

УДК 612.017.:619.9

## ЛИКВОРОДИАГНОСТИКА НЕЙРОСИФИЛИСА: БИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ СОГЛАСОВАННОСТИ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ТЕСТОВ

Пономарева М.В., Левчик Н.К., Зильберберг Н.В.

ГБУ Свердловской области «Уральский научно-исследовательский институт дерматовенерологии и иммунопатологии», Екатеринбург, e-mail: marpo08@mail.ru

Проведено исследование согласованности результатов диагностических тестов при анализе цереброспинальной жидкости в условиях нормального или нарушенного функционирования гематоэнцефалического и/или гематоликворного барьера и интратекальной продукции антител у 126 серопозитивных по сифилису пациентов с подозрением на нейросифилис. Согласованность результатов различных нетрепонемных и трепонемных тестов была лучше в случаях, когда было установлено наличие интратекального иммунного ответа. Были установлены некоторые особенности трепонемных тестов при изолированной дисфункции гематоэнцефалического/гематоликворного барьера. Результаты исследования свидетельствуют о значимости уровня антител в цереброспинальной жидкости и наличии значительной индивидуальной вариабельности, выявляют некоторые закономерности расхождения результатов тестов при ликворологическом исследовании и подчеркивают необходимость проведения комплексного лабораторного исследования у пациентов с подозрением на нейросифилис.

**Ключевые слова:** нейросифилис, интратекальный синтез иммуноглобулинов, гематоэнцефалический барьер, трепонемный тест, нетрепонемный тест, цереброспинальная жидкость

## CEREBROSPINAL FLUID ANALYSIS IN NEUROSYPHILIS: BIOLOGICAL ASPECTS OF DIAGNOSTIC TESTS AGREEMENT

Ponomareva M.V., Levchik N.K., Zilberberg N.V.

Urals Institute of Dermatovenereology and Immunopathology, Yekaterinburg, e-mail: marpo08@mail.ru

We explored the agreement between the diagnostic test results in cerebrospinal fluid analysis under the condition of physiological or disturbed functioning of blood-cerebrospinal fluid barrier and intrathecal immunoglobulin production in 126 patients with serological evidence of syphilis and suspected neurosyphilis. The agreement amongst the results of different non-treponemal and treponemal tests was better if intrathecal immune response was established. There were some peculiarities of the treponemal tests towards of isolated blood-cerebrospinal fluid barrier dysfunction. These findings indicate the importance of antibody level in evaluating cerebrospinal fluid and high individual variability, and reveal some biological regularities in the cerebrospinal fluid test result discrepancies and highlight the necessity of complex cerebrospinal fluid assessment in patients with suspected neurosyphilis.

**Keywords:** neurosyphilis, intrathecal immunoglobulin synthesis, blood-cerebrospinal fluid barrier, treponemal test, non-treponemal test, cerebrospinal fluid

Одним из наиболее частых и серьезных осложнений инфекционного заболевания, вызванного возбудителем сифилиса *Treponema pallidum*, является вовлечение в инфекционный процесс центральной нервной системы. Длительное течение нейросифилиса приводит к необратимым последствиям и может являться причиной инвалидизации и летального исхода [3, 4].

Важной частью установления диагноза «нейросифилис» является ликворологическое исследование, включающее в себя, в том числе, выявление сифилис-ассоциированных антител (реагиновых и трепонемаспецифических) в цереброспинальной жидкости (ЦСЖ). Имеется широкий перечень нетрепонемных и трепонемных тестов, использующих различные принципы и подходы для визуализации присутствия антител. В клинической практике часто встречается ситуация несогласованности результатов, полученных при примене-

нии различных лабораторных методов. Учитывая сложность формирования антигенового состава ЦСЖ, несогласованность результатов может иметь биологическую основу.

Детектируемые в диагностических тестах антитела могут иметь двойное происхождение. Диагностическую значимость имеют только иммуноглобулины, синтезированные интратекально плазматическими клетками периваскулярных воспалительных инфильтратов в центральной нервной системе. Однако, ЦСЖ является ультрафильтратом крови, и поэтому содержащиеся в ней антитела могут происходить из системного кровотока, и количество таких антител существенно возрастает при наличии нарушений целостности гематоэнцефалического/гематоликворного (ГЭБ/ГЛБ) барьера и/или расстройств циркуляции цереброспинальной жидкости (так называемой «дисфункции ГЭБ/ГЛБ»).

**Таблица 1**

Комбинации положительных результатов диагностических тестов в ЦСЖ в зависимости от наличия интратекального синтеза иммуноглобулинов и дисфункциональных нарушений ГЭБ/ГЛБ

Положительные результаты тестов				Группы		
				норма n = 51	ДФ ГЭБ/ГЛБ N = 20	ИТС Ig N = 55
Нетрепонемные		Трепонемные				
	–		РПГА	4	1	
	–	РИФц		5	2	
	–		РПГА ИФА	2		
	–	РИФц	РПГА	4	1	
	–	РИФц	ИФА	2		
	–	РИФабс	РПГА ИФА	1		
	–	РИФц	РПГА ИФА	8	8	2
	РСКк	РИФц	РПГА ИФА			1
	–	РИФц	РИФабс РПГА ИФА	8	6	9
	RPR	РИФц	РИФабс РПГА ИФА		0	1
VDRL		РИФц	РИФабс РПГА ИФА		1	2
VDRL	РМП	РИФц	РИФабс РПГА ИФА			2
	RPR	РИФц	РИФабс РПГА ИФА			1
	RPR	РИФц	РИФабс РПГА ИФА		1	
	РСКк	РИФц	РИФабс РПГА ИФА	1		
VDRL	РСКк	РИФц	РИФабс РПГА ИФА			2
VDRL	РСКк РМП	РИФц	РИФабс РПГА ИФА			2
	RPR РСКк РМП	РИФц	РИФабс РПГА ИФА			1
VDRL	RPR РСКк РМП	РИФц	РИФабс РПГА ИФА			3
		РСКт	РИФц	РИФабс РПГА ИФА	1	3
	РСКк	РСКт	РИФц	РИФабс РПГА ИФА		3
	RPR РМП	РСКт	РИФц	РИФабс РПГА ИФА		1
VDRL	РСКк РМП	РСКт	РИФц	РИФабс РПГА ИФА		3
	РСКк РМП	РСКт	РИФц	РИФабс РПГА ИФА		2
	RPR РСКк РМП	РСКт	РИФц	РИФабс РПГА ИФА		5
VDRL	RPR РСКк РМП	РСКт	РИФц	РИФабс РПГА ИФА		12
отрицательные результаты всех тестов				15	0	0

В литературе отсутствуют сведения о взаимосвязи между выявлением интратекального синтеза иммуноглобулинов, дисфункциональных нарушений ГЭБ/ГЛБ и согласованностью результатов диагностических тестов, используемых для ликвородиагностики нейросифилиса, что и послужило целью настоящего исследования.

**Материалы и методы исследования**

В исследование были включены 126 серопозитивных по сифилису пациентов, подвергшихся люмбальной пункции в связи с подозрением на нейросифилис. Все пациенты были проконсультированы неврологом и подписали информированное согласие.

Оценка интратекального синтеза иммуноглобулинов проводилась по методологии, предложенной Н. Reiber[6]. Состояние ГЭБ/ГЛБ оценивалось с помощью коэффициента альбумина (Qalb). Значения Qalb, превышающие возрастные нормы [Qalb = (4 + возраст/15)×10-3], были расценены как дисфункция ГЭБ/ГЛБ [5].

Всем пациентам были выполнены следующие диагностические тесты. Нетрепонемные тесты (НТТ): реакция микропреципитации (РМП), реакция связывания комплемента с кардиолипновым антигеном (РСКк), VDRL (VenerealDiseaseResearchLaboratory)-тест, RPR (Rapid Plasma Reagin)-тест. Трепонемные тесты (ТТ): иммуноферментный анализ (ИФА), реакция пассивной гемагглютинации (РПГА), реакция иммунофлюоресценции в двух модификациях: с цельным ликвором (РИФц) и с абсорбцией антител к культуральным непатогенным трепонемам (штаммы V, VII, VIII, IX, Рейтера) (РИФабс), реакция связывания комплемента с трепонемным антигеном (РСКт). Для проведения всех вышеуказанных исследований использовались зарегистрированные в Российской Федерации диагностикумы и тест-системы.

Результаты НТТ и ТТ тестов были проанализированы в трех группах пациентов:

- 1) с отсутствием признаков дисфункции ГЭБ/ГЛБ и интратекального синтеза Ig (группа, рассматриваемая как условная «норма», n = 51);
- 2) с наличием признаков только дисфункции ГЭБ/ГЛБ (группа «ДФ ГЭБ/ГЛБ», n = 20);

3) с наличием признаков интратекального синтеза Ig вне зависимости от функционального состояния ГЭБ/ГЛБ (группа «ИТС Ig»,  $n = 55$ ).

Статистический анализ данных проведен согласно общепринятым методам с использованием лицензионной программы Medcalc 12.2 (MedCalcSoftwarebvba, Бельгия).

Сравнительный анализ выполнен с помощью критерия Хи-квадрат ( $\chi^2$ ), с корректировкой уровня значимости для выявления существенно различных пар при множественном сравнении с помощью процедуры Бонферрони-Холма. Для тестирования внутригрупповых различий между частотами различных критериев был применен Кохран (Cochran) Q тест. Для всех статистических критериев ошибка первого рода устанавливалась равной 0,05. Нулевая гипотеза (отсутствие различий) отвергалась, если вероятность ( $p$ ) не превышала ошибку первого рода.

### Результаты исследования и их обсуждение

Был составлен полный перечень комбинаций результатов, полученных по каждому из анализируемых тестов для каждой из проб ЦСЖ. Данные представлены в табл. 1. Всего было выявлено двадцать семь различных вариантов сочетаний.

В табл. 2 приведены данные сравнительного анализа частоты позитивации отдельных нетрепонемных тестов и их комбинаций в зависимости от наличия интратекального синтеза Ig и дисфункциональных нарушений ГЭБ/ГЛБ.

Между группами «норма» и «ДФ ГЭБ/ГЛБ» удельный вес проб, позитивных в каком-либо из нетрепонемных тестов статистически не различался и составил 2% и 10% соответственно.

В группе «ИТС Ig» доля положительных результатов всех нетрепонемных тестов была достоверно выше и составила: для VDRL – 41%, для RPR – 39%, для РМП – 51%, для РСКк – 51%. Чаще встречались пробы ЦСЖ, позитивные по всем четырем нетрепонемным тестам, либо позитивные по двум-трем тестам. В целом по группе «ИТС Ig» позитивация какого-либо (каких-либо) из нетрепонемных тестов была выявлена у 41 из 55 человек (75%), что было достоверно чаще в сравнении с группами «норма» и «ДФ ГЭБ/ГЛБ» ( $p < 0,0001$ ).

Удельный вес позитивации различных нетрепонемных тестов внутри групп статистически не различался.

В табл. 3 приведены данные сравнительного анализа частоты позитивации отдельных трепонемных тестов и их комбинаций в зависимости от наличия интратекального синтеза Ig и дисфункциональных нарушений ГЭБ/ГЛБ. Положительные результаты тестов РИФц, ИФА, РПГА реже ( $p < 0,001$ ) регистрировались в группе «норма» (57%, 57%, 45% соответственно), чем в группе

«ДФ ГЭБ/ГЛБ» (95%, 90% и 80% соответственно), или в группе «ИТС Ig» (100%, 100%, 100%, соответственно). Удельный вес проб с положительными результатами РИФаБс или РСКт статистически не различался между группами «норма» и «ДФ ГЭБ/ГЛБ», и был существенно ниже (22% и 40% для РИФаБс, 2% и 0% для РСКт, соответственно), чем в группе «ИТС Ig» (95% для РИФаБс, 53% для РСКт) ( $p < 0,05$ ). В целом, отрицательные результаты всего исследованного комплекса трепонемных тестов (РИФаБс, РИФц, РПГА, ИФА, РСКт) наблюдались только в группе «норма» (29% против 0%,  $p < 0,001$ ), у остальных пациентов регистрировали положительный результат того или иного (тех или иных) трепонемных тестов, при этом позитивация всего комплекса чаще регистрировалась в группе «ИТС Ig».

При сравнении частоты позитивации отдельных тестов внутри каждой из групп выявили следующие различия. В группе «норма» чаще ( $p < 0,05$ ) регистрировали положительные результаты РИФц, РПГА и ИФА (57%, 57%, 45% соответственно) нежели РИФаБс и РСКт (22% и 2%). В группе «ДФ ГЭБ/ГЛБ» чаще позитивировались РИФц, РПГА ( $p < 0,05$ ) (95%, 90% соответственно), чем РИФаБс (40%). В группе «ИТС Ig» статистических различий между частотами РИФаБс, РИФц, РПГА, ИФА не обнаружили, позитивация РСКт наблюдалась значительно реже (53% против 95% и 100%,  $p < 0,05$ ).

В настоящем исследовании было изучено влияние дисфункции ГЭБ/ГЛБ и интратекального синтеза иммуноглобулинов на результаты диагностических тестов при ликвородиагностике нейросифилиса. Из нетрепонемных тестов были проанализированы VDRL, RPR, РМП, РСКк, из трепонемных – РИФаБс, РИФц, РПГА, ИФА, РСКт.

Были получены данные, свидетельствующие о том, что позитивация нетрепонемных тестов происходит в основном в условиях наличия интратекального гуморального иммунного ответа, тогда как позитивация трепонемных тестов возможна и в его отсутствие. Для трепонемных тестов также были выявлены отличия в отношении дисфункции ГЭБ/ГЛБ, заключающиеся в том, что при отсутствии интратекального синтеза иммуноглобулинов отрицательные результаты РИФаБс и РСКт с равной вероятностью выявляются как при нормальном, так и при патологическом функционировании ГЭБ/ГЛБ, тогда как отрицательные результаты РИФц, РПГА, ИФА чаще определяются у пациентов без признаков дисфункции ГЭБ/ГЛБ.

Таблица 2

Сравнительный анализ результатов нетрепонежных тестов в ЦСЖ в зависимости от наличия интратекального синтеза иммуноглобулинов и дисфункциональных нарушений ГЭБ/ГЛБ

Положительный результат теста	Группы			Межгрупповое сравнение <sup>а</sup> р с учетом поправки Бонферрони-Холма		
	норма n = 51 абс (%)	ДФ ГЭБ/ГЛБ n = 20 абс (%)	ИТС Ig n = 55 абс (%)	норма vs ДФ ГЭБ/ГЛБ	норма vs ИТС Ig	ДФГЭБ/ГЛБ vs ИТС Ig
VDRL	0 (0)	1 (5)	26 (46)	0,625	< <b>0,001</b>	<b>0,004</b>
RPR <sup>б</sup>	0 (0)	1 (6)	24 (48)	0,660	< <b>0,001</b>	<b>0,007</b>
РСКк	1 (2)	0 (0)	34 (62)	0,625	< <b>0,001</b>	< <b>0,001</b>
РМП	0 (0)	0 (0)	32 (58)	0,905	< <b>0,001</b>	< <b>0,001</b>
Внутригруп.сравнение <sup>в</sup>	p = 0,392	p = 0,572	p = 0,120			
Всего <sup>г</sup>	<b>1 (2)</b>	<b>2(10)</b>	<b>41(75)</b>	0,738	< <b>0,001</b>	< <b>0,001</b>
из них : 1 тест	<b>1 (2)</b>	<b>2(10)</b>	<b>7 (13)</b>	0,780	0,140	1,0
2 теста	<b>0 (0)</b>	<b>0 (0)</b>	<b>8 (15)</b>	0,617	<b>0,036</b>	0,310
3 теста	<b>0 (0)</b>	<b>0 (0)</b>	<b>11 (20)</b>	0,617	<b>0,006</b>	0,146
4 теста	<b>0 (0)</b>	<b>0 (0)</b>	<b>15 (27)</b>	0,617	< <b>0,001</b>	0,044

<sup>а</sup>χ<sup>2</sup> – критерий (df1); <sup>б</sup> протестировано 110 образцов ЦСЖ; в Кохран Q тест (df3); <sup>г</sup>имеющие положительный результат хотя бы одного НТГ

Таблица 3

Сравнительный анализ результатов трепонежных тестов в ЦСЖ в зависимости от наличия интратекального синтеза иммуноглобулинов и дисфункциональных нарушений ГЭБ/ГЛБ

Положительный результат теста	Группы			Межгрупповое сравнение <sup>а</sup> р с учетом поправки Бонферрони-Холма		
	норма n = 51 абс (%)	ДФ ГЭБ/ГЛБ n = 20 абс (%)	ИТС Ig n = 55 абс (%)	норма vs ДФ ГЭБ/ГЛБ	норма vs ИТС Ig	ДФГЭБ/ГЛБ vs ИТС Ig
РИФаabc (1)	11(22)	8 (40)	52(95)	0,201	< <b>0,001</b>	< <b>0,001</b>
РИФц (2)	29 (57)	19 (95)	55 (100)	<b>0,010</b>	< <b>0,001</b>	0,595
РПГА (3)	29 (57)	18 (90)	55 (100)	<b>0,035</b>	< <b>0,001</b>	0,117
ИФА (4)	23 (45)	16 (80)	55 (100)	<b>0,017</b>	< <b>0,001</b>	<b>0,009</b>
РСКг (5)	1 (2)	0 (0)	29 (53)	0,625	< <b>0,001</b>	< <b>0,001</b>
Внутригруп.сравнение <sup>б</sup>	p < <b>0,001</b> 1,5 – 2,3,4	p < <b>0,001</b> 1-2,3 5-2,3,4	p < <b>0,001</b> 5 – 1,2,3,4			
Всего <sup>в</sup>	<b>36 (71)</b>	<b>20 (100)</b>	<b>55 (100)</b>	0,032	< <b>0,001</b>	0,614
из них: 1 тест	<b>9 (18)</b>	<b>3 (15)</b>	<b>0 (0)</b>	0,933	<b>0,012</b>	<b>0,048</b>
2 теста	<b>8 (16)</b>	<b>1 (5)</b>	<b>0 (0)</b>	0,824	<b>0,021</b>	1,0
3 теста	<b>9 (18)</b>	<b>8 (40)</b>	<b>3 (5)</b>	0,188	0,094	< <b>0,001</b>
4 теста	<b>9 (18)</b>	<b>8 (40)</b>	<b>23 (42)</b>	0,206	<b>0,004</b>	0,576
5 тестов	<b>1 (2)</b>	<b>0 (0)</b>	<b>29 (53)</b>	0,625	< <b>0,001</b>	< <b>0,001</b>

<sup>а</sup> χ<sup>2</sup> – критерий (df1); <sup>б</sup> Кохран Q тест (df3); <sup>в</sup> имеющие положительный результат хотя бы одного ТТ

В результате комплексной оценки согласованности результатов различных диагностических тестов в ЦСЖ, получены следующие результаты. В отсутствие патологических факторов, влияющих на содержание иммуноглобулинов в ЦСЖ (ИТС Ig, ДФ ГЭБ/ГЛБ), маловероятно создание

уровня реагиновых антител в ЦСЖ, приводящего к позитивации более чем одного нетрепонежного теста. При изолированной дисфункции возрастает вероятность позитивации трепонежных тестов: преобладают случаи с положительными результатами 3-4 тестов (обычно это РИФц, РПГА, ИФА,

РИФ), реже встречаются случаи, когда позитивируются 1-2 теста, маловероятен вариант с отрицательными результатами всех трепонемных тестов. Количество реактивных антител при изолированной дисфункции существенно не нарастает, есть небольшая вероятность позитивации отдельных нетрепонемных тестов. Интратекальный иммунный ответ характеризуется значительным возрастанием вероятности позитивации всех диагностических тестов.

Полученные результаты представляются биологически логичными и согласуются с ранее полученными данными [1, 2], свидетельствующими о том, что при сифилитической инфекции интратекальный синтез оказывает более значимое влияние на содержание иммуноглобулинов в ЦСЖ, особенно в отношении изотипов иммуноглобулинов, плохо проникающих через барьеры ЦНС (класс М). Тогда как дисфункциональные нарушения при сифилисе незначительны и обусловленный ими прирост уровня иммуноглобулинов существенно менее выражен, более однороден и в значительной степени зависит от содержания иммуноглобулинов в системном кровотоке.

В целом, установленные закономерности свидетельствуют о наличии значительной

индивидуальной вариабельности, биологической обусловленности несогласованности диагностических тестов и необходимости комплексного подхода при проведении ликворологического исследования у пациентов с подозрением на нейросифилис.

#### Список литературы

1. Левчик Н.К. Интратекальный синтез иммуноглобулинов у больных нейросифилисом / Н.К. Левчик, М.В. Пономарева, Н.В. Зильберберг // Современные проблемы дерматовенерологии, иммунологии и врачебной косметологии. – 2012. – № 4. – С. 23–29.
2. Сравнительная оценка вклада дисфункции гематоэнцефалического / гематоликворного барьера и интратекального синтеза в увеличение пула иммуноглобулинов в цереброспинальной жидкости при сифилитической инфекции / Пономарева М.В., Левчик Н.К. // Российский иммунологический журнал. – 2014. – Т. 8. № 3 (17). – С. 855–857.
3. Сурганова В.И. Проблема диагностики и терапии больных позднимнейросифилисом / В.И. Сурганова, К.Ю. Ретюнский, А.Г. Колчанов // Вестник последипломного медицинского образования. – 2009. – № 3-4. – С. 51–54.
4. Хронические нейроинфекции / под ред. И.А. Завалишина, Н.Н. Спирина, А.Н. Бойко, С.С. Никитина. – М.: ГЭОТАР – Медиа, 2011. – 560 с.
5. Christenson R. et al. Interpretation of cerebrospinal fluid protein assays in various neurologic diseases // Clin. chem. – 1983. – Vol. 29, № 6. – P. 1028–1030.
6. Reiber H., Pete, J.B. Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs // J Neurol Sci. – 2001. – Vol. 184, № 2. – P. 101–122.