

## МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2011

УДК 616.972-078.33

А. И. Новиков<sup>1</sup>, Т. И. Долгих<sup>1</sup>, Ю. А. Новиков<sup>2</sup>

## ВЕСТЕРН-БЛОТ КАК ПОДТВЕРЖДАЮЩИЙ ТЕСТ В ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ СИФИЛИСА

<sup>1</sup>Омская государственная медицинская академия, <sup>2</sup>Омский областной клинический кожно-венерологический диспансер

295 пациентов, у которых методом иммуноферментного анализа были выявлены антитела к *Treponema pallidum*, дополнительно обследованы методом вестерн-блота с целью их подтверждения. Установлено, что каждый четвертый случай оказался ложноположительным, при этом чаще ложная серопозитивность была при наличии IgM к *T. pallidum*. Результаты исследования ликвора доказали в 5 случаях течение нейросифилиса. У 2 детей подтвержден диагноз врожденного сифилиса по наличию p15, p17, p45, p47. Полученные результаты демонстрируют необходимость широкого использования вестерн-блота в здравоохранении.

Ключевые слова: сифилис, диагностика, *Treponema pallidum*, иммуноферментный анализ, вестерн-блот, нейросифилис, врожденный сифилис

A. I. Novikov, T. I. Dolgikh, Yu. A. Novikov

## WESTERN BLOT AS A CONFIRMING TEST IN THE LABORATORY DIAGNOSIS OF SYPHILIS

Two hundred and ninety-five patients who had been found to have *Treponema pallidum* antibodies detected by enzyme immunoassay were additionally studied by a Western blot test to confirm their presence. Every four cases were ascertained to be false-positive, false seropositivity being more frequent in the presence of IgM antibody against *T. palladium*. Spinal fluid analysis provided evidence for the course of neurosyphilis in 5 cases. The diagnosis of congenital syphilis was verified in 2 children who had p15, p17, p45, and 47. The findings demonstrate it necessary to extensively use a Western blot in the health care system.

Key words: syphilis, diagnosis, *Treponema pallidum*, enzyme immunoassay, Western blot, neurosyphilis, congenital syphilis

Современная стратегия диагностики сифилиса и эпидемиологического надзора за данной инфекцией базируется на результатах скрининговых исследований крови с использованием серологических тестов, среди которых ввиду широкой доступности используют микрореакцию с кардиолипидным антигеном и иммуноферментный анализ (ИФА). В деятельность лабораторий, специализирующихся на диагностике сифилиса, внедрен новый диагностический комплекс серологических реакций [1]. Внедрение ИФА, сменившего реакцию Вассермана, значительно повысило качество лабораторных исследований как в связи с применением временного метода и тест-систем с более высокой специфичностью и чувствительностью, так и благодаря возможности автоматизации процесса. Вместе с тем, несмотря на значительное улучшение состояния лабораторной службы, совершенствование качества диагностики через обеспечение контроля качества на всех этапах диагностического процесса, вопросы, связанные с диагностикой сифилиса, еще не решены [4, 9, 10]. Врачи клинического профиля, прежде всего дерматовенерологи, признают, что положительные серологические реакции на сифилис [3, 6], диагностика ранних форм сифилиса [11] и серорезистентность [2] по-прежнему остаются актуальной проблемой в клинической медицине [5, 8].

Появление на рынке медицинских услуг зарегистрированных в установленном порядке и разрешенных к применению на территории Российской Федерации

тест-систем для определения уровня антител класса IgM и к отдельным антигенам *Treponema pallidum* методом иммуноблота (Western-blot) значительно расширило возможности верификации лабораторного (а на его основе клинического и эпидемиологического) диагноза сифилиса. Совершенствованию лабораторной диагностики сифилиса посвящено немало работ [7, 10], в том числе имеется и определенный опыт применения иммуноблота как в зарубежной [12–14], так и в отечественной [5, 11] практике. Вместе с тем в Российской Федерации внедрение данного метода, имеющего подтверждающее предназначение, происходит медленно по ряду причин, среди которых следует назвать отсутствие подготовленного персонала по технике постановки иммуноблота и клинической интерпретации его результатов при тесном взаимодействии клинициста и специалиста по клинической лабораторной диагностике. Такой комплексный подход реализован в Омской государственной медицинской академии и используется в том числе при диагностике сифилиса.

**Материалы и методы.** С целью верификации диагноза сифилиса обследованы 295 больных (187 (63,3%) мужчин и 108 (36,7%) женщин), в том числе 48 беременных женщин, 2 новорожденных от серопозитивных матерей и 5 пациентов с подозрением на нейросифилис. Средний возраст больных составил  $29,6 \pm 4,3$  года. У всех пациентов при тестировании крови методом ИФА в различных лабораториях Омска выявлены антитела к *T. pallidum*. Больные были направлены для углубленного лабораторного обследования из женских консультаций, кожно-венерологического диспансера, поликлиник и стационаров. Материалом для исследования служила сыворотка крови, забранная с применением закрытых систем в вакуумные пробирки ("BD Vacutainer", компания "Becton Dickinson", США), а при подозрении на нейросифилис — ликвор, полученный при люмбальной пункции в соответствии с клиническими

Для корреспонденции:

Долгих Татьяна Ивановна, д-р мед. наук, проф., зав. ЦНИЛ, рук. Центра лаб. диагн.  
Адрес: 644070, Омск, а/я 8487.  
Телефон: 8(3812) 37-03-43.  
E-mail: dolgih-ti@mail.ru

показаниями. Для подтверждения диагноза использовали коммерческие тест-системы "Anti-Treponema pallidum WESTERNBLOT (IgG)" и "Anti-Treponema pallidum WESTERNBLOT (IgM)" производства компании "EUROIMMUN AG" (Германия). Тестовые стрипы набора содержат электрофоретически разделенные следующие антигены *T. pallidum*: p15, p17, p22, p45 и p47. Из них специфичными являются 4 белка: мембранный белок Trp47, TmpA (полоса на стрипе 45 кДа), мембранный белок Trp17, мембранный белок Trp15. Важным обстоятельством является наличие неспецифической полосы 22 кДа с антигеном p22, что в ряде случаев послужило объяснением получения ложноположительного результата в ИФА.

Постановку реакции проводили в строгом соответствии с инструкцией. При использовании набора "Anti-Treponema pallidum WESTERNBLOT" исследуемые образцы сыворотки крови предварительно приготовили в разведении 1:51 и тщательно перемешали на вортексе. Инкубацию проводили на шейкере при комнатной температуре. Тщательно выполняли промывку для исключения неспецифического результата. Интерпретацию результатов осуществляли с учетом рекомендаций производителя тест-системы, принимая во внимание положение полос и их интенсивность.

**Результаты и обсуждение.** Все 295 образцов сыворотки крови подвергнуты исследованию на наличие IgG и 290 образцов — на наличие IgM к специфическим антигенам. Результаты исследования показали, что 36,2% образцов были позитивны по IgM и 75,6% образцов — по IgG. В остальных случаях, где отсутствовали специфические полосы, делали заключение об отрицательном результате. У 3 беременных присутствовала неспецифическая полоса с антигеном p22, что позволило сделать вывод об отсутствии лабораторных критериев сифилиса. При интерпретации результатов детекции IgM-антител в случае наличия даже 1 четкой полосы специфического антигена результат расценивали как положительный. Такая картина наблюдалась в 37 пробах (в 35,2% от количества положительных проб) и проявлялась преимущественно (в 20 случаях) присутствием мембранного белка Trp47, у 9 больных — Trp17, у 5 — TmpA, у 3 — Trp15. У 41 пациента присутствовали по 2 специфических белка в различных комбинациях, а у остальных — по 3 и 4 специфических полосы.

При интерпретации результатов выявления IgG в вестерн-блоте наличие 1 специфической полосы, которое имело место у 27 пациентов (в 12% случаев от серопозитивных в блоте), расценивали как неопределенный (сомнительный) результат. В таких случаях проводили параллельную оценку результатов тестирования на присутствие IgM к специфическим белкам либо рекомендовали обследование в динамике, если врач-клиницист считал это целесообразным. Подобную картину наблюдали чаще у лиц с перенесенным сифилисом и расценивали как серорезистентность.

При комплексной оценке данных по наличию IgM и IgG к *T. pallidum* сифилис был документирован у 16 из 27 больных, при этом в пользу раннего сифилиса свидетельствовало наличие IgG к 1 белку и IgM к 2–4 белкам в различных комбинациях. Наличие 2 полос и более к специфическим белкам расценивали как положительный результат: у 44 пациентов присутствовали ан-

титела к 2 белкам, у 42 — к 3 белкам, у 110 — к 4 белкам (p15, p17, p45, p47), что являлось лабораторными критериями сифилиса и служило основанием для постановки клинического диагноза. При исследовании ликвора у 3 из 5 больных присутствовали антитела класса IgG к 4 антигенам (p15, p17, p45, p47) *T. pallidum*, у 1 выявили p15, p17 и у 1 — p15, p17 p45. Результаты вестерн-блота послужили основанием для подтверждения диагноза нейросифилиса.

Преимущества вестерн-блота оценены и при обследовании 2 новорожденных, которые родились от матерей, имевших положительные результаты тестирования крови в реакции Вассермана. При обследовании детей в реакции Вассермана также был получен положительный результат, однако с учетом возможности трансплацентарной передачи материнских антител сделать заключение о внутриутробном инфицировании детей *T. pallidum* не представлялось возможным, в связи с чем использовали метод вестерн-блота. Результаты исследования показали наличие антител IgM и IgG к полному спектру белков: p15, p17, p45, p47. Поскольку IgM к *T. pallidum* являются собственными антителами (не передаются через плаценту), то их синтез и послужил основанием для верификации диагноза врожденного сифилиса.

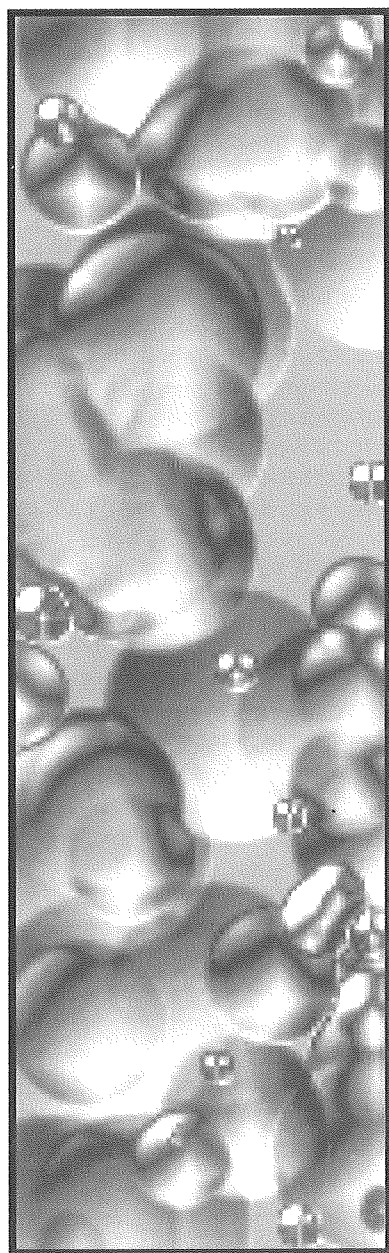
**Заключение.** Применение вестерн-блота показало, во-первых, что каждый четвертый случай позитивного результата, полученного методом ИФА, является ложноположительным результатом; во-вторых, его использование целесообразно при подозрении на нейросифилис и врожденный сифилис. Полученные результаты демонстрируют необходимость широкого использования вестерн-блота в здравоохранении.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Аковбян В. А. // Венеролог. — 2005. — № 12. — С. 43–46.
2. Баткаева Н. В. // Рос. журн. кож. и вен. болезней. — 2008. — № 6. — С. 45–52.
3. Василенко Т. И., Перламутров Ю. Н. // Рос. журн. кож. и вен. бол. — 2009. — № 3. — С. 52–56.
4. Дмитриев Г. А. // Венеролог. — 2005. — № 7. — С. 46–51; № 10. — С. 33–38.
5. Кубанова А. А., Фриго Н. В., Ротанов С. В. и др. // Вестн. дерматол. — 2006. — № 2. — С. 4–11.
6. Ломоносов К. М., Новоселов В. С. // Рос. журн. кож. и вен. бол. — 2005. — № 4. — С. 5–7.
7. Полтавченко А. Г., Яковченко А. М., Надточий О. Н. и др. // Вестн. дерматол. — 2007. — № 3. — С. 5–13.
8. Рокицкая В. Н., Мишулин И. К., Низамова Н. Ю. и др. // Рос. журн. кож. и вен. бол. — 2005. — № 4. — С. 10–12.
9. Ротанов С. В. // Рос. журн. кож. и вен. бол. — 2008. — № 1. — С. 52–56.
10. Ротанов С. В., Фриго Н. В., Лесная И. Н. // Пробл. стандарт. в здравоохран. — 2008. — № 10. — С. 6–10.
11. Фриго Н. В., Дударева Л. А., Ротанов С. В., Иванов А. М. // Вестн. дерматол. — 2008. — № 4. — С. 57–62.
12. Miranda A. P., Sato N. S. // Braz. J. Infect. Dis. — 2008. — Vol. 12, N 2. — P. 139–143.
13. Wan L. N., Li J. M. // Sex. Trans. Dis. — 2009. — Vol. 36, N 7. — P. 413–416.
14. Welch R. J., Litwin C. M. // Clin. Vaccine Immunol. — 2010. — Vol. 17, N 1. — P. 183–184.



# КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА



## 8'2011

- БИОХИМИЯ
- ЗАОЧНАЯ АКАДЕМИЯ ПОСЛЕДИПЛОМНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
- ГЕМАТОЛОГИЯ
- ЦИТОЛОГИЯ
- КОАГУЛОЛОГИЯ
- МИКРОБИОЛОГИЯ
- ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ СЛУЖБЫ

Издательство "МЕДИЦИНА"