию при первичном сифилисе, в связи с чем признание его отрицательным также может стать ошибочным.

В случае отрицательного результата эритроциты ровным плотной «пуговкой» лежат в центре дна лунки (без окружающей зернистости).

Полученные в РПГА положительные или отрицательные результаты признаются достоверными только при соблюдении ниже перечисленных условий:

- в лунках с положительной и отрицательной контрольными сыворотками, а также в лунках с тестируемыми сыворотками крови реакция с КЭ должна быть отрицательной («пуговки» на дне лунок);

- в лунке с отрицательной контрольной сывороткой реакция с ТЭ также должна быть отрицательной;

- в лунке с положительной контрольной сывороткой добавление ТЭ должно формировать «зонтик» на 4+ в первом разведении 1:80, а конечное разведение контрольной положительной сыворотки, которое обеспечивает получение результата на 2+ или 1+ (титр реакции), определяется Инструкцией по применению, но, как правило, не должно быть ниже 1:1280; при этом менее высокий титр РПГА с контрольной положительной сывороткой свидетельствует о снижении чувствительности набора и необходимости его выбраковки.

Таким образом, агглютинация ТЭ с испытуемыми сывороткой, плазмой или СМЖ при соблюдении вышеперечисленных условий свидетельствует о наличии в данных образцах специфических антител к *Treponema pallidum*. Отсутствие агглютинации ТЭ в пробе при адекватных результатах всех контролей указывает на то, что АТ к возбудителю сифилиса в материале от данного обследуемого нет или же титр специфических антител ниже, чем чувствительность набора (ограничение для любого метода серодиагностики). Агглютинация КЭ наряду с ТЭ может свидетельствовать о наличии в пробе антиэритроцитарных АТ и тестирование данного образца следует повторить после его абсорбции. Для этого образец разводят суспензией КЭ в соответствии с Инструкцией по применению, перемешивают и оставляют при комнатной тем-

пературе на 45–60 минут. Затем получают супернатант центрифугированием суспензии в течение 3 минут при 2000 об/мин. Надосадочная жидкость тестируется повторно так же, как и исходный биологический материал.

Учет результатов РПГА в количественном варианте не отличается от такового в качественном анализе. Первое конечное разведение сыворотки или плазмы для количественного определения — 1:80 или 1:160 в зависимости от рекомендуемой производителем схемы разведения. В случае СМЖ конечные разведения уменьшаются в 4 раза. Как отмечалось выше, титром сыворотки (плазмы, СМЖ) считается максимальное разведение образца, в котором наблюдается агглютинация ТЭ. В случае правильного выполнения процедуры титрования степень выраженности гемагглютинации должна уменьшаться в направлении от 2 до 8 лунки.

Формулировка результата РПГА

В случае **положительного** результата в бланке направления на РПГА используется формулировка (пример):

Обнаружены АТ к T.pallidum в титре 1:2560 (положительный, 4+).

При **отрицательном** результате выдается следующее заключение:

АТ к T.pallidum не обнаружены (отрицательный).

4. ИСТОЧНИКИ ОШИБОК ПРИ ПРОВЕДЕНИИ РПГА

Общепризнанные достоверность и воспроизводимость результатов определения АТ к T.pallidum в РПГА обусловлены как высокими показателями ее чувствительности и специфичности, так и унификацией соответствующих наборов, которые укомплектованы всеми необходимыми стандартизированными компонентами, что исключает их неконтролируемое приготовление в лабораторных условиях. Кроме того, протокол постановки РПГА при использовании допущенных к применению коммерческих наборов значительно проще аналитических протоколов всех других специфических серологических реакций на сифилис, регламентированных приказом МЗ РФ №87. Отсутствие необходимости взвешивания реагентов, измерения рН растворов, термостатирования проб на этапе их инкубации, а также возможность надежной визуальной оценки результатов РПГА предотвращает возникновение большинства ошибок, связанных с использованием средств измерений, которые требуют специальных навыков работы и периодического метрологического контроля.

Однако, несмотря на перечисленные достоинства коммерческих РПГА-наборов, в отдельных случаях получение недостоверных результатов возможно. Целесообразно выделить две основные группы неудач тестирования на сифилис в РПГА:

- неудачи, связанные с недостаточным уровнем квалификации или снижением профессиональной ответственности персонала лаборатории (небиологические);
- неудачи, обусловленные особенностями тестируемых образцов (биологические).

Основу ошибочных результатов РПГА **небиологического** характера, как правило, составляет несоответствие квалификационным требованиям, которые предъявляются к исполнителям серологических реакций на сифилис. Согласно приказу МЗ РФ №87 от 26.03.2001 г., для постановки РПГА, как и других серологических тестов на АТ к *T.pallidum*, должны быть выделены врачи и лаборанты, прошедшие соответствующую подготовку в учреждениях дерматовенерологического профиля, а также на кафедрах микробиологии и клинической лабораторной диагностики в составе учреждений последипломного образования врачей. При этом действия среднего персонала лаборатории контролируются обученными врачами, которые также ответственны и за оценку полученных результатов. Приводимые ниже типичные ошибки в выполнении РПГА так или иначе обусловлены исполнительской неподготовленностью или небрежностью проведения процедуры исследования:

1) несоблюдение условий и сроков хранения РПГА-наборов являются причиной снижения чувствительности реакции и получения ложноотрицательных ответов;

2) использование для РПГА сывороток крови, подлежащих выбраковке (см. раздел 3) – в таких случаях концентрация АТ к *T.pallidum*, способных вступать в специфическое взаимодействие с АГ на поверхности ТЭ, может быть снижена до критического уровня, что является предпосылкой для получения ложноотрицательных результатов;

3) несоблюдение указаний производителей на необходимость использования только рекомендованного ими вида исследуемого материала, поскольку в различных модификациях РПГА применение не сыворотки, а плазмы крови, содержащей антикоагулянт, по данным фирмы Fujirebio Inc. (Япония), способно вызывать неспецифическую агглютинацию эритроцитов, что приводит к получению некорректных результатов; как уже отмечалось, «Сифилис РПГА-тест» ЗАО «ЭКОлаб» позволяет проводить тестирование и сыворотки, и плазмы крови;

4) контаминация сывороток пациентов, серонегативных в отношении *T.pallidum*, следами сывороток серопозитивных лиц, что имеет место при обведении сгустков крови в разных пробирках одним инструментом или при несвоевременной замене одноразовых наконечников автоматических дозаторов; в подобных случаях высока вероятность получения ложноположительного результата;

5) применение наконечников и планшетов, использованных ранее; следует помнить, что трудноудаляемые при мытье пластика дезинфектанты и детергенты способны модифицировать результат РПГА непредсказуемым образом;

6) несоблюдение объемных соотношений исследуемых сывороток и реагентов РПГА, что не позволяет достигнуть конечных разведений, рекомендованных Инструкцией по применению набора (небрежность работы, неисправность автоматических дозаторов);

7) использование не U-образных 96-луночных планшетов для иммунологических реакций, которые обеспечивают требуемое соскальзывание эритроцитов в «пуговку» при отсутствии агглютинации как за счет оптимальной формы дна, так и за счет необходимых электростатических характеристик пластика, применяющегося для их изготовления;

8) недостаточно тщательная подготовка осадка КЭ и ТЭ до гомогенного состояния, что нарушает установленные производителем оптимальные соотношения растворимых и клеточных компонентов РПГА, снижая чувствительность и воспроизводимость суспензионного диагностического теста;

9) пренебрежение требованием хранения осадка эритроцитов на дне флакона под слоем буферного раствора — подсыхание клеток неизбежно приводит к некорректным результатам РПГА;

10) несоблюдение требуемой экспозиции (не менее 45 мин) после добавления в лунки КЭ и ТЭ — преждевременный учет реакции может привести к получению ложноположительных результатов;

11) пренебрежение требованием обеспечения оседания эритроцитов на горизонтальной неподвижной поверхности — вибрация от приборов или других ее источников способна помешать образованию «зонтиков» агглютинации и привести к ложноотрицательным результатам.

Биологически обусловленные ошибки тестирования сывороток в РПГА на наличие АТ к *T.pallidum* встречаются редко и могут проявляться в получении как ложноположительных, так и ложноотрицательных результатов.

Ложноположительные результаты РПГА на сифилис вероятны при исследовании сывороток крови больных невенерическими трепонема-

тозами (фрамбезия, беджель, пинта), возбудители которых (*T.pertenue*, *T.bejel*, *T.carateum*) имеют родоспецифические АГ, сходные с АГ *T.pallidum*, в связи с чем образующиеся к ним АТ способны вступать в перекрестные взаимодействия с АГ возбудителя сифилиса [Прохоренков В.И. и др., 2003]. Подобная проблема одинаково актуальна для всех трепонемных серодиагностических тестов (РСКт, ИФА, РИФ, РИТ).

При этом следует учитывать, что Российская Федерация не является территорией, эндемичной по данной группе заболеваний, которые встречаются в странах Африки, Южной Азии и Латинской Америки, и, следовательно, такие ситуации маловероятны в повседневной практике лечебных учреждений.

Другими факторами возникновения ложноположительных результатов РПГА считаются некоторые хронические бактериальные инфекции (лепра), ряд заболеваний вирусной этиологии (инфекционный мононуклеоз), системные болезни соединительной ткани и наркомания. При этих состояниях отмечается развитие иммунологических нарушений, приводящих к аномальной продукции АТ, способных перекрестно реагировать с трепонемными АГ.

Ложноотрицательные результаты РПГА, вызванные биологическими факторами, могут быть обусловлены конкуренцией между специфическими IgM и IgG за связывание с АГ на поверхности эритроцитов, а также феноменом прозоны [Дмитриев Г.А., Фриго Н.В., 2004]. В последнем случае агглютинации не происходит из-за гиперпродукции АТ к *T.pallidum*, поскольку каждый АГ-рецептор на эритроцитах из-за избытка АТ связан с одной молекулой агглютинина, что препятствует образованию «решетки». Положительная реакция наступает при большем разведении сыворотки и достижении зоны эквивалентных соотношений АГ и АТ. Феномен прозоны не должен оцениваться как характерный недостаток РПГА, поскольку наблюдается при проведении и других серологических реакций на сифилис [Taniguchi S. et al., 1995].

5. ЗНАЧЕНИЕ РПГА В СЕРОДИАГНОСТИКЕ СИФИЛИСА (ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ)

В приказе МЗ РФ №87 от 26.03.2001 г. «О совершенствовании серологической диагностики сифилиса» приведена следующая оценка эффективности применения РПГА для выявления сифилитической инфекции. *«В ЦНИКВИ на большом материале с отечественным диагностикумом изучена результативность РПГА по сравнению с другими тестами на сифилис при исследовании сывороток крови больных*

с различными формами сифилиса до лечения. В РПГА получено 99,4% положительных результатов, в РИФ-абс — 99,1%, РИФ-200 — 99,1%, РИТ — 87,7%, МР — 95,8%, в РСК с трепонемным антигеном — 95,8%, РСК с кардиолипидным антигеном — 90,2%. В зарубежной литературе имеются указания на более позднюю выработку гемагглютининов у больных в ранний период заболевания, хотя в ЦНИКВИ выявлен высокий процент положительных результатов при сифилисе первичном, серопозитивном — 97,7%. Общее мнение исследователей заключается в том, что РПГА является ценным диагностическим тестом при всех формах сифилиса, но особенно чувствительна она при поздних формах заболеваний».

Официальным признанием высокой диагностической надежности РПГА стало ее включение в перечень методов, допущенных приказом МЗ РФ №87 для использования в практическом здравоохранении России. Важно отметить, что РПГА в этом нормативном документе отнесена к тестам универсального назначения, которые могут одинаково успешно применяться как при обязательном профилактическом обследовании групп населения на сифилис (скрининге), так и для подтверждения диагноза сифилитической инфекции в специализированных дерматовенерологических учреждениях.

Основанием для использования РПГА в целях **скрининга** является ее высокая чувствительность, не уступающая [Deguchi M. et al., 1994] или даже превышающая [Дмитриев Г.А. и др., 2001] таковую РИФабс, которая до недавнего времени являлась «золотым стандартом» серодиагностики сифилиса. Другими не менее важными требованиями для отнесения теста к категории скрининговых являются его высокая воспроизводимость, а также простота и скорость постановки реакции. Всем перечисленным условиям РПГА отвечает в полной мере [Акопова З.П., Дмитриев Г.А., 1997]. В отличие от РИФабс, которая не может быть применена для массовых ежедневных постановок ввиду трудоемкости ее выполнения, РПГА требует минимального кадрового обеспечения и временных затрат, предоставляя при этом возможность выявлять серопозитивных лиц с эффективностью наиболее чувствительных эталонных реакций на сифилис. Рассмотренные выше положения о высокой надежности и массовой доступности являются основанием для признания РПГА реакцией выбора при проведении скрининга в группах обследуемых на сифилис, тестирование которых только в реактивных тестах (РМП, RPR), согласно приказу МЗ РФ №87, не достаточно (доноры, беременные, больные глазных, психоневрологических и кардиологических стационаров). В перечисленных группах при отмене

Вассермановского КСР с 2006 г. для профилактического обследования на сифилис достаточно использование только РПГА или только ИФА, которые сопоставимы по своей диагностической эффективности. Исключение составляют доноры, которым РПГА (или ИФА) нужно проводить в комплексе с РМП (RPR). Как отмечалось выше, потенциал РПГА как скринингового метода, может быть увеличен за счет автоматизации процедуры учета результатов с помощью зарубежных или отечественных приборов и прилагаемых к ним программ. К подобному оборудованию относятся аппаратно-программные комплексы «Критерий-2», «Эксперт-Лаб», ридеры типа Anthos LP400, MRX, MR7000, Dynateh MRXII и автоматические анализаторы типа Olimpus PK 3000.

Значение РПГА как **диагностического** теста оценивается не менее высоко. Согласно приказу МЗ РФ №87, РПГА наряду с ИФА, РИТ и РИФ в модификациях отнесена к реакциям подтверждающего (верифицирующего) уровня, назначением которых является диагностика всех форм сифилиса, в том числе и скрытого, а также распознавание ложноположительных результатов, полученных в РМП и КСР. Верифицирующий статус признается только за реакциями, которые наряду с высокой чувствительностью одновременно являются и высокоспецифичными. Традиционно ведущая роль в серологическом подтверждении сифилиса отводилась РИТ, которая не унифицирована, трудоемка и доступна немногим специализированным медицинским учреждениям. По данным специалистов ЦНИКВИ, специфичность РПГА не уступает или превышает таковую в РИТ, достигая 99,3% [Акопова З.П., Дмитриев Г.А., 1997]. Указанный уровень специфичности РПГА значительно позже был подтвержден и работой коллектива авторов, проводившего сопоставление результатов различных серологических тестов с результатами линейного IgG-иммуноблоттинга, который на сегодня не имеет аналогов по диагностической эффективности среди известных методов серодиагностики сифилиса [Кубанова А.А. и др., 2006]. В использованной авторами панели сывороток от больных сифилисом и пациентов с подозрением на ложноположительные серологические реакции чувствительность РПГА составила 100%, превысив таковую в ИФА на IgG, а специфичность РПГА и ИФА достигала 99,3% (в каждой из реакций выявлено по одному сомнительному результату при отрицательном результате иммуноблота с данной сывороткой).

Применение подтверждающих тестов, направленных на обнаружение суммарных АТ или АТ класса G к *T.pallidum*, **для контроля терапии сифилиса** должно проводиться с учетом того, что позитивность этих реакций, включая РПГА, у большинства переболевших сифилисом сни-

жается незначительно даже спустя многие годы после полноценного лечения, хотя отдельные наблюдения по возможности негативации РПГА в динамике сероконтроля терапии сифилиса имеются [Исаков С.А. и др., 1995; Дмитриев Г.А. и др., 2001]. В связи с этим объяснимое отсутствие достоверного (в 4 или более раза) снижения титра АТ может привести к неверному заключению о неэффективности проведенной терапии и необоснованному назначению дополнительного лечебного курса. Согласно приказу МЗ РФ №87, серологический контроль терапии сифилиса осуществляется по динамике снижения титров нетрепонемных, или реагиновых, тестов (РМП или RPR). Однако, несмотря на то, что трепонемные реакции не служат критерием излеченности и больные снимаются с учета на основании негативации РМП при положительных РИТ, РИФ, ИФА, РПГА, завершающий этап контроля терапии сифилиса обязательно должен включать и ту специфическую трепонемную реакцию (например, РПГА), которая была использована на момент установления сифилиса. При этом динамическое тестирование, по возможности, должно проводиться в одной лаборатории с использованием того же набора, который применялся на момент диагностического обследования.

6. ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ РПГА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМАХ СИФИЛИТИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ

Диагностическая эффективность любого серологического теста при сифилисе, включая РПГА, определяется не только номинальным уровнем чувствительности реакции, достигнутым при ее разработке, но и особенностями динамики гуморального иммунного ответа организма на АГ к *T.pallidum*. В соответствии с этим метод будет надежен, когда концентрация определяемых с его помощью АТ выше границы чувствительности данной серологической реакции. Другими словами, наиболее достоверные результаты тестирования можно получить на стадиях сифилиса, при которых отмечается достаточно высокое содержание иммуноглобулинов в крови обследуемого.

Общепринятые представления относительно естественной (без лечения) динамики образования АТ при сифилисе кратко формулируются следующим образом. Первыми после заражения вырабатываются Ig класса М, минимальная концентрация которых, необходимая для индикации рутинными методами, формируется к окончанию 2 недели

инкубационного периода сифилиса [Сидорова Е.В., Ляхов В.Ф., 1995]. Максимальная концентрация IgM в крови наблюдается к 2 месяцам с момента заражения *T.pallidum*, а затем начинает снижаться вплоть до неопределяемых значений в течение 6–12 месяцев после инфицирования [Вашукова С.С., Макарова Н.Г., 1996; Гражданцева А.А. и др., 1998]. Иммуноглобулины класса G в выявляемых стандартными методами концентрациях начинают циркулировать в крови через 4 недели от момента инфицирования бледной трепонемой [Янг Х., 2001], а затем их синтез активно прогрессирует. Достигнутый к 6–8 месяцам сифилитической инфекции максимум IgG постепенно уменьшается со временем, однако концентрации этого класса АТ, достаточные для эффективного определения с помощью РПГА или ИФА, сохраняются в течение многих лет, а нередко и пожизненно.

При внутриутробном заражении возбудителями различных инфекций, в том числе и *T.pallidum*, специфическая иммунологическая реакция также начинается синтезом IgM, которые образуются у плода с 3-го месяца беременности [Сидорова Е.В., Ляхов В.Ф., 1995; Вашукова С.С., Макарова Н.Г., 1996]. Способность к внутриутробно инициированному синтезу специфических IgM сохраняется и в неонатальный период. В противоположность антитрепонемным IgM, способным оказаться в крови новорожденного только при его инфицировании возбудителем сифилиса, наличие в крови плода или новорожденного IgG к *T.pallidum* может являться следствием их трансплацентарного переноса от матери [Руководство по лечению ЗППП, 1998]. Последнее осложняет трактовку положительных результатов тестов на суммарные АТ или АТ класса G с момента рождения до 6–8 месяцев жизни новорожденного, после которых уровень материнских IgG интенсивно снижается, а прогрессирующий синтез собственных АТ этого класса обеспечивает их высокую концентрацию в крови ребенка [Петров Р.В., 1987; Эпштейн О. и др., 2001]. Окончательная элиминация пассивно перенесенных от матери АТ к трепонемам обычно наблюдается к 15 месяцам с момента рождения и если положительные реакции трепонемных тестов определяются у ребенка старше 18 месяцев, то эта серопозитивность классифицируется как врожденный сифилис [Руководство по лечению ЗППП, 1998].

Представленные закономерности синтеза и элиминации АТ, определяемых в тестах для серодиагностики сифилиса, позволяют объективно оценить существующие взгляды на надежность РПГА при различных вариантах сифилитической инфекции, которые в обобщенном виде представлены в таблице 1.

Таблица 1

Классификация сифилиса по МКБ 10 (с сокращениями)

Группа по МКБ-Х	Время после заражения
A51 Ранний сифилис Первичный сифилис: – половых органов; – анальной области; – других локализаций Вторичный сифилис: – кожи и слизистых оболочек; – другие формы Ранний сифилис скрытый Ранний сифилис неуточненный	от 3 недель до 3 месяцев от 2 месяцев до 3–4 лет < 2 лет
A 52 Поздний сифилис Сифилис сердечно-сосудистой системы Нейросифилис: – с симптомами – асимптомный – неуточненный Другие симптомы позднего сифилиса Поздний сифилис скрытый Поздний сифилис неуточненный	на любой стадии сифилиса ≥ 2 лет
A 50 Врожденный сифилис Ранний врожденный Поздний врожденный	< 2 лет с момента рождения ≥ 2 лет с момента рождения
A 53 Другие и неуточненные формы Сифилис скрытый неуточненный как ранний или поздний Сифилис неуточненный	

Первичная стадия сифилиса представляет наибольшую сложность для надежного тестирования в любой серологической реакции. При этом наиболее проблематично получить положительный результат серологического обследования стандартными методами (КСР, РИФ, ИФА, РПГА) в бессимптомный инкубационный период до формирования язвенного поражения. Продолжительность последнего варьирует в среднем от 3 до 4 недель после инфицирования [Гарнетт Дж. П. и др., 1998; Протоколы диагностики, 2002], хотя в отдельных случаях может существенно увеличиваться [Романенко и др., 1994]. Как отмечалось выше, на данном этапе наблюдается формирование иммунного ответа с участием IgM при подпороговых концентрациях IgG. Принято

утверждать, что в данной ситуации методы, направленные на выявление IgM, в частности IgM-ИФА-наборы, имеют существенные преимущества перед тестами на суммарные АТ или IgG [Сидорова Е.В., Ляхов В.Ф., 1995; Янг Х., 2001]. Однако на практике более высокая, чем в РПГА, IgG-ИФА и КСР, чувствительность отечественных IgM-ИФА-наборов не была подтверждена даже при наличии клинических проявлений первичного сифилиса [Куляш Г.Ю., 2002; Герасимова Н.М. и соавт., 2004].

Через 3-4 недели после заражения отмечается образование характерного первичного аффекта (твердого шанкра) различных локализаций в зависимости от места внедрения бледной трепонемы. На ранней стадии клинических проявлений первичного сифилиса (1-2 недели после появления твердого шанкра) позитивация стандартных серологических реакций возможна, однако ложноотрицательные результаты способны превышать 85% [Олисов А.О. и др., 1997]. При этом данные литературы не позволяют ожидать существенных преимуществ диагностической эффективности РПГА перед КСР [Дмитриев Г.А., Брагина Е.Е., 1996], а наиболее простым и целесообразным является обнаружение живых бледных трепонем в серозном отделяемом шанкра методом темнопольной микроскопии.

Спустя 2 недели после формирования твердого шанкра у части больных отмечаются достаточно высокие уровни как IgM, так и IgG к *T.pallidum*, что, как правило, сочетается и с существенным повышением концентрации реагинов. Последние представляют собой суммарную фракцию (G и M) неспецифических АТ к кардиолипиновому АГ, выявляемых в РМП (RPR) и РСКк. В то же время на указанном этапе инфицирования особенности индивидуального иммунного ответа и штаммовые различия вирулентности *T.pallidum* еще не позволяют достичь серологическим реакциям своей максимальной эффективности и относительное преимущество получают более чувствительные методы – РИФ, а также ИФА и РПГА, аналитическая чувствительность которой в наборе «Сифилис РПГА-тест» (ЗАО «ЭКОлаб») составляет 0,05 МЕ/мл по международному стандарту NIBSC (London, UK). По данным исследований, проведенных в Саратовском областном КВД, превосходство РПГА перед реакциями классического КСР при первичном сифилисе было существенным – 40% положительных результатов в РПГА и только 20% позитивных ответов в КСР [Куляш Г.Ю. и соавт., 2005]. Таким образом, значительная часть первичного сифилиса, серонегативного в Вассермановском КСР, способна оказаться серопозитивной в случае применения РПГА, что согласуется с наблюдениями других специалистов [Сивак В.В., 2004].

В завершающей стадии первичного сифилиса (6–8 недель после инфицирования) на фоне высокой концентрации антитрепонемных и реакиновых АТ классов М и G большинство тестов, включая реакции Вассермана, становятся положительными у подавляющей части обследуемых [Аковбян В.А., 2003], в связи с чем его клиническая и серологическая диагностика в основном не представляет затруднений.

Анализируя изложенное, следует заключить, что указанная в приказе МЗ РФ №87 чувствительность РПГА при первичном сифилисе (97,7%), достижима только начиная со второй половины этого периода заболевания (серопозитивный сифилис согласно старой классификации). В более ранние сроки первичного сифилиса ее чувствительность, как и чувствительность ИФА, может быть ниже, превышая, однако, таковую в Вассермановском КСР. Последнее позволяет сделать вывод о том, что РПГА является необходимым серодиагностическим тестом при первичном сифилисе, но должна использоваться в комплексе с другими серологическими реакциями (ИФА, РИФ, РМП) и методом темнопольной микроскопии. В случае применения РПГА в качестве единственного трепонемного теста и получении в ней отрицательного результата при наличии язвенных поражений кожи или слизистых оболочек исключение первичного сифилиса недопустимо, а тест должен быть воспроизведен через 1–2 недели с учетом вероятной сероконверсии и позитивного ответа повторной РПГА.

В отличие от первичного сифилиса, другие формы ранней сифилитической инфекции, входящие в группу А 51, как правило, не представляют сложности для проведения достоверной серодиагностики в большинстве трепонемных тестов. При этом РПГА выявляет позитивные сыворотки больных вторичным и ранним скрытым сифилисом практически в 100% случаев. Последнее определяется как высокой чувствительностью коммерческих РПГА-наборов, так и достаточным уровнем суммарных АТ (преимущественно IgG) в сыворотках пациентов с указанными вариантами сифилиса. Для установления диагноза вторичного сифилиса в подавляющем большинстве случаев достаточно положительных результатов одного из трепонемных тестов и отборочной реакиновой реакции (например, «РПГА-РМП»), поскольку в распоряжении дерматовенеролога имеются убедительные клинико-анамнестические данные. При скрытом сифилисе, в том числе и раннем, видимые клинические проявления отсутствуют, а получение убедительных анамнестических сведений нередко представляет трудности. В связи с этим приказом МЗ РФ №87 устанавливается необходимость проведения диагностики латентного сифилиса с использованием двух

специфических тестов одновременно. Для большинства Российских КВД сочетание РПГА и ИФА является оптимальным и доступным. Дополнительно необходимо отметить, что сифилитическая инфекция на современном этапе претерпевает существенную эволюцию [Потекаев Н.С., Потекаев С.Н., 2002], что выражается, в частности, и в изменении классической характеристики иммунного ответа при раннем сифилисе. Так, при вторичном сифилисе, при котором риск получения ложноотрицательных результатов в любых нетрепонемных и трепонемных тестах традиционно признавался минимальным, в последние годы нередко наблюдаются отрицательные результаты РМП и реакций Вассермана [Чеботарев В.В. и др., 1999; Сивак В.В., 2004]. Сыворотки таких больных в РПГА проявляют позитивность, специфичность которой подтверждается другими верифицирующими трепонемными тестами и характерными клинико-anamnestическими данными.

Поздний сифилис (А 52 по МКБ-Х) может протекать бессимптомно или с разнообразными клиническими проявлениями, характерными для поражения бледными трепонемами различных органов и тканей. При этом клиническая диагностика нейросифилиса, третичного, кардиоваскулярного, висцерального и других форм позднего сифилиса способна сталкиваться со значительными сложностями, решение которых требует привлечения консультаций смежных специалистов, а также дополнительных методов лабораторной и инструментальной диагностики. В то же время получение необходимых для установления любого из вариантов позднего сифилиса, в том числе и скрытого, достоверно положительных результатов серологического тестирования на АТ к *T.pallidum* с высокой вероятностью может быть обеспечено практически любым подтверждающим методом. Однако, как отмечалось выше, наиболее надежной из серологических реакций при всех формах позднего сифилиса является РПГА [Акопова З.П., Дмитриев Г.А., 1997; Приказ МЗ РФ №87, 2001]. Попытка получения положительного ответа, особенно необходимого при установлении скрытого позднего сифилиса, в другом специфическом серологическом тесте должна проводиться с применением РИФа_{abc}, РИТ, ИФА на IgG или суммарные АТ. Надежность указанных методов при позднем сифилисе объясняется использованием в этих диагностикумах АТ *T.pallidum* патогенного штамма Николс и длительной циркуляцией соответствующих АТ класса G у большинства лиц, инфицированных на момент обследования или в прошлом. В соответствии с рассмотренными выше динамикой и характером иммунного ответа значительно менее эффективны при серодиагностике позднего сифилиса все реакции на IgM, тесты на ре-

гины (РМП, RPR), а также РСК на АТ к кардиолипиновому АГ и ультразвученному АГ из непатогенных трепонем штамма Рейтер. В то же время проведение одного из тестов на реакины при позднем сифилисе обязательно, поскольку получение в нем позитивного ответа облегчает диагностику и контроль проводимого специфического лечения.

Для установления нейросифилиса требуется исследование на реакины (РСК_к, VDRL) и специфические АТ (РСК_т, РИФ, РИТ, ИФА, РПГА) не только сыворотки крови, но и СМЖ. При нейросифилисе сыворотки крови в РИФ, ИФА, РПГА будут позитивными вследствие высокой чувствительности этих реакций и выраженного иммунного ответа к АГ *T.pallidum* на данной стадии заболевания. В настоящее время только РПГА не входит в перечень методов, рекомендованных приказом МЗ РФ №87 для тестирования СМЖ на специфические АТ к возбудителю сифилиса (включены РСК_т, РИФ_ц, РИТ с цельным ликвором и ИФА на IgG). Вместе с тем, в литературе уже давно указывалось на перспективность использования РПГА для ликвородиагностики при сифилитической инфекции [Люгер А.Ф. и др., 2000; Дмитриев Г.А. и др., 2001]. Как отмечалось выше, в ходе предварительных лабораторных испытаний [Фриго Н.В. и др., 2007] и научно-производственных разработок, выполненных в ЗАО «ЭКОлаб», были установлены оптимальные условия для проведения РПГА с СМЖ пациентов, обследуемых на нейросифилис. При этом достигалась высокая чувствительность ликвородиагностики, что позволило ЗАО «ЭКОлаб» внести протокол анализа СМЖ на АТ к *T.pallidum* в Инструкцию по применению «Сифилис РПГА-теста» (необходимая НД Федерального уровня находится на заключительном этапе утверждения). В связи с этим следует ожидать внедрения РПГА в повседневную практику лабораторной диагностики нейросифилиса в ближайшее время.

Серологическая диагностика врожденного сифилиса, согласно приказу МЗ РФ №327 от 25.07.2003 г., основана на применении комплекса регламентированных в России нетрепонемных (РМП, РСК_к) и трепонемных серологических реакций (РПГА, КСР, ИФА, РИФ, РИТ). Проведение высокочувствительной и специфичной РПГА совместно с РМП как с сывороткой крови матери, так и ребенка целесообразно на любом сроке с момента рождения, а выполнение этого серологического комплекса в динамике увеличивает информативность тестирования. Результат РПГА в совокупности с клинико-анамнестическими данными о матери и ребенке может служить основанием для установления (исключения) раннего или позднего врожденного сифилиса, а также ретроспективного подтверждения правильности ранее выставленного (по эпидемиологическим показаниям) диагноза раннего скрытого

врожденного сифилиса. Выше отмечено, что возможности трактовки значения позитивных результатов РПГА и других трепонемных тестов на IgG или суммарные АТ при серодиагностике сифилиса в неонатальный период ограничены способностью АТ матери класса G циркулировать в крови ребенка. Несмотря на это, установление диагноза раннего врожденного сифилиса на основании положительного результата РПГА во многих случаях является обоснованным с учетом высокой степени риска заражения от больной матери и отсутствия возможности проведения надежного IgM-тестирования крови ребенка с помощью отечественных ИФА-наборов [Приказ МЗ РФ №291, 2001].

Наряду с необходимостью проведения РПГА для диагностики сифилиса другим важнейшим аспектом применения этой трепонемной реакции является исключение скрытого сифилиса при подозрении на ложноположительные результаты скрининговых нетрепонемных и трепонемных тестов, специфичность которых меньше, чем у РПГА (РМП, РСК, ИФА на суммарные АТ). Первичная серопозитивность у

Таблица 2

Результаты обследования на АТ к *T.pallidum* в КСР, РПГА и ИФА пациентов, больных и не больных сифилисом

(Куляш Г.Ю. и соавт. // Клинич дерматол. и венерол., 2005)

№ п/п	Клинический диагноз	Количество случаев по группам	Количество положительных результатов в группах при использовании		
			КСР	РПГА	IgG-ИФА
1.	Сифилис первичный	5	1 (20%)	2 (40%)	2 (40%)
2.	Сифилис вторичный	22	19 (86%)	22 (100%)	22 (100%)
3.	Сифилис скрытый	33	*30 (91%)	**32 (97%)	**32 (97%)
4.	Сифилис исключен:				
4.1.	– у ранее не болевших сифилисом	15	3 (20%)	0	0
4.2.	– у ранее перенесших сифилис	7	0	7 (100%)	7 (100%)

Примечание.

* – КСР оценивался как положительный при любых комбинациях позитивных ответов комплекса реакций «РМП-РСК»;

** – в 1 случае позднего скрытого сифилиса получен сомнительный, но не отрицательный результат.

части пациентов, выявленная в неспециализированных ЛПУ при скрининге с применением указанных тестов на сифилис, при дальнейшем обследовании в КВД нередко не подтверждается в РПГА и ИФА на специфические IgG. Отсутствие при этом клинико-анамнестических данных, необходимых для установления сифилиса, наряду с наличием сопутствующей соматической патологии позволяет признать результаты скрининга ложнопозитивными. Как отмечалось выше, на панели сывороток от больных сифилисом и от пациентов с подозрением на ложно-положительные реакции специфичность РПГА составила 99,3% (только 1 сомнительный результат) в сравнении с линейным IgG-иммуноблоттингом, являющимся на сегодня референстестом серодиагностики сифилиса по критериям чувствительности и специфичности, приближающимся к 100% [Кубанова А.А. и др., 2006].

В заключение раздела представлена сравнительная оценка диагностической эффективности РПГА согласно данным, полученным в Саратовском областном КВД (табл. 2).

7. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ РПГА, ПОЛУЧЕННЫХ ПРИ КЛИНИКО-СЕРОЛОГИЧЕСКОМ ОБСЛЕДОВАНИИ НА СИФИЛИС

Как уже отмечалось, подходы к оценке результатов РПГА при использовании ее для скрининга на сифилис и для диагностики этой инфекции имеют особенности, которые необходимо учитывать в практической работе.

Скрининг на сифилис

Отрицательный ответ РПГА, полученный в ходе скрининга контингентов, указанных в приказе МЗ РФ №87, в подавляющем большинстве случаев служит основанием для прекращения дальнейшего тестирования серонегативных пациентов на сифилис. При этом риск пропустить больного сифилисом минимален в связи с высокой чувствительностью коммерческих РПГА-наборов и малой вероятностью присутствия среди обследуемых лиц с доклиническим периодом первичного сифилиса, в котором большинство серологических тестов не способны выявлять низкие концентрации АТ к T.pallidum.

Сомнительный ответ РПГА, установленный при скрининге на сифилис, требует перестановки РПГА с сывороткой, явившейся источником

неопределенного результата, в день исследования в количественном варианте с целью исключения феномена прозоны. Повторно полученный сомнительный ответ не является основанием для признания данной сыворотки негативной и означает необходимость повторения ее тестирования в РПГА через 1–2 недели с целью исключения или подтверждения сероконверсии.

Положительный результат скрининга в РПГА, выраженный в крестовой оценке и титре реакции, не подлежит трактовке на уровне неспециализированных ЛПУ, а установление его значимости должно проводиться в ходе дальнейшего комплексного клинико-серологического обследования серопозитивного пациента специалистами дерматовенерологических учреждений.

Ниже приведены основные варианты диагностической интерпретации положительных и отрицательных результатов РПГА с сывороткой крови обследуемых на сифилис.

Диагностика сифилиса

1. Клинические проявления сифилиса присутствуют

Положительный результат РПГА — устанавливается соответствующая форма раннего или позднего сифилиса согласно характеру клинических проявлений, заключениям смежных специалистов (при наличии показаний) и времени, прошедшему с момента инфицирования. Отрицательный результат нетрепонемного теста (РМП или RPR), как правило, не является препятствием для принятия положительного диагностического решения и назначения своевременной специфической терапии, поскольку РПГА как верифицирующая реакция обладает более высокими чувствительностью и специфичностью по сравнению с реакиновыми пробами. В то же время при расхождении ответов в РМП и РПГА возможность получения положительного результата в другом трепонемном тесте должна быть использована.

- Установление нейросифилиса требует дополнительного исследования СМЖ (цитоз, белок, VDRL в комплексе с РСК_{к,т} или с другими разрешенными для тестирования СМЖ трепонемными тестами).

Отрицательный результат РПГА — маловероятен при наличии убедительных клинических проявлений позднего или раннего сифилиса за исключением первичного сифилиса в периоды до появления твердого шанкра и в течение 1–2 недель после его формирования. При подозре-

нии на ложноотрицательный результат РПГА при вероятном первичном сифилисе необходимо повторять постановки этой реакции через 1-2 недели до выявления ожидаемой сероконверсии, а также провести исследование на наличие живой бледной трепонемы из язвенного отделяемого. Возможный на раннем этапе первичного сифилиса отрицательный результат РПГА при положительном реакциновом тесте (РМП) не является основанием для исключения первичного сифилиса при наличии достоверных клинических и анамнестических данных.

Сомнительный результат РПГА — наиболее вероятен при первичном сифилисе на стадии формирования специфических АТ к *T.pallidum*. В этом случае диагностическая тактика аналогична рассмотренной выше при получении отрицательного ответа РПГА. Нечастой причиной сомнительного или отрицательного результата РПГА при наличии клинических проявлений вторичного сифилиса способен явиться феномен прозоны вследствие гиперпродукции специфических АТ. Снижение концентрации АТ в исследуемом образце до оптимальных значений достигается раститровкой подозрительных проб, после чего возможно получение четкой положительной реакции.

II. Клинические проявления сифилиса отсутствуют

Положительный результат РПГА:

1. При отсутствии официального документа о проведенном ранее адекватном лечении сифилиса и наличии положительного результата другой специфической реакции на IgG или суммарные АТ (ИФА, РИФ или РИТ) наиболее обоснованным является установление диагноза скрытого сифилиса, в том числе и в случае отрицательной РМП. Конкретизация формы скрытого сифилиса (раннего или позднего) определяется сроком с момента заражения (или сроком с момента рождения в случае врожденного скрытого сифилиса). В случае положительной РПГА и отрицательном результате другого трепонемного теста требуется динамическое серологическое наблюдение в КВД с использованием всего возможного комплекса подтверждающих реакций, в том числе с использованием линейного варианта ИФА (иммуноблоттинга). Решение принимается на основании совокупности полученных серологических и клиничко-анамнестических данных.

2. При наличии официального документа о проведенном ранее адекватном лечении сифилиса и отсутствии объективных данных за возможность реинфицирования положительный результат РПГА при отрицательной РМП оценивается как остаточная серопозитивность трепонемного теста, которая не требует дополнительного серологи-

ческого обследования и специфической терапии. Позитивность РМП определяет необходимость дополнительного динамического серологического обследования с обязательным учетом критерия 4-х кратного падения титров реагинов в этой реакции.

- РПГА является высокоспецифичным тестом, поэтому ложноположительные результаты при ее проведении встречаются редко. Основанием для признания результата данной реакции ложнопозитивным являются отрицательный результат в иммуноблоттинге на IgG или преимущественно слабоположительные ответы РПГА при ее неоднократных постановках, или отсутствие воспроизводимости положительных результатов РПГА и других трепонемных тестов в динамике наблюдения при наличии сопутствующих заболеваний, рассмотренных выше. Во всех случаях исключение сифилиса при любой позитивности положительных результатов трепонемных тестов должно осуществляться в специализированных дерматовенерологических учреждениях в ходе комплексного обследования.

Отрицательный результат РПГА — в подавляющем большинстве случаев свидетельствует о достоверном отсутствии сифилитической инфекции у обследуемого. Исключением является инкубационный период первичного сифилиса, однако вероятность выявления такого пациента любым из современных тестов на эту инфекцию должна оцениваться как теоретическая. Отрицательный результат РПГА при положительной РМП (RPR) и отсутствии клинико-анамнестических данных в пользу сифилиса является основанием для признания ложной позитивности РМП (данное заключение допустимо только при обследовании в КВД).

- Сомнительные или отрицательные результаты РПГА, которые могут быть обусловлены феноменом прозоны, должны быть раститрованы.

8. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время РПГА, являющаяся одним из вариантов реакции непрямой агглютинации, заслуженно претендует на роль самого массового трепонемного теста для серодиагностики сифилиса в России и за рубежом. Объективным основанием для этого стали как отличные диагностические характеристики набора для РПГА, выражающиеся в высоких показателях чувствительности, специфичности и воспроизводимости аналитической процедуры, так и другие качества РПГА, выгодно отличающие ее от известных способов определения АТ к *T.pallidum*. В частности, к неоспоримым преимуществам РПГА относятся несравни-

мые с другими трепонемными тестами простота постановки и скорость получения надежного результата. Перечисленное является основанием для признания РПГА реакцией выбора при проведении диагностики сифилиса, а также при скрининге в группах лиц, определенных приказом МЗ РФ №87 от 26.03.2001 г. (доноры, беременные, больные глазных, психоневрологических и кардиологических стационаров).

Особо следует отметить, что указанным приказом федерального уровня иммунодиагностические исследования на сифилис в Вассермановском КСР с 2006 года отменяются и это определяет вывод унифицированных реакций ИФА и РПГА на лидирующие позиции не только в серо-, но и в ликвородиагностике сифилиса.

В связи с вышеизложенным правомерно сделать заключение о том, что интенсивность внедрения РПГА в практику отечественного здравоохранения во многом способно определить результативность проводящихся и планируемых комплексных мероприятий, направленных на снижение заболеваемости сифилисом в России.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аковбян В.А. Новый диагностический комплекс серологических реакций на сифилис: прощание с Вассерманом // *Consilium medicum*. — 2003. — Т. 5, №3. — С. 150–151.
2. Аكوпова З.П. Роль реакции гемагглютинации в серодиагностике сифилиса // *Вестн. дерматол. венерол.* — 2000, №6. — С. 12–13.
3. Аكوпова З.П., Дмитриев Г.А. Реакция пассивной гемагглютинации в серодиагностике сифилиса // В кн.: *Новое в диагностике и лечении заболеваний, передающихся половым путем, и болезней кожи.* — Тез. докл. н.-п. конф., М., 22–23 октября 1997 г. — М., 1997. — С. 123–124.
4. Вашукова С.С., Макарова Н.Г. Опыт лабораторной диагностики внутриутробных инфекций методом ИФА // В кн.: *Диагностические аспекты применения ИФА-тест-систем «Roche».* Сб. матер. семинара «Рош-Москва». Москва, «Липки», 15–16 мая 1996, М., 1996. — С. 89–95.
5. Гарнетт Дж. П., Арал С.О., Хойл Д.В. и др. Естественное течение сифилиса. Изучение динамики передачи и контроля инфекции // *Информацион.-аналитич. бюл. ЗППП.* — 1998, №5. — С. 3–17.
6. Герасимова Н.М., Сырнева Т.А., Полякова Н.В. и др. Состояние и перспективы развития серодиагностики сифилиса в регионах Урала, Сибири и Дальнего Востока // *Клинич. дерматол. венерол.* 2004, №3. — С. 63–65.
7. Гражданцева А.А., Кочнева Г.В., Сиволобова Г.Ф. и др. Исследование сыВОроток больных сифилисом методом иммуноферментного анализа с использованием рекомбинантных антигенов // *Иммунология.* — 1998, № 4. — С. 20–23.

8. Дмитриев Г.А., Аковбян В.А., Тихонова Л.И. Комментарий к приказу Минздрава РФ №87 от 26.03.01 г. «О совершенствовании серологической диагностики сифилиса». Эволюция лабораторной диагностики сифилиса // ИППП. — 2001, №6. — С. 35–37.

9. Дмитриев Г.А., Брагина Е.Е. Современные методы лабораторной диагностики сифилиса. Часть I // Вестник дерматол. венерол. — 1996, №2. — С. 29–33.

10. Иммунология. Справочник. 2-е переработанное издание/Под ред. Г. Бундшу и Б. Шнеевайса. Пер.с нем. — Киев, 1981. — 480 с.

11. Исаков С.А., Ивлева Е.А., Эрдман Ю.С. Значение ТРНА-теста в подтверждении ложноположительных реакций на сифилис // В кн.: Вопр. диагностики, лечения и профилактики ЗППП и дерматозов. — Сб. науч.-практ. конф., Рязань, 1995. — С. 28.

12. Кубанова А.А., Лесная И.Н., Кубанов А.А. и др. Анализ эпидемиологической ситуации и динамика заболеваемости инфекциями, передаваемыми половым путем, и дерматозами на территории Российской Федерации // Вестник дерматол. венерол. — 2010, №5. — С. 4–21.

13. Кубанова А.А., Фриго Н.В., Ротанов С.В. и соавт. Опыт использования метода иммуноблоттинга для диагностики сифилиса // Вестник дерматол. венерол. — 2006, №2. — С. 4–11.

14. Кульберг А.Я. Молекулярная иммунология. Учеб. пособие. — М., 1985. — 287 с.

15. 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. — С. 25–29.

16. Куляш Г.Ю., Сабаев М.И., Шерстобитова Л.А. и др. О преимуществах совместного использования унифицированных трепонемных тестов РПГА и ИФА при клинико-серологическом обследовании на сифилис // Клинич. дерматол. венерол. — 2005. — №3. — С. 39–42.

17. Люгер А.Ф., Шмидт Б.Л., Каулих М. Значение лабораторных данных для диагностики нейросифилиса // ИППП. — 2000. №5. — С. 4–13.

18. Медицинская микробиология / Гл. ред. В.И. Покровский, О.К. Поздеев. — М., 1999. — 1200 с.

19. Овчинников Н.М., Беднова В.Н., Делекторский В.В. Лабораторная диагностика заболеваний, передающихся половым путем. — М., 1987. — 304 с.

20. Олисов А.О., Потехаев Н.С., Дударев А.В., Олисова О.Ю. О практической значимости результатов серологических тестов в ранней диагностике сифилиса // В кн.: Актуал. вопр. дерматол. венерол. Сб. тр. юбил. конф. РГМУ. — М., 1997. — С. 37–38.

21. Петров Р.В. Иммунология. — М., 1987. — 415 с.

22. Потехаев Н.С., Потехаев С.Н. Заметки к этиологии и патогенезу сифилиса // Вестник дерматол. венерол. — 2002, №1. — С. 63–68.

23. Приказ МЗ РФ от 26.03.2001 г. №87 «О совершенствовании серологической диагностики сифилиса». — М., 2001. — 63 с.

24. Приказ МЗ РФ от 30.07.2001 г. №291 «О мерах по предупреждению распространения инфекций, передаваемых половым путем». — М., 2001 г. — 30 с.
25. Приказ МЗ РФ от 25.07.2003 г. №327 «Об утверждении протокола ведения больных «Сифилис». — М., 2003 г. — 160 с.
26. Протоколы диагностики, лечения и профилактики внутриутробных инфекций у новорожденных детей. Изд-е 2-е, переработ. и дополн. — М., 2002. — 104 с.
27. Прохоренков В.И., Шергин С.Н., Керачева Ю.В., Охотникова Л.А. О некоторых спорных вопросах эволюции сифилиса // ИППП. — 2003, №1. — С. 17–20.
28. Романенко В.Н., Кузнецова В.Г., Тритенко Л.Ф., Скобелева Е.Н. Современные клинические проявления первичного сифилиса // Актуальн. пробл. науч. и практич. венерол. — 1994, №5. — С. 71.
29. Руководство по лечению заболеваний, передаваемых половым путем. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 1998. — Санам, М., 1998. — 135 с.
30. Сивак В.В. Некоторые особенности заболеваемости и клиники сифилиса у заключенных в условиях пенитенциарной системы // Вестн. дерматол. венерол. — 2004, №4. — С. 33–35.
31. Сидорова Е.В., Ляхов В.Ф. Значение определения противотрепонемных IgM-антител в серодиагностике сифилиса // Информацион.-аналитич. бюл. ЗППП. — 1995, №4. — С. 11–14.
32. Фриго Н.В., Ротанов С.В., Куляш Г.Ю. и др. Реакция пассивной гемагглютинации для диагностики нейросифилиса // Вестник дерматол. венерол. — 2007, № 2. — С. 28–32.
33. Чеботарев В.В., Павлик Л.В., Земцов М.А. Особенности течения сифилиса в период эпидемии // Вестник дерматол.венерол. — 1999, №6. — С. 56–58.
34. Эпштейн О., Перкин Г.Д., де Боно Д.П., Куксон Д. Непосредственное исследование больного. Краткое руководство для врачей общей практики. — М., С.-П., 2001. — 336 с.
35. Янг Х. Рекомендации по серологической диагностике сифилиса // ИППП. — 2001, №3. — С. 10–12.
36. Deguchi M., Hosotsubo H., Yamashita N. et al. Evaluation of gelatin particle agglutination method for detection of *Treponema pallidum* antibody // Kansenshogaku Zasshi. — 1994. — V.68, № 10. — P. 1271–1277.
37. Taniguchi S., Orato K., Hamada T. The prozone phenomenon in secondary syphilis // Acta Derm. Venerol. — 1995. — V.75, № 2. — P. 153–154.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3
Список сокращений	5
1. Общие сведения о реакции агглютинации	6
2. Основные модификации реакции агглютинации и набора на основе РА для определения специфических иммуноглобулинов к <i>T.pallidum</i>	7
3. Принципы проведения и учета результатов РПГА, применяемой для диагностики сифилиса	10
4. Источники ошибок при проведении РПГА	19
5. Значение РПГА в серодиагностике сифилиса (общие положения)	22
6. Диагностическая эффективность РПГА при различных формах сифилитической инфекции	25
7. Интерпретация результатов РПГА, полученных при клинико-серологическом обследовании на сифилис	33
8. Заключение	36
Литература	37