

Есипов А.С. Диагностическая значимость определения IgA к Chlamydia trachomatis в сыворотке крови при хроническом урогенитальном хламидиозе / А.С. Есипов, Д.Ф. Костючек, С.В. Рищук // Вестник Санкт-Петербургской Медицинской академии им. И.И. Мечникова. – 2004. – №2 (5) – С. 126-130.

## **ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ IgA к CHLAMYDIA TRACHOMATIS В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ УРОГЕНИТАЛЬНОМ ХЛАМИДИОЗЕ**

А.С. Есипов<sup>1</sup>, Д.Ф. Костючек<sup>2</sup>, С.В. Рищук<sup>2</sup>

<sup>1</sup> НПП “ИммуноБиоСервис”, лаборатория иммунологии, Научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии им. Д. Отта РАМН, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Кафедра акушерства и гинекологии №1, Государственная медицинская академия им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия.

## **DIAGNOSTIC VALUE OF SERUM ANTI-CHLAMYDIA IGA IN PATIENTS WITH CHRONIC UROGENITAL CHLAMYDIAL INFECTION**

**Esipov A.S., Kostuchek D.F., Rishchuk S.V.**

NPP “Immunobioservice”, Ott Institute of Obstetrics and Gynaecology, Saint-Petersburg, Russia, Mechnikov State Medical Academy, Saint-Petersburg, Russia

### ***РЕЗЮМЕ***

С целью изучения особенностей посттерапевтических изменений уровня сывороточных антихламидийных IgA обследовались 43 пациента в течение года после окончания антибактериальной терапии. Результаты лабораторных тестов показали, что элиминация этих антител из сыворотки крови развивалась у всех больных. Однако этот процесс редко происходил сразу после окончания лечения и имел пролонгированный характер. Было обнаружено, что элиминация завершалась в течение 6 месяцев после лечения у большинства (98%) обследованных пациентов. Сохраняясь в течение 3-6 месяцев, сывороточные антихламидийные IgA могут служить основанием для проведения повторной антибактериальной терапии. Феномен элиминации указанных специфических антител после лечения подтверждает, что они несомненно имеют диагностическую ценность особенно при отрицательных результатах ПЦР и культурального метода.

### ***ABSTRACT***

To investigate the peculiarities of posttreatment changes in level of serum antichlamydial IgA 43 patients were examined for one year after antibacterial therapy. Data showed that elimination of these antibodies out of serum developed in all patients. However, this process seldom occurred just after treatment and had prolonged character. The elimination was found to complete within 6 months posttreatmently in most (98%) patients examined. When persisted for 3-6 months serum antichlamydial IgA can be the background to repeated antibiotic therapy. The phenomenon

of serum antichlamydial IgA elimination suggests that these antibodies are certain to be of diagnostic value in culture- and PCR-negative patients.

## **ВВЕДЕНИЕ**

Генитальный хламидиоз остается одной из наиболее распространенных инфекций, передаваемых половым путем. Этиологический диагноз устанавливается на основании результатов специальных лабораторных исследований, диагностическая значимость которых неоднозначна [3, 5]. Их расхождение встречается при обследовании подавляющего большинства пациентов, а деление лабораторно-диагностических тестов на методы прямого и непрямого определения инфекции [4, 5] не дает оснований говорить о преимуществах одних над другими. К сожалению, применение таких диагностических подходов, как выявление хламидий в культуре клеток, полимеразной цепной реакции (ПЦР), с помощью прямой иммунофлюоресценции и иммуноферментного анализа (ИФА) не обеспечивает в настоящее время гарантированной эффективности подтверждения диагноза.

В связи с этим особая роль в диагностике хламидиоза отводится определению сывороточных IgA к *Chlamydia trachomatis*. Однако взгляды на диагностическую значимость этих антител расходятся. В ряде работ доказывается, что указанная разновидность антител отражает активный хламидийный процесс [15]. В других публикациях диагностическая значимость этих иммуноглобулинов если и не отвергается, то ставится под сомнение [12, 18]. Если антихламидийные IgA в сыворотке крови являются одним из важных лабораторных критериев подтверждения заболевания, то логично было бы предположить, что эффективная антибактериальная терапия, приводя к эрадикации возбудителя, приведет и к элиминации этих антител. Существует всего несколько публикаций, посвященных изучению посттерапевтической динамики уровня антихламидийных иммуноглобулинов [9, 14, 16, 22]. Ценность данных, представленных в этих работах, неоспорима, однако аспект прикладного значения определения этих антител освещен недостаточно.

Целью настоящей работы явилось установление диагностической значимости определения сывороточных IgA к *C. trachomatis* и исследование динамики их уровня у пациентов после специфической антибактериальной терапии.

## **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ**

Общее количество обследованных пациентов составило 61 человек (47 мужчин и 14 женщин) в возрасте от 19 до 65 лет (средний возраст  $30 \pm 1$  год). Критериями отбора являлись обнаружение при первичном обследовании в сыворотке крови антихламидийных антител (IgA) и/или выявление в генитальном отделяемом *C. trachomatis*.

Все пациенты были разделены на три группы. Основную группу составили 43 человека (32 мужчины и 11 женщин), у которых в крови были выявлены антихламидийные IgA. Дополнительную группу составили 14 человек (11 мужчин и 3 женщины), у которых в крови IgA к хламидиям не были обнаружены, но в генитальном материале были выявлены маркеры *C. trachomatis*.

После первичного обследования всем пациентам *основной и дополнительной групп* было проведено антибактериальное лечение, включавшее сочетанный прием эритромицина и доксицилина в соответствии с экспертными рекомендациями [6].

Группу сравнения составили 4 мужчины, у которых в крови были выявлены антихламидийные IgA, но в генитальном отделяемом хламидии обнаружены не были. Эти пациенты категорически отказались от антибактериального лечения, но периодически после первичного выявления антител проходили серологическое обследование.

В различные сроки после завершения антибактериальной терапии всем пациентам *основной группы* выполнялось контрольно-диагностическое исследование крови для оценки изменений уровня антихламидийных IgA. В связи с тем, что лечение и последующее обследование пациентов проводились амбулаторно, было трудно добиться экспериментальной точности соблюдения сроков серологического обследования. Поэтому результаты контрольных серологических тестирований были распределены нами в хронологическом порядке по периодам и оценивались в течение первых 2-х недель ( $n = 25$ ), через 2-8 недель ( $n = 34$ ), через 3-6 месяцев ( $n = 17$ ), через 6-9 и более 9 месяцев ( $n = 5$ ) после окончания лечения. Для подтверждения стабильности элиминации антител некоторым пациентам ( $n = 6$ ) через 1-2 месяца после серонегативации были выполнены дополнительные исследования крови. Всем пациентам *дополнительной группы* через 2-4 недели после окончания лечения было выполнено контрольно-диагностическое исследование генитального отделяемого методом ПЦР и повторное серологическое исследование.

Антихламидийные IgA выявлялись методом ИФА с использованием коммерческой тест-системы ImmunoComb<sup>®</sup> Chlamydia trachomatis IgA (Orgenics, Israel), позволяющей определять антитела к липополисахариду – родоспецифическому хламидийному антигену.

Для удобства статистической обработки и наглядности графического представления результатов титры IgA были переведены в единицы. При этом за единицу был принят диагностический титр (1/8 - согласно инструкции фирмы-изготовителя). Пропорциональность между такими единицами и уровнем титра соблюдалась (например, титр 1/4 соответствовал 0,5 единицы, а титр 1/16 – 2 единицам).

Для выявления хламидий в генитальном отделяемом (уретральное отделяемое и секрет предстательной железы у мужчин и цервикальная и влагалищная слизь у женщин) ис-

пользовались ПЦР и культуральный метод. Для ПЦР использовалась коммерческая ПЦР-тест-система «АмплиСенс» (производитель ЦНИИ Эпидемиологии МЗ РФ). Для выявления хламидий культуральным методом применялись клеточные линии фибробластов L-929, чувствительных к урогенитальным штаммам.

Статистическая обработка данных осуществлялась параметрическими и непараметрическими методами. Последние были представлены корреляционным анализом (метод четырех полей и коэффициент контингенции). Достоверность различий между группами оценивалась по t-критерию Стьюдента и критерию Вилкоксона. Различия считались достоверными при  $P < 0.05$ .

### **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Положительные результаты ПЦР были зарегистрированы у 14% (6/43) пациентов из *основной группы*. Культуральным методом в генитальном отделяемом хламидии не были выявлены ни у одного пациента.

Применение корреляционного анализа позволило установить статистически достоверную положительную взаимозависимость между обнаружением хламидий в ПЦР и присутствием в сыворотке крови IgA. При использовании метода четырех полей коэффициент корреляции равнялся + 0,65 ( $P < 0,01$ ), а при применении метода контингенции коэффициент составил от + 0,6 ( $P < 0,01$ ) до + 0,85 ( $P < 0,01$ ).

Через 2-4 недели после окончания терапии отмечалась негативация результатов ПЦР-теста у всех ПЦР-положительных пациентов.

В течение первых 2-х недель после лечения элиминация антихламидийных IgA из сыворотки крови была отмечена у 7% (3/43) пациентов. У остальных пациентов (93%, 36/43) она развивалась не сразу, а спустя некоторое время после окончания приема антибиотиков. Непосредственно после лечения уровень IgA у этих пациентов сохранялся высоким. У 7% больных (3/43) отмечалось увеличение титра, однако оно было статистически недостоверным ( $P > 0,05$ ). В дальнейшем снижение уровня IgA начинало регистрироваться только через 2-8 недель после лечения и завершалось полной элиминацией антител у 98% случаев в течение 3-6 месяцев и у 100% - в течение 6 - 9 месяцев после завершения терапии (рисунок 1).

У пациентов (6 человек), у которых произошла элиминация IgA – антител, при проведении в дальнейшем (через 1-3 месяца) повторных исследований указанный серологический тест так же, как и в предыдущем случае, оставался отрицательным.

Были отмечены некоторые различия в элиминации антител по половому признаку. У женщин она наступала несколько раньше, чем у мужчин. Уже через 3 - 6 месяцев после ле-

чения антихламидийные IgA в сыворотке крови у женщин не определялись, в то время как у мужчин в единичных случаях ещё наблюдалось их обнаружение ( $P < 0,05$ ).

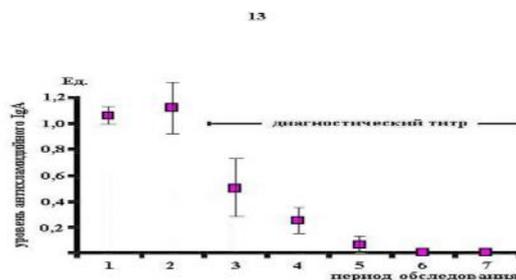


Рисунок 1. Динамика уровня антихламидийных IgA в сыворотке крови после антибактериальной терапии

Обозначения:

- ось ординат: уровень антихламидийных IgA в сыворотке крови, (Ед.);
- ось абсцисс: период обследования пациентов -
  1. перед лечением;
  2. в течение первых 2-недель после лечения;
  3. через 2-4 недели после лечения;
  4. через 4-8 недель после лечения;
  5. через 3-6 месяцев после лечения;
  6. через 6-9 месяцев после лечения;
  7. через 9 и более месяцев после лечения.

У всех пациентов из *дополнительной группы* в сыворотке крови до начала лечения выявлялись антихламидийные IgG (данные не приводятся), но отсутствовали IgA. На фоне нормализации результатов ПЦР явление сероконверсии IgA не было отмечено ни у одного представителя данной группы.

У каждого пациента из *группы сравнения* уровень антихламидийных IgA на протяжении полутора лет сохранялся на диагностическом уровне на фоне чередования периодов ремиссии и обострения клинических симптомов.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Общепризнано, что антитела должны быть направлены против возбудителя и приводить к его нейтрализации. Однако в экспериментах *in vitro* было продемонстрировано, что только менее 1% IgA нацелены против самих *C. trachomatis* [2], и что при хламидиозе гуморальный иммунитет по своей антибактериальной эффективности значительно уступает клеточному иммунитету [21].

Однако определение сывороточных антител к хламидиям оказалось очень значимым для диагностики этой инфекции. Об этом впервые заявили Ishi K. et al. (1991), отметив, что антигенные тесты нередко могут давать ложно-отрицательные результаты [10].

Аргументами оппонентов стали утверждения, что наличие сывороточных IgA не соотносится с клинической симптоматикой хламидийной инфекции. Shibahara H. et al. (2003) не выявили какую-либо корреляцию между уровнем IgA к *C. trachomatis* в сыворотке крови, с одной стороны, и патологией маточных труб, - с другой [17]. Кроме того, по данным некоторых авторов, обнаружение IgA также не коррелировало с результатами культурального метода и ПРЦ, а также уровнем эластазы полиморфно-ядерных нейтрофилов и числом пероксидазо-положительных лейкоцитов [8, 13]. Но Tanikawa M. et al. (1996) установили, что если в сыворотке крови пациенток определялись антихламидийные иммуноглобулины, то почти в два раза чаще диагностировалась окклюзия маточных труб, и более чем в два раза чаще выявлялся спаечный процесс с вовлечением яичников [20]. Takaba H. et al. (1991) обследовали половые пары и обнаружили, что если у одного полового партнера были выявлены *C. trachomatis*, то в 42% случаев антихламидийные IgA определялись у другого. При этом в контрольной группе эти иммуноглобулины были обнаружены лишь у 2,4% мужчин и у 4,8% женщин [19].

По результатам наших исследований, негативация ПЦР-теста по хламидиозу после лечения наступает раньше исчезновения специфических иммуноглобулинов. В течение нескольких месяцев после проведенной этиотропной терапии при сохраняющемся положительном IgA-тесте нельзя говорить об излеченности пациентов от хламидийной инфекции. Одним из вариантов исхода данного инфекционного заболевания может быть превращение патогена из типичных форм в персистентную [11]. При этом возбудитель, в большинстве случаев, может не определяться в ПЦР-тесте. Достаточно важным лабораторным подтверждением излеченности пациентов от хронического урогенитального хламидиоза является элиминация специфических IgA в сыворотке крови.

Посттерапевтическое изменение титров антихламидийных антител может быть различным. Сразу после лечения уровень иммуноглобулинов может оставаться высоким, либо

прогрессивно уменьшаться или увеличиваться [16]. Но в последующем,- после адекватной терапии, он, как правило, снижается [9, 14, 16, 22].

При сохранении IgA после лечения следует, прежде всего, ориентироваться на динамику изменения их уровня при последующем обнаружении указанных иммуноглобулинов в разные временные интервалы. Henry-Suchet J. et al. (1994) показали, что у женщин высокий уровень IgM более 4-х месяцев после терапии коррелировал с выделением хламидий на культуре клеток и патологией маточных труб [9]. Некоторые авторы считают, что сохранение антител (IgA, IgM) в сыворотке крови более 4-х месяцев [9, 16] или более 5-ти месяцев [22] должно служить основанием для дальнейшего обследования или лечения пациента.

Результаты наших исследований также показали, что при эффективном лечении, период выведения сывороточных антихламидийных IgA вполне ограничен. В большинстве случаев (98%) можно ориентироваться на срок 3-6 месяцев после окончания терапии, учитывая индивидуальные клинические проявления инфекции. Повторное появление IgA в сыворотке крови после их элиминации, по нашему мнению, должно расцениваться как новое заражение, а не как сероконверсия, о которой говорят в своих работах A. Clad et al. (2000) [7]. О сероконверсии следует думать только тогда, когда титр антител появляется в ходе лечения или сразу после лечения и сохраняется некоторое время после терапии. На наш взгляд, фактический материал, полученный A. Clad et al. (2000), был не совсем корректно интерпретирован самими авторами. Отсюда последовал их вывод о нецелесообразности определения антихламидийных IgA для диагностики этой инфекции.

Имеют место данные о том, что при однократном парентеральном заражении экспериментальных животных титр сывороточных антител к хламидиям, достигнув через 14 дней максимального уровня, в дальнейшем снижался без какой-либо антибактериальной терапии [18]. Возможно, что выявление антител у пациентов из *группы сравнения* в нашем исследовании свидетельствовало не о сохраняющейся инфекции, а о повторном заражении мужчин от их половых партнёров. При этом, диагностическая значимость серологических тестов, основанных на выявлении в сыворотке крови специфических антихламидийных IgA, действительно, может быть поставлена под сомнение. Но об этом однозначно можно будет говорить только после более основательного изучения указанного феномена.

Таким образом:

1. Можно утверждать, что сывороточные антихламидийные IgA являются значимым диагностическим критерием хламидийной инфекции в тех случаях, когда методы прямого

выявления хламидий оказываются не информативными или их результаты имеют противоречивый характер.

2. После адекватной антибактериальной терапии у всех пациентов, как правило, развивается элиминация антихламидийных IgA, которая, в свою очередь, имеет отсроченный характер и наблюдается у 100% пациентов в период до 9 месяцев после окончания лечения.

3. Важно учитывать, что после окончания антибактериальной терапии при отрицательных результатах культурального метода и ПЦР по хламидиозу нельзя однозначно говорить о наличии или отсутствии указанного инфекционного процесса.

### **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Bard J., Levitt D. Chlamydia trachomatis stimulates human peripheral blood B lymphocytes to proliferate and secrete polyclonal immunoglobulins in vitro // Infect. Immun. – 1984. – Vol. 43. – P. 84-92. [1]
2. Batteiger B.E., Lin P.M., Jones R.B., Van Der Pol B.J. Species-, serogroup-, and serovar-specific epitopes are juxtaposed in variable sequence region 4 of the major outer membrane proteins of some Chlamydia trachomatis serovars // Infect. Immun. – 1996. – Vol. 64. – P. 2839-2841.[2]
3. Black C.M. Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections // Clin. Microbiol. Rev. – 1997. – Vol. 10. – P. 160-184. [3]
4. Black C.M. Serological tests for *Chlamydia trachomatis* infections (Author's Reply) // Clin. Microbiol. Rev. – 1998. Vol. 11. – P. 228-229. [4]
5. Bollmann R., Engel S., Petzoldt R., Gobel UB. Chlamydia trachomatis in andrologic patients--direct and indirect detection // Infection. - 2001. – Vol. 29. – P. 113-8. [5]
6. Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for the prevention and management of *Chlamydia trachomatis* infections // Morbidity and Mortality Weekly Report. – 1993. – Vol. 42. - RR-12. – P. 1-39. [6]
7. Clad A., Freidank H.M., Kunze M., Schnoeckel U., Hofmeier S., Flecken U., Petersen E.E. Detection of seroconversion and persistence of *Chlamydia trachomatis* antibodies in five different serological tests // Eur. J. Clin. Microb. Infect. Dis. – 2000. – Vol. 19. – P. 932-937. [7]
8. Dieterle S., Mahony J.B., Luinstra KE., Stibbe W. Chlamydial immunoglobulin IgG and IgA antibodies in serum and semen are not associated with the presence of Chlamydia trachomatis DNA or rRNA in semen from male partners of infertile couples // Hum. Reprod. – 1995. – Vol. 10. P. 315-319. [8]

9. Henry-Suchet J., Askienazy-Elbhar M., Thibon M., Revol C., Akue B.A. Post-therapeutic evolution of serum chlamydial antibody titers in women with acute salpingitis and tubal infertility // *Fertil. Steril.* – 1994. – Vol. 62. – P. 296-304. [9]
10. Ishi K., Shimota H., Kawashima T., Kawahata S., Kubota T., Takada M. Significance of determination of the blood antibody level in *Chlamydia trachomatis* infection of the uterine cervix // *Rinsho Byori.* – 1991. Vol. 39. – P. 1215-1219. [10]
11. Jendro M.C., Deutsch T., Korber B., Kohler L., Kuipers J.G., Krausse-Opatz B., Westermann J., Raum E., Zeidler H. Infection of human monocyte-derived macrophages with *Chlamydia trachomatis* induces apoptosis of T cells: a potential mechanism for persistent infection // *Infect. Immun.* – 2000. – Vol. 68. – P. 6704-6711. [11]
12. Levitt D., Danen R. Development and regulation of chlamydia-responsive murine B lymphocytes // *J. Immunol.* – 1987. – Vol. 138. – P. 3468-3474. [12]
13. Ludwig M., Hausmann G., Hausmann W., Scriba M., Zimmermann O., Fischer D., Thiele D., Weidner W. *Chlamydia trachomatis* antibodies in serum and ejaculate of male patients without acute urethritis // *Ann. Urol. (Paris).* – 1996. – Vol. 30. – P. 139-146. [13]
14. Maruta N. Study of *Chlamydia trachomatis* in chronic prostatitis // *Hinyokika-Kiyo.* - 1992. – Vol. 38. – P. 297-304. [14]
15. Numazaki K. Serological tests for *Chlamydia trachomatis* infections (Letter to the Editor) // *Clin. Microbiol. Rev.* – 1998. – Vol. 11. – P. 228. [15]
16. Piura B., Sarov B., Sarov I. Persistence of antichlamydial antibodies after treatment of acute salpingitis with doxycycline // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* – 1993. – Vol. 48. – P. 117-121. [16]
17. Shibahara H., Takamizawa S., Hirano Y., Ayustawati, Takei Y., Fujiwara H., Tamada S., Sato I. Relationships between *Chlamydia trachomatis* antibody titers and tubal pathology assessed using transvaginal hydrolaparoscopy in infertile women // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2003. – Vol. 50. – P. 7-12. [17]
18. Storz J., Carroll E.J., Stephenson E.H., Ball L., Eugster A.K. Urogenital infection and seminal excretion after inoculation of bulls and rams with chlamydiae // *Am. J. Vet. Res.* – 1976. – Vol. 37. – P. 517-520. [18]
19. Takaba H., Nakano Y., Miyake K. Studies on detection of serum IgA and IgG antibodies specific for *Chlamydia trachomatis* in latent infections in males // *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi.* – 1991. – Vol. 82. – P. 1084-1090. [19]
20. Tanikawa M., Harada T., Katagiri C., Onohara Y., Yoshida S., Terakawa N. *Chlamydia trachomatis* antibody titres by enzyme-linked immunosorbent assay are useful in predicting severity of adnexal adhesion // *Hum. Reprod.* – 1996. – Vol. 11. – P. 2418-2421. [20]

21. Williams D.M., Grubbs B.G., Pack E., Kelly K., Rank R.G. Humoral and cellular immunity in secondary infection due to murine *Chlamydia trachomatis* // *Infect. Immun.* – 1997. – P. 65. – P. 2876-2882. [21]

22. Workowski K.A., Lampe M.F., Wong K.G., Watts M.B., Stamm W.E. Long-term eradication of *Chlamydia trachomatis* genital infection after antimicrobial therapy. Evidence against persistent infection // *JAMA.* – 1993. – Vol. 270. – P. 2071-2075. [22]