

АВТОМАТИЗИРОВАННЫЙ УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ ЛИКВОРА В РЕАКЦИИ ПАССИВНОЙ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ В ДИАГНОСТИКЕ НЕЙРОСИФИЛИСА

Г.Л. КАТУНИН, Н.В. ФРИГО, С.В. РОТАНОВ, Н.В. КИТАЕВА, В.Г. НЕСТЕРЕНКО, А.П. СУСЛОВ

Automated assessment of spinal fluid examination results in passive hemagglutination reaction in neurosyphilis diagnostics

G.L. KATUNIN, N.V. FRIGO, S.V. ROTANOV, N.V. KITAYEVA, V.G. NESTERENKO, A.P. SUSLOV

Об авторах:

Г.Л. Катунин — научный сотрудник отделения сифилидологии ФГУ «ГНЦД Росмедтехнологий», г. Москва

Н.В. Фриго — главный научный сотрудник, заведующий отделом лабораторной диагностики ИППП и болезней кожи ФГУ «ГНЦД Росмедтехнологий», г. Москва, д.м.н.

С.В. Ротанов — ведущий научный сотрудник отделения лабораторной диагностики сифилиса отдела лабораторной диагностики ИППП и болезней кожи ФГУ «ГНЦД Росмедтехнологий», г. Москва, д.м.н., доцент

Н.В. Китаева — ведущий научный сотрудник отделения сифилидологии ФГУ «ГНЦД Росмедтехнологий», г. Москва

В.Г. Нестеренко — генеральный директор ООО «НИАРМЕДИК ПЛЮС», г. Москва, д.м.н., профессор

А.П. Суслов — заместитель генерального директора ООО «НИАРМЕДИК ПЛЮС», г. Москва, д.м.н.

Образцы ликвора, полученные от 50 пациентов с нейросифилисом (основная группа) и 30 пациентов с патологией нервной системы и черепно-мозговыми травмами без указаний в анамнезе на наличие у них сифилитической инфекции (контрольная группа), исследованы в регламентированных серологических тестах для определения антител к *T. pallidum* (РСК, РСК_к, РИФ_ц, ИФА), а также в РПГА с применением модифицированной методики в конечном разведении ликвора 1:4. Для оценки результатов РПГА применяли визуальный учет с определением степени позитивности результата, выраженного в условных единицах — «плюсах», а также автоматизированный учет на аппаратном комплексе «Критерий-2». Сравнительная оценка визуального и инструментального учета результатов исследования ликвора в РПГА позволила установить полное совпадение результатов качественного исследования и 97,5% совпадения результатов, выраженных в условных единицах — «плюсах», что позволяет рекомендовать «Автоматизированный диагностический комплекс анализа изображений РПГА «Критерий-2» к использованию в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений практического здравоохранения при определении трепонемоспецифических антител в ликворе для диагностики нейросифилиса.

Ключевые слова: сифилис, ликвор, реакция пассивной гемагглютинации, автоматизированный учет реакции, диагностический комплекс «Критерий-2».

Spinal fluid samples collected from 50 patients suffering from neurosyphilis (key group) and 30 patients with a nervous system pathology and craniocerebral injuries without any signs of syphilis in the anamnesis (control group) were examined in the course of regulated serological tests to reveal anti-*T. pallidum* antibodies (complement-fixation test with a treponemal antigen, complement-fixation test with a cardiolipin antigen, immunofluorescence test with whole spinal fluid, ELISA) as well as in the course of TPHA with the use of modified methods with the end-point dilution of spinal fluid as 1:4. Visual assessment was used to assess the TPHA results with the determination of the result positivity degree expressed in conditional units — «pluses», along with the automated assessment using the Criterion 2 hardware system.

Comparative results of visual and instrumental assessments of the spinal fluid study results in TPHA revealed full compliance of the qualitative study results and 97.5% correspondence in the results expressed in conditional units («pluses»), which provides sufficient grounds for recommending the Criterion 2 automatic diagnostics complex for TPHA image assessment to be used in clinical and diagnostic laboratories in health care institutions for determining treponemal specific antibodies in spinal fluid for neurosyphilis diagnostics.

Key words: syphilis, spinal fluid, TPHA, automated response assessment, Criterion 2.

Нейросифилис является одним из наиболее неблагоприятных вариантов течения сифилитической инфекции и может развиваться не толь-

ко на поздних, но и на ранних ее стадиях [1—5]. Безусловная клиническая и социальная значимость своевременного выявления нейросифилиса определяет актуальность его специфической диагностики, надежной и доступной для всех кожно-венерологических учреждений Российской Федерации.

Основой иммунодиагностики нейросифилиса в России в настоящее время являются 4 метода лабораторного исследования, утвержденные приказами Министерства здравоохранения Российской Федерации № 87 от 26.03.01 г. и № 291 от 30.07.01 г.: реакция связывания комплемента (реакция Вассермана) с кардиолипиновым (РСКк) и трепонемным (РСКт) антигенами, иммуноферментный анализ (ИФА), реакция иммунофлюоресценции (РИФ) и реакция иммобилизации бледных трепонем (РИБТ) [6—9]. Сочетание этих методов с определением белка и форменных элементов в ликворе в совокупности с клиническими данными способствует своевременному установлению диагноза нейросифилиса [7, 8, 10—13]. Однако на практике предлагаемые подходы не снимают ряда актуальных для отечественной сифилидологии организационных проблем специфического тестирования ликвора: реакция Вассермана является морально устаревшим, субъективно оцениваемым тестом, не подлежащим стандартизации; при постановках РИТ требуется живой патогенный возбудитель. В связи с вышеизложенным наиболее реальным кандидатом на самый массовый тест для анализа спинномозговой жидкости на антитела к *Treponema pallidum* является реакция пассивной гемагглютинации (РПГА) [14—16].

При проведении научных исследований в 2006—2007 гг. в ФГУ «ГНЦД Росмедтехнологий» была разработана модифицированная методика исследования ликвора в РПГА на основе отечественного набора реагентов «Люис РПГА тест» (производства ООО «НИАРМЕДИК ПЛЮС»; регистрационное удостоверение № ФСР 2007/01023 от 25.10.2007 г.), разрешенного к применению в Российской Федерации для определения антител к *T. pallidum* в сыворотке крови человека. В целях увеличения количества определяемого белка в исследуемой пробе в методике предусмотрено получение оптимального конечного разведения ликвора 1:4, что позволило устранить риск получения ложноположительных результатов. Чувствительность и специфичность реакции при этом были аналогичны чувствительности и специфичности таких специфических тестов, как ИФА и РИФ, что позволило рекомендовать данный тест для исследования ликвора при диагностике нейросифилиса [15—16].

В последние годы, с учетом социальной важности результатов лабораторного обследования больных с подозрением на нейросифилис, большое внимание уделяется обеспечению необходимого качества исследований. Однако подавляющее большинство серологических реакций, в том числе и РПГА, разработано и выполняется в ручной модификации с визуальным учетом полученных результатов, что не исключает элемента субъективности в их оценке. В этой связи актуальной и своевременной задачей является разработка и внедрение методов автоматизированного учета, хранения и анализа результатов РПГА при исследовании ликвора для диагностики нейросифилиса. Развитие данного на-

правления способствует объективизации исследований, внедрению в лабораторную практику мероприятий внутрилабораторного и внешнего контроля качества, позволяет сократить время обследования пациентов с подозрением на нейросифилис, а также проводить архивацию полученных данных для осуществления ретроспективного анализа результатов лабораторных исследований.

ООО «НИАРМЕДИК ПЛЮС» совместно с ЗАО «ТОКАД» ГУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН» был разработан «Автоматизированный диагностический комплекс анализа изображений РПГА «Критерий-2» (ДАРЛ.941119.002), разрешенный к использованию в учреждениях здравоохранения Российской Федерации (№ ФС 02012005/2712-06 от 25.01.2006 г.). Комплекс «Критерий-2» предназначен для проведения сканирования и автоматизированного анализа изображений, получаемых в 96-луночном иммунологическом планшете для микротитрования с U-образным дном лунок в результате постановки РПГА по выявлению в сыворотке крови человека специфических антител к *T. pallidum*. В ФГУ «ГНЦД Росмедтехнологий» были проведены клинические испытания данного комплекса, которые показали высокую клиническую эффективность его использования для автоматизированного учета результатов исследования в РПГА, проведенной с сывороткой крови больных сифилисом и лиц без сифилитической инфекции. С учетом важности объективизации результатов лабораторного исследования при установлении диагноза нейросифилиса представлялось актуальным проведение экспериментальных исследований, устанавливающих эффективность применения автоматизированного комплекса «Критерий-2» для регистрации результатов РПГА при исследовании ликвора.

В связи с вышеизложенным целью исследования явилось изучение возможности применения автоматизированного учета результатов РПГА при исследовании ликвора с целью диагностики нейросифилиса с помощью аппаратного комплекса «Критерий-2».

Материал и методы

Проведено клинико-лабораторное обследование 50 больных нейросифилисом (основная группа) и 30 лиц (без указаний в анамнезе на наличие сифилиса) с патологией нервной системы и черепно-мозговыми травмами, которым по медицинским показаниям проводили люмбальную пункцию (контрольная группа).

Помимо клинического осмотра и обследования дерматовенеролога, невролога и окулиста у больных в сыворотке крови и ликворе определяли антитела к возбудителю сифилиса. Образцы сыворотки крови и ликвора от лиц основной и контрольной групп получали из отделения сифилидологии ФГУ «ГНЦД Росмедтехнологий», венерологического отделения городской клинической больницы № 14

им. В.Г. Короленко, неврологических и реабилитационных отделений городских клинических больниц № 15 и № 54 Департамента здравоохранения Москвы, серологических лабораторий кожно-венерологических диспансеров г. Мытищи Московской обл., Саратова и Самары.

Для исследования крови и ликвора на содержание антител к возбудителю сифилиса применяли регламентированные реакции на сифилис — РСК, РИФ, ИФА и ранее разработанную методику РПГА с конечным разведением образца ликвора 1:4. Результаты РПГА оценивали визуально с определением качественного значения теста (положительный или отрицательный) и степени позитивности реакции, выраженной в условных единицах — «плюсах» (от +/- до 4+), а также с использованием автоматизированного учета на аппаратном комплексе «Критерий-2».

«Автоматизированный диагностический комплекс анализа изображений РПГА» (ДАРЛ. 941119.002) выпускается под торговым названием «Критерий-2» (см. рисунок) и состоит из персонального компьютера базовой комплектации, имеющего необходимое специальное и системное программное обеспечение, планшетного сканера «Umax Astro 4700 Foto» со слайд-адаптером, принтера (возможно использование сетевого принтера) и источника бесперебойного питания Back-UPS BK475-RS CS 500VA 230V.

Эксплуатационные характеристики автоматизированного диагностического комплекса ДАРЛ.941119.002 позволяют использовать его в закрытых помещениях медицинских учреждений в стационарных условиях при температуре окружающего воздуха 10—30 °С, относительной влажности воздуха 60—80% (при температуре 25 °С) и нормальном атмосферном давлении 630—800 мм рт. ст. (84—106,7 кПа). Режим работы аппаратного комплекса — длительный непрерывный.



Рис. Внешний вид автоматического диагностического комплекса анализатора изображений РПГА «Критерий-2»

Принцип работы прибора заключается в сканировании и отображении на экране монитора персонального компьютера изображений результатов РПГА, регистрируемых на U-образном дне реакционной лунки иммунологического планшета, и переводе этих результатов в цифровые значения регрессии¹ от 0 до 100. По завершении анализа изображений результат исследования представляется в виде математического значения по шкале регрессии в условных единицах («плюсах») и общего заключения, характеризующего наличие или отсутствие в исследуемом образце антител к антигенам *T. pallidum*. Прибор предусматривает автоматическую классификацию получаемого результата РПГА на 6 возможных вариантов ответа, соответствующую общепринятой оценке степени позитивности реакции: от - до +++. Соотношение значений шкалы регрессии критериям оценки результатов РПГА в условных единицах представлено в табл. 1.

Таблица 1

Соответствие визуальной (в «плюсах») и автоматизированной (значения по шкале регрессии) оценки результатов исследования в РПГА

Результат исследования	Результат оценки РПГА		Заключение о содержании антител к <i>T. pallidum</i> в образце
	Визуальный учет (в «плюсах»)	Автоматизированный учет (в значениях по шкале регрессии)	
Отрицательный	-	0	Антитела отсутствуют
Сомнительный	+/-	0—20	Недостаточно данных для однозначного заключения
Слабоположительный	+	21—40	Антитела в образце обнаружены
Слабоположительный	++	41—60	
Положительный	+++	61—80	
Резко положительный	++++	81—100	

¹ Регрессия — суммарная относительная величина, имеющая цифровое выражение и определяющая степень соответствия регистрируемых с помощью прибора данных общепринятой трактовке результатов, которые получают при визуальной оценке результатов реакции.

При тестировании ликвора в РПГА проводилось сопоставление результатов исследования, полученных при визуальном и автоматизированном (с применением анализатора «Критерий-2») режиме их считывания. При этом определялся процент совпадения результатов считывания при оценке РПГА по качественным параметрам (положительный или отрицательный ответ) и степени позитивности реакции, выраженной в условных единицах — «плюсах».

Результаты и обсуждение

На основании результатов клинико-лабораторного обследования 50 больных нейросифилисом у 32 пациентов был диагностирован асимптомный нейросифилис, у 18 — менингovasкулярный сифилис. В контрольной группе у всех больных отсутствовали указания на перенесенный в прошлом сифилис.

Установлено, что у всех 50 пациентов с нейросифилисом результаты исследования сыворотки крови в РИФ_{abc/200}, ИФА_{IgG+IgM}, РСК_T и РПГА были положительными (100%), а у 30 пациентов группы контроля — отрицательными (100%). При исследовании сыворотки крови в РСК_K положительные результаты были получены у 49 (98%) из 50 больных нейросифилисом и у 1 (3,3%) из 30 пациентов контрольной группы (табл. 2).

При исследовании образцов ликвора больных нейросифилисом положительные результаты РСК_K были зарегистрированы в 45 (90%) случаях, РИФ_ц и РСК_T — в 46 (92%), ИФА — в 47 (94%), РПГА — в 50 (100%). При исследовании образцов ликвора пациентов контрольной группы неспецифические положительные результаты наблюдали в РСК_K в 2 (6,7%) случаях. При исследовании в РИФ_ц, РСК_T, ИФА и РПГА указанных образцов ликвора во всех случаях (100%) были получены отрицательные результаты.

Таким образом, результаты проведенных исследований показали возможность и целесообразность использования РПГА для определения анти-трепонемных антител при исследовании ликвора с целью диагностики нейросифилиса. Это нашло подтверждение в высокой клинической чувстви-

тельности указанного теста у лиц с нейросифилисом (100%), превышающей таковую ИФА (94%), РИФ_ц (92%) и, в особенности, РСК (90—92%). Данное обстоятельство открывает перспективу внедрения в клиническую лабораторную практику учреждений кожно-венерологического профиля простого теста — реакции пассивной гемагглютинации для исследования ликвора, так как уровень его клинической чувствительности превышает таковой методов (ИФА, РИФ_ц и РСК_T), которые регламентированы приказом МЗ РФ № 87 для исследования спинномозговой жидкости.

Результаты оценки РПГА с применением визуального и автоматизированного учета представлены в табл. 3 и 4. Как видно, использование автоматизированного учета результатов РПГА с образцами ликвора обеспечивало полное совпадение качественных результатов определения трепонемных антител с данными, полученными при визуальной оценке результатов исследования.

При оценке степени позитивности РПГА в условных единицах («плюсах») отмечалось частичное несовпадение — в 2 (2,5%) случаях — результатов исследования при автоматизированном и визуальном учете (см. табл. 4).

Выявленное расхождение считывания результатов РПГА при разном способе учета выражалось в более высокой степени позитивности (на одну ступень +) в 2 случаях при визуальной оценке результатов в сравнении с автоматизированной. Однако ни в одном случае отмеченное несовпадение не оказало влияния на конечный результат исследования образцов ликвора, характеризующий наличие или отсутствие специфических антител к антигенам бледной трепонемы в исследуемом материале. Таким образом, диагностически значимых расхождений результатов РПГА, полученных с помощью «Автоматизированного диагностического комплекса анализа изображений РПГА» (ДАРЛ.941119.002), в сравнении с визуальной оценкой РПГА установлено не было, что свидетельствует о возможности его практического использования при определении антител к *T. pallidum* в ликворе методом РПГА.

Таблица 2

Частота положительных результатов исследования сыворотки крови и ликвора у больных нейросифилисом и лиц контрольной группы (отсутствие нейросифилиса)

Группа	Исследованный биообразец	Частота положительных результатов обследования пациентов в серологических реакциях, %				
		РИФ	ИФА _{GМ}	РСК _T	РСК _K	РПГА
Больные нейросифилисом	Сыворотка крови	100	100	100	98	100
	Ликвор	92	94	92	90	100
Контрольная	Сыворотка крови	0	0	0	3,3	0
	Ликвор	0	0	0	6,7	0

Таблица 3

Процент совпадения результатов качественного исследования образцов ликвора в РПГА в зависимости от способа учета результатов реакции

Группа изучаемых образцов ликвора	Результаты выявления антител к бледной трепонеме		
	Учет визуальный	Учет автоматизированный	Совпадение результатов, %
Образцы ликвора, содержавшие антитела к бледной трепонеме ($n = 50$)	Антитела обнаружены в 50 образцах	Антитела обнаружены в 50 образцах	100
Образцы ликвора, не содержавшие антитела к бледной трепонеме ($n = 30$)	Антитела не обнаружены в 30 образцах	Антитела не обнаружены в 30 образцах	100
Все образцы ликвора ($n = 80$)	80	80	100

Таблица 4

Процент совпадения результатов оценки степени позитивности РПГА с ликвором автоматизированным и визуальными способами учета реакции

Группа изучаемых образцов ликвора	Результаты совпадения автоматизированного и визуального учета РПГА		
	Полное совпадение	Частичное расхождение	Полное расхождение
Образцы ликвора, содержавшие антитела к бледной трепонеме ($n = 50$)	48	2	0
Образцы ликвора, не содержавшие антитела к бледной трепонеме ($n = 30$)	30	0	0
Все образцы ликвора ($n = 80$)	78 (97,5%)	2 (2,5%)	0 (0%)

Для оценки воспроизводимости результатов РПГА, полученных с применением автоматизированного комплекса анализа изображений РПГА «Критерий-2», проведено пятикратное исследование четырех образцов ликвора (трех «положительных» и одного «отрицательного») с определением значенной регрессии. Колебания коэффициентов вариации CV_5 вычисленных значений регрессии составили от 0,97 до 5,65%. При этом ни в одном случае вариационные отклонения значений регрессии изображений РПГА не оказали влияния на конечный результат исследования.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что «Автоматизированный диагностический комплекс анализа изображений РПГА «Критерий-2» обеспечивает адекватный учет результатов РПГА при постановке реакции с ликвором, соответствующий общепринятым критериям ее оценки. Автоматизация учета результатов позволяет избежать субъективности при их трактовке и обеспечивает возможность протоколирования и архивирования, что особенно важно с точки зрения оценки качества проводимых лабораторных исследований.

Полученные данные позволяют рекомендовать «Автоматизированный диагностический комплекс анализа изображений РПГА «Критерий-2» для использования в клиничко-диагностических лаборато-

риях лечебно-профилактических учреждений практического здравоохранения с целью осуществления автоматизированного учета результатов РПГА при определении трепонемоспецифических антител в ликворе для диагностики нейросифилиса.

Литература

1. Прохоренков В.И., Гузей Т.Н., Родиков М.В. и др. Классический случай базального менингоневрита у большой вторичным рецидивным сифилисом. ИППП 2001; 5: 15–17.
2. Чеботарев В.В., Павлик Л.В., Гужвиева О.Д. и др. Актуальные проблемы нейросифилиса. Вестн. дерматол. 2002; 1: 69–71.
3. Марра К. Нейросифилис. ИППП 2004; 4: 7–11.
4. Сурганова В.И., Жулимова Н.Л. Специфическое поражение нервной системы у больных сифилисом и серологической резистентностью после его терапии. 9-й Всероссийский съезд дерматовенерологов: Материалы. М., 2005; 2: 64.
5. Чухловина М.Л., Милявская И.Р. Поражение нервной системы при врожденном сифилисе (клинические наблюдения). Вестн. дерматол. 2005; 4: 52–55.
6. Приказ Минздрава РФ № 87 от 26.03.2001 г. «О совершенствовании серологической диагностики сифилиса». Приложение №1 «Постановка отборочных и диагностических тестов на сифилис».
7. Приказ Минздрава РФ № 291 от 30.07.2001 г. «О мерах по предупреждению распространения инфекций, передаваемых половым путем».
8. Приказ № 327 Минздрава РФ от 25.07.2003 г. «Об утверждении протокола ведения больных «СИФИЛИС».
9. Киселева Г.А. Ликвородиагностика сифилиса методом иммуноферментного анализа с тест-системой ЗАО «Вектор-Бест», предназначенной для выявления иммуноглобулинов класса G. ИППП 2003; 2: 27–31.

10. 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: 35—37.
11. Платонов А.В., Меркулова С.А., Патрушева Н.Н. Анализ и особенности ликвородиагностики сифилиса. 9-й Всероссийский съезд дерматовенерологов: Материалы. М., 2005; 2: 49—50.
12. Люгер А.Ф., Шмидт Б.Л., Каулих М. Значение лабораторных данных для диагностики нейросифилиса. ИППП 2000; 5: 4—13.
13. Руководство по лечению заболеваний, передаваемых половым путем. 2002. CDC Центры по контролю и предупреждению заболеваний (США, Атланта): Пер. с англ. М.: Санам, 2003.
14. Ротанов С.В., Фриго Н.В., Милонова Т.И. О применении реакции гемагглютинации при исследовании ликвора. VIII Всероссийская конференция дерматовенерологов «Новые технологии в организации дерматологической помощи населению РФ»: Тезисы научных работ. М., 25—26 ноября 2004: 34.
15. Фриго Н.В., Ротанов С.В., Куляш Г.Ю. и др. Реакция пассивной гемагглютинации с ликвором для диагностики нейросифилиса. Вестн. дерматол. 2007; 2: 28—32.
16. Фриго Н.В., Ротанов С.В., Китаева Н.В. и др. Диагностическая информативность реакции пассивной гемагглютинации с ликвором при нейросифилисе. Вестн. дерматол. 2008; 1: 23—28.

ИТРАЗОЛ®

(Итраконазол)

ОПТИМАЛЬНЫЙ ВЫБОР ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВВК

- Максимально широкий спектр действия, активность в отношении резистентных возбудителей (*C. krusei*, *C. glabrata*)
- Возможность проведения терапии без предварительной культуральной диагностики
- Хорошая переносимость



ЗАО «Вертекс» Россия, 199026, Санкт-Петербург
В. О., 24-Линия, д. 27А, т./ф.: +7 (812) 329-3042



РЕКОЛАМА

Горячая линия: 8-800-2000-305