

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИММУНОБЛОТИНГА ПРИ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ СИФИЛИСА У БЕРЕМЕННЫХ

М.В. Сердюцкая, А.М. Иванов, А.Б. Криворучко, Д.В. Заславский,
Е.В. Ходосевич, Ф.А. Овсянников

Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

Effectiveness of immunoblotting method in syphilis differential diagnostics in pregnancy

M.V. Serduckaya, A.M. Ivanov, A.B. Krivoruchko,
D.V. Zaslavskiy, E.V. Hodosevich, F.A. Ovsannikov
Military Medical academy by S.M. Kirov, Saint-Petersburg

Резюме. Обследованы 168 беременных с подозрением на сифилис. Для подтверждения наличия антител в сыворотке крови к антигенам *Treponema pallidum* в работе использовались наборы *recomBlot Treponema IgM* и *recomBlot Treponema IgG* («Microgen», Германия). В иммунологический комплекс обследования также входили следующие показатели: количества субпопуляций лимфоцитов ($CD3+$ -, $CD4+$ -, $CD8+$ -, $CD16+$ -, $CD19+$ и $CD25+$ - лимфоциты), а также определение уровней сывороточных интерлейкина-1 β (ИЛ-1 β), интерлейкина-2 (ИЛ-2), интерлейкина-4 (ИЛ-4), интерлейкина-8 (ИЛ-8) и ИЛ- γ . Трепонемные серологические тесты в 100% случаев демонстрировали положительный результат, независимо от категории обследуемых. При обследовании беременных с серорезистентностью чувствительность иммуноблотинга при выявлении IgG-антител составила 61,6%. В 38,4% случаев метод иммуноблотинга продемонстрировал сомнительные результаты, так как выявлял антитела только к одному или двум из 5 трепонемных антигенов. У беременных с диагнозом «серорезистентность» выявлено повышение уровня ИЛ- γ , что может отражать преобладание иммунорегуляции по Th-1 типу. Предлагается общая схема ведения беременных пациенток с подозрением на сифилис. Полученные результаты можно использовать в дифференциальной диагностике скрытого сифилиса и серологической резистентности.

Ключевые слова: сифилис, диагностика, беременные.

Введение

Заболеваемость населения инфекциями, передающимися преимущественно половым путем, неуклонно растет с каждым годом [5, 6, 7, 13]. Исключением не становятся и женщины в период беременности. Эти инфекции занимают существенное место среди множества причин, вызывающих осложнения беременности и способствующих перинатальной заболеваемости и смертности. Одно-

Abstract. 168 pregnant women suspected to be infected with syphilis were observed within this research. To prove the presence of antibody in whey blood to antigenes *Treponema pallidum* we used sets *recomBlot Treponema IgM* and *recomBlot Treponema IgG* («Microgen», Germany). In immunological observations the following indexes were included defining number of lymphocyte subpopulations ($CD3+$ -, $CD4+$ -, $CD8+$ -, $CD16+$ -, $CD19+$ and $CD25+$ - lymphocyte) and level in blood serum Interleukin-1 β , Interleukin-2, Interleukin-4, Interleukin-8 and INF- γ . *Treponema* tests in 100% of cases showed positive results, regardless of patients' category. An examination of pregnant women with serum resistance the immunoblotting sensitivity for detecting IgG-antibodies was 61,6%. In 38,4% of cases blotting showed uncertain results, because it detected antibodies to only one or two out of 5 *treponemnyh* antigens. Level of INF- γ for pregnant women with serum resistance increases, this reflects predominance of immune regulation of Th-1 type. Based on the results we offer general scheme of dealing with pregnant patients with suspected syphilis. These results can be used for differential diagnosis of latent syphilis, and serum resistance.

Key words: syphilis, diagnostics, pregnancy.

временно с этим современное российское общество характеризуется кризисным состоянием демографического развития. В этой связи сохранение здоровья матери и ребёнка является важной составной частью здравоохранения, имеющей первостепенное значение для формирования здорового поколения [3].

Сифилис продолжает оставаться актуальной проблемой медицины. Несмотря на то, что за последние

годы уровень официально регистрируемой заболеваемости сифилисом, по сравнению с серединой 1990-х гг., характеризовался некоторым снижением, динамика изменения темпов роста отдельных форм сифилиса, а также научные исследования позволяют прогнозировать очередной рост заболеваемости [8]. Обращает на себя внимание рост случаев сифилиса среди беременных и как следствие – увеличение риска инфицирования новорожденных [10, 11, 12].

Известные трудности возникают в практике акушеров-гинекологов и дерматовенерологов при диагностике сифилитической инфекции, и особенно при отсутствии клинических проявлений, что характерно для скрытого периода заболевания и серорезистентности [14, 15]. До конца не разрешенной продолжает оставаться именно проблема серорезистентности – отсутствие негативации серологических реакций крови после полноценной терапии сифилиса. Неопределенные данные эпидемиологического анамнеза и клинического осмотра делают лабораторные методы решающими при постановке диагноза «сифилис». В отношении исходов беременностей при серорезистентности данные литературы противоречивы. У женщин со стойко положительными серологическими реакциями, получивших полноценное лечение, отмечается все же значительное число самопроизвольных абортов, мертворождений, преждевременных родов, встречаются также случаи врожденного сифилиса [1]. В других работах указывается, что таким женщинам можно гарантировать рождение здорового потомства, если они во время беременности получали противосифилитическое лечение [3]. Тем не менее, эта важная проблема изучается фрагментарно, в соответствии с медицинским профилем исследователей, а проанализированные к настоящему времени работы не носят однозначного характера. В этой связи имеет важное значение разработка новых диагностических технологий и расширение возможностей комплексного иммунологического и микробиологического обследования [4, 9].

Несмотря на доказанную диагностическую информативность, методы выявления гуморальных иммунологических показателей при сифилисе не нашли широкого практического внедрения [2]. Во многом это связано с отсутствием обоснованных алгоритмов иммунологического обследования беременных при подозрении на сифилис и рекомендаций по их использованию в терапии. Одним из возможных направлений совершенствования диагностики сифилиса у беременных является комплексное использование методов изучения общего иммунного статуса и специфического противомикробного иммунитета.

Цель исследования

Изучить эффективность иммуноблотинга в дифференциальной серологической диагностике сифилиса у беременных.

Материалы и методы

Обследованы 168 беременных с подозрением на сифилис. В 33,3% случаев диагноз был достоверно подтвержден на основании анамнеза, эпидемиологического обследования, данных клинического и лабораторного обследования, а также положительными реакциями в стандартных серологических тестах (RPR, ТРНА, ТРРА, ЕІА, FTA-abs.). В 66,7% была установлена серологическая резистентность после ранее перенесенной инфекции.

Наибольшее количество пациенток находилось на сроках беременности от 16 до 30 недель (89,2%), что отражает тенденцию к позднему обращению за медицинской помощью.

В 70,6% случаев срок анамнестической инфекции составил от 2 до 5 лет, а в 17,8% – более 5 лет.

В большинстве случаев срок заболевания на момент назначения терапии не превышал 2 лет и характеризовал отсутствие поздних проявлений сифилиса. В подавляющем числе случаев перенесенное ранее заболевание протекало либо без клинических проявлений (49,1%), либо с клиническими проявлениями вторичного периода сифилиса (27,7%).

С целью оценки состояния клеточного иммунитета определяли количество субпопуляций Т- и В-лимфоцитов в цитотоксическом тесте с МКАТ. Выделенные в градиенте плотности фиколпак лимфоциты трижды отмывали охлажденным (4°C) забуференным фосфатами (рН-7,2) 0,85% раствором хлорида натрия (ЗФР) 10 мин при 1500 об/мин. Затем готовили рабочую концентрацию 3×10^9 лимфоцитов/мл. Для постановки реакции использовали микрокамеры для иммунологических реакций (ТУ 64-2-28-79). Каждую лунку покрывали вазелиновым маслом. Под масло закапывали 1 мкл МКАТ в лунки попарно и 1 мкл взвеси лимфоцитов в рабочей концентрации, инкубировали 45 мин при 20°C. Затем добавляли по 3 мкл компонента (сухая цитратная кроличья плазма, разведенная стерильным 0,85% раствором хлористого натрия из расчета 1:5), инкубировали 40 мин при 20°C. В каждую лунку после инкубации закапывали по 1 мкл смеси 5% водного раствора эозина и 1,8% раствора хлорида натрия (в объемном соотношении 3:1), окрашивали 5 мин, после чего камеру встряхивали и подсчитывали количество погибших клеток при 150-кратном увеличении. Процент погибших клеток определяли после подсчета 200-300 клеток в лунке с вычетом количества мертвых клеток в контроле, без добавления МКАТ. В иммунологический комплекс обследования входили следующие

щие показатели: CD3 + -, CD4 + -, CD8 + -, CD16 + -, CD19 + и CD25 + - лимфоциты.

Определение показателей гуморальных факторов В-клеточного иммунитета: определяли содержание общих иммуноглобулинов классов G, M и A в сыворотке крови методом радиальной иммунодиффузии в геле с помощью моноспецифических антисывороток («Servac») к сывороточным иммуноглобулинам по методу G. Mancini.

Определение показателей цитокинового статуса: изучали уровни в сыворотке крови ИФН- γ , интерлейкина-1 β (ИЛ-1 β), интерлейкина-2 (ИЛ-2), интерлейкина-4 (ИЛ-4), интерлейкина-8 (ИЛ-8) проводили методом ИФА с применением отечественных диагностикумов (НПО «Протеиновый контур», ТОО «Цитокин»).

Метод иммуноблотинга (ИБ). Для подтверждения наличия антител к антигенам *Treponema pallidum* в сыворотке в работе использовались наборы recomBlot *Treponema IgM* и recomBlot *Treponema IgG* («Microgen», Германия). Данные тест-системы представляют собой линейный вариант иммуноферментного анализа, предназначенный для подтверждения *in vitro* наличия антител класса M и G против трепонемных антигенов в образцах сыворотки или плазмы крови человека.

Каждая тест-система представляет собой заключительный этап иммуноблотингового исследования – линейный иммуноферментный анализ. Антитела к *T. pallidum* обнаруживаются по связыванию с антигенами TrN15, TrN17, TrpA и TrN47, присутствующими на тест-полоске в виде отдельных линий. Для выявления возможной перекрестной реактивности в состав мембран также включен антиген TrN37 – жгутиковый белок. Оценка результатов проводилась визуально, в сравнении со слабоположительными контролями, которые были включены в каждую аналитическую серию, независимо от количества исследуемых образцов.

Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием общеупотребительных методов параметрической статистики. Критический уровень достоверности нулевой статистической гипотезы (об отсутствии значимых различий или факторных влияний) принимали равным 0,05.

Результаты и их обсуждение

Основной задачей оценки состояния иммунной системы было выявление особенностей при наличии сифилиса и у беременных с серологической резистентностью.

При раннем скрытом сифилисе и серорезистентности выявлено достоверное снижение лейкоцитов в периферической крови (табл. 1). Отклонений в уровнях основных сывороточных иммуноглобулинов выявлено не было.

Таблица 1

Показатели иммунитета у беременных

Показатель	Здоровые (контроль) (n = 16)	Вторичный сифилис (n = 24)	Ранний скрытый сифилис (n = 32)	Серорезистентность (n = 112)
Лейкоциты, $\times 10^6$ /мл	6,7 \pm 0,2	7,1 \pm 0,6	5,6 \pm 0,3*	5,1 \pm 0,4*
Нейтрофилы, %	54,2 \pm 1,2	52,1 \pm 4,3	49,7 \pm 2,3	51,7 \pm 3,1
Лимфоциты, %	33,7 \pm 1,1	29,5 \pm 3,9	32,1 \pm 2,2	31,4 \pm 2,3
IgM, г/мл	1,2 \pm 0,1	1,4 \pm 0,1	1,1 \pm 0,2	1,4 \pm 0,3
IgA, г/мл	2,7 \pm 0,3	2,2 \pm 0,4	2,3 \pm 0,3	2,5 \pm 0,4
IgG, г/мл	14,7 \pm 1,1	14,2 \pm 3,8	15,3 \pm 2,5	14,9 \pm 4,3

* – достоверное различие ($p < 0,05$).

Анализ показателей клеточного иммунитета не выявил достоверных различий в группах обследуемых (табл. 2). Отмечалась тенденция к повышению клеток периферической крови с фенотипом CD3+ у больных вторичным сифилисом, что ассоциировано с повышенным лейкоцитозом. Также для вторичного сифилиса характерно тенденция к повышению CD4+ -позитивных клеток.

Таблица 2

Показатели клеточного иммунитета у беременных (абс.)

Показатель	Вторичный сифилис (n = 24)	Ранний скрытый сифилис (n = 32)	Серорезистентность (n = 112)
CD3+	1,73 \pm 0,43	1,14 \pm 0,44	1,43 \pm 0,23
CD4+	1,17 \pm 0,45	0,66 \pm 0,12	0,97 \pm 0,32
CD8+	0,58 \pm 0,12	0,46 \pm 0,32	0,58 \pm 0,09
CD16+	0,39 \pm 0,10	0,43 \pm 0,12	0,42 \pm 0,11
CD19+	0,25 \pm 0,06	0,19 \pm 0,05	0,22 \pm 0,08
CD25+	0,07 \pm 0,02	0,05 \pm 0,02	0,04 \pm 0,01

Обращает на себя внимание повышение уровня ИФН- γ у беременных с диагнозом «серорезистентность», что может отражать преобладание иммунорегуляции по Th-1 типу (табл. 3).

Таблица 3

**Цитокиновые иммунологические показатели
у беременных**

Показатель	Вторичный сифилис (n = 24)	Ранний скрытый сифилис (n = 32)	Серорезистентность (n = 112)
ИЛ1, пкг/мл	13,67±2,77	10,83±7,22	14,06±6,17
ИЛ2, пкг/мл	10,37±4,74	14,85±7,45	15,15±6,43
ИЛ4, пкг/мл	130,50±67,84	156,50±65,78	143,51±46,32
ИЛ8, пкг/мл	242,59±112,29	281,13±159,35	291,13±52,47
IFN-γ, пкг/мл	467,06±176,02	337,23±54,55	674,23±48,93*

* – достоверное различие (p<0,05).

При обследовании больных в стандартных серологических методах наименьшая чувствительность в тестах кардиолипиновым антигеном была получена для пациентов с серологической резистентностью (табл. 4). По всей видимости, это связано с тем, что в данной группе с равной вероятностью могли присутствовать больные в периоде раннего или позднего скрытого сифилиса, а также лица с сохранением только положительных серологических реакций без присутствия возбудителя. Трепонемные тесты в 100% случаев демонстрировали положительный результат, независимо от категории обследуемых.

Таблица 4

**Чувствительность серологических
методов диагностики
у различных категорий беременных, %**

Группы пациентов	RPR-тест	РПГА (ТРПА)	ИФА	РИФ абс.	ИБ
Вторичный сифилис (n = 24)	100	100	100	100	100
Ранний скрытый сифилис (n = 32)	93,5	100	100	100	100
Серорезистентность (n = 112)	59,8	100	100	100	61,6

Использование метода ИБ для выявления противотрепонемных антител класса М позволяло выявить не более 29,2% положительных результатов при вторичном сифилисе, 12,5% – при раннем скрытом и 8,0% – при серологической резистентности (табл. 5). При обследовании беременных с серорезистентностью чувствительность ИБ при выявлении IgG-антител составила 61,6%. В 38,4% случаев метод ИБ продемонстрировал сомнитель-

ные результаты, так как выявлял антитела только к одному или двум из 4 трепонемных антигенов.

Таблица 5

**Доля проб сывороток крови, реагирующих
с трепонемными антигенами
в иммуноблоттинге, %**

Диагноз	Результаты исследования	
	recomBlot Treponema IgM	recomBlot Treponema IgG
Вторичный сифилис (n = 24)	29,2	100,0
Ранний скрытый сифилис (n = 32)	12,5	100,0
Серорезистентность (n = 112)	8,0	61,6

Так как в случае доказанного сифилиса у беременных в ИБ было закономерным обнаружение антител к трем и четырем трепонемным антигенам, то можно предположить, что снижение иммунореактивности исследуемых сывороток крови является проявлением отсутствия инфекционного процесса.

В этой связи дополнительно с результатами ИБ были сопоставлены результаты изучения иммунологических показателей (табл. 6). Как оказалось, в случае положительных результатов ИБ данные иммунологического обследования совпадали с таковыми при раннем скрытом сифилисе. У пациентов с сомнительными результатами ИБ концентрация сывороточных ИЛ-1, ИЛ-2 и ИНФ-γ отличалась достоверным повышением (p<0,05). Результаты обследования новорожденных от женщин с положительными результатами ИБ позволили в 2 случаях поставить диагноз скрытого врожденного сифилиса. Дети, рожденные женщинами с сомнительными результатами ИБ, признаков врожденной инфицированности не имели, за исключением положительных реакций в трепонемных тестах.

Таблица 6

**Цитокиновые иммунологические показатели
у беременных с различными результатами
исследований в иммуноблоттинге**

Показатель	Положительные (n = 69)	Сомнительные (n = 43)
ИЛ1, пкг/мл	15,06±6,32	23,33±7,87*
ИЛ2, пкг/мл	15,11±4,13	21,01±4,74*
ИЛ4, пкг/мл	144,16±48,23	165,37±44,34
ИЛ8, пкг/мл	290,09±50,13	279,16±48,39
IFN-γ, пкг/мл	328,17±141,92	961,91±57,01*

* – достоверное различие (p<0,05).

Исходя из полученных результатов предлагается общая схема ведения беременных пациенток с подозрением на сифилис:

– при первичном обследовании проводится серологическое исследование в скрининговом варианте, с использованием специфических трепонемных методов (РПГА, ИФА, ТРРА);

– при положительном результате специфического теста в исследуемом образце сыворотки крови методом иммуноблоттинга выявляются антитела IgG и IgM, специфичные трепонемным липопротеинам 15, 17, 41 и 47 кД;

– формулирование положительного прогноза сохранения возбудителя требует проведения профилактического лечения. Во всех остальных случаях показано динамическое наблюдение.

Заключение

Таким образом, выявлены наиболее информативные маркеры из числа показателей общего и специфического гуморального иммунитета, позволяющие проводить эффективную диагностику сифилиса, протекающего на фоне беременности, и, как следствие, – проводить целенаправленную профилактику врожденной инфицированности. С практической точки зрения, для решения задач постановки диагноза «сифилис» у беременных наиболее доступным форматом иммунологической диагностики является метод иммуноблоттинга.

Литература

1. Борисенко, К.К. Ранний врожденный сифилис: клиника, патоморфология, диагностика, лечение, профилактика / К.К. Борисенко, О.В. Доля, О.К. Лосева, Е.Л. Туманова // РМЖ. – 1998. – Т.6, №15. – С. 24–28.
2. Вязьмина, Е.С. Особенности иммунного ответа организма на *Treponema pallidum*: Дис. ...канд. биол. наук / Е.С. Вязьмина – М., 2002. – 165 с.
3. Гусева, С.Н. Особенности течения и исходы беременности у женщин, больных сифилисом: дис. ... канд. мед. наук / С.Н. Гусева. – СПб, 2000. – 148 с.
4. Дударева, Л.А. Клиническая оценка современных методов диагностики у больных ранними формами сифилиса (клинико-лабораторное исследование): автореф. дис. ... канд. мед. наук / Л.А. Дударева – М. – 2007. – 22 с.
5. Привалова, Н.К. Динамика заболеваемости различными формами сифилиса в Санкт-Петербурге / Н.К. Привалова, Т.С. Смирнова, Г.В. Слободзян // Материалы XXXIV научно-практической конференции дерматовенерологов, акушер-гинекологов, урологов и врачей-лаборантов Санкт-Петербурга. – 1999. – С. 8.
6. Тайц, Б.М. Проблемы дерматовенерологической службы по профилактике ИППП в Санкт-Петербурге / Б.М. Тайц, М.Е. Старченко, Т.С. Смирнова // Материалы XXXV научно-практической конференции дерматовенерологов и врачей смежных специальностей Санкт-Петербурга. – 2000. – С. 4–5.
7. Тихонова, Л.И. Обзор ситуации с ИППП. Анализ заболеваемости врожденным сифилисом в Российской Федерации / Л.И. Тихонова // Инфекции передаваемые половым путем. – 1999. – №1. – С. 15–19.
8. Тихонова, Л.И. Прогнозирование заболеваемости различными формами сифилиса в Российской Федерации / Л.И. Тихонова, Н.К. Привалова // Материалы XXXV научно-практической конференции дерматовенерологов и врачей смежных специальностей Санкт-Петербурга. – 2000. – С. 5-6.
9. Фриго Н.В. Современные критерии дифференциальной диагностики раннего скрытого сифилиса и ложноположительных результатов стандартных серологических реакций на сифилис: дисс. докт. мед. наук / Н.В. Фриго. – М., 2001. – 350 с.
10. Шувалова, Т.М. К вопросу о клинике и диагностике раннего врожденного сифилиса / Т.М. Шувалова, К.К. Борисенко // Инфекции, передаваемые половым путем. – 1999. – №4. – С. 13–18.
11. Шувалова, Т.М. Современные проблемы врожденного сифилиса / Т.М. Шувалова, А.Г. Туманян, В.М. Юдакова, И.М. Соколова // Заболевания, передаваемые половым путем. – 1998. – №4. – С. 73–74.
12. Kitagawa, H. Congenital syphilis / H. Kitagawa // Ryoikibetsu. Shokogun. Shirizu. – 1999. – Vol. 25, Pt 3. – P. 21–23.
13. Majeroni, B.A. Screening and Treatment for Sexually Transmitted Infections in Pregnancy / B.A. Majeroni, S. Ukkadam // American Family Physician. – 2007. – Vol. 76, № 2. – P. 265–270.
14. Rodney, K.E. Assessment of the Value of Rescreening for Syphilis in the Third Trimester of Pregnancy / K.E. Rodney, M. Bennett, C. Langstraat, D. Greene // Infect. Dis. Obstet. Gynecol. – 2006. – May 30 – P. 1–3.
15. Sheffield, J.S. Syphilis in pregnancy / J.S. Sheffield, G.D. Wendel // Clin. Obstet. Gynecol. – 1999. – Vol. 42, № 1. – P. 97–106.

Контактная информация:

Иванов А.М. тел.: 8 (812) 292-32-96, e-mail: iamvma@mail.ru