



СПРАВОЧНИК
ЗАВЕДУЮЩЕГО КДЛ

«АКТИОН» МЦФЭР

Иммунологические исследования

Практическое пособие



СОДЕРЖАНИЕ

Критерии отбора проб для проведения дополнительного исследования наличия антител к вирусу гепатита С Потапова А.А., Шульгина М.М., Ермолаева М.И., Сюч Н.И.	2
Роль ядерно-транскрипционных факторов в иммуногистохимической диагностике злокачественных новообразований Буланов Д.В.	16
Актуальные проблемы иммунопатологии ревматических заболеваний: обзор материалов школы «Современные аспекты клинической иммунологии в ревматологии»	24
HTSA – современная методика количественного определения фекальных биомаркеров в диагностике заболеваний кишечника Долгих Т.И., Галилейская С.Б., Иванов А.М., Лялюкова Е.А.	43
Применение метода линейного иммуноблоттинга для определения антител классов G и M к основным возбудителям инфекций TORCH-группы Марданлы С.Г., Арсеньева В.А., Амелина Е.А., Марданлы С.С., Ротанов С.В.	51

Критерии отбора проб для проведения дополнительного исследования наличия антител к вирусу гепатита С

А.А. Потапова

д-р биол. наук, доцент, врач клинической лабораторной диагностики,

М.М. Шульгина

врач клинической лабораторной диагностики,

М.И. Ермолаева

врач клинической лабораторной диагностики

Клинико-иммунологическая лаборатория по диагностике
ВИЧ-инфекции,

Н.И. Сюч

д-р мед. наук, проф., заведующая верификационной лабораторией

ГБУЗ «Московский научно-практический центр
дерматовенерологии и косметологии Департамента
здравоохранения г. Москвы»

Цель данной работы – установить критерии отбора проб для дополнительных исследований наличия антител к вирусу гепатита С. Пробы, в которых при определении антител к Core-антигену или к неструктурным антигенам ВГС методом ИФА был установлен низкий коэффициент позитивности, дополнительно исследовали методом линейного иммуноанализа (ЛИА). Обнаружено, что совпадение результатов определения антител, выполненного несколькими подтверждающими тестами при применении ИФА, не превышает 88%, а при использовании ИФА и ЛИА – 50%. Разработаны критерии отбора проб для проведения верифицирующих исследований и алгоритмы, обеспечивающие снижение риска сообщения ложноположительного результата.

Проблема ложноположительных результатов при определении наличия антител к ВГС (анти-ВГС) стоит во всем мире очень остро, в связи с чем предлагают разные способы верификации результата. Исследования методом иммуноблота (ИБ) и линейного иммунного анализа (ЛИА) позволяют классифицировать не только позитивные и негативные, но и неопределенные результаты, что соответствует современному уровню диагностики гепатита С [5, 9].

Существенный недостаток ИБ и ЛИА – не только высокая стоимость, но и возможность ложноотрицательного результата [6].

к сведению

В качестве альтернативы ИБ было обосновано использование иммуноферментной тест-системы (ИФТС) Monolisa anti-HCV PLUS (BioRad, Франция) планшетного формата с комплексным определением анти-ВГС [11], в которой представлены критерии только позитивного и негативного результатов исследования. В настоящее время российские производители подтверждающих ИФТС планшетного формата активно включают в инструкции к наборам реагентов, наряду с позитивным и негативным, также и неопределенный результат исследования, наиболее объективный в диагностических системах с отдельным определением антител к Core, NS3, NS4, NS5 антигенам ВГС (соответственно анти-Core, анти-NS3, анти-NS4, анти-NS5). Учитывая проблемы лабораторной диагностики ВГС-инфекции, особенно острые на этапе массового скрининга, следовало выяснить, насколько данные ИФТС могут заменить ИБ.

Для установления критериев отбора проб в дополнительные исследования с целью предупреждения ложноположительного результата наличие анти-ВГС исследовано в пробах сыворотки крови пациентов разнопрофильных лечебно-профилактических учреждений Москвы. Биоматериал в лунки планшетов при первичном скрининге вносили с помощью пипетирующих станций Evoclinal 200/8 (Tescan, Швейцария), при дополнительных исследованиях – с помощью ручных дозаторов (Biohit, Финляндия). Использованы скрининговые ИФТС: «РекомбиБест анти-ВГС тест» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск), «Гепаскрин» («Биосервис», Москва) и Monolisa anti-HCV PLUS (BioRad, Франция).

В России определение анти-ВГС происходит по двухэтапной схеме. Пробы сыворотки крови, в которых на первом этапе исследования в диагностических системах с сорбцией антигенов ВГС в одной лунке планшета для ИФА были обнаружены анти-ВГС, необходимо исследовать в подтверждающих диагностических системах с раздельной сорбцией структурных и неструктурных антигенов ВГС [4].

к сведению

В нашей работе использованы три подтверждающие ИФТС с раздельным определением в двух лунках планшета анти-Core и анти-NS ВГС: «ВГС-ДСМ-подтверждающий тест» (ЗАО «Медико-биологический союз», Новосибирск), «РеккомбиБест анти-ВГС-подтверждающий тест» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск) и «ИФА-анти-НСV-спектр-GM» (НПО «Диагностические системы», Нижний Новгород), а также три ИФТС этих же производителей с раздельным определением четырех видов антител: анти-Core, анти-NS3, анти-NS4, анти-NS5 ВГС (ИФТС «спектр»). После проведения ИФА для измерения оптической плотности (ОП) контрольных проб и проб пациентов использовали планшетный фотометр Sunrise (Tecan, Австрия). Для каждого измерения вычисляли коэффициент позитивности (КП) как отношение ОП исследуемого образца к ОП критической, которую определяют по формуле, приведенной в инструкции производителя реагентов, на основе ОП контрольного образца. Величина КП опосредованно характеризует количество соответствующих анти-ВГС в пробе.

Подтверждающие исследования проведены наборами реагентов с использованием метода ЛИА INNO-LIA HCV Ab III update (Innogenetics, Бельгия), «ЛИА ВГС» («Ниармедик плюс», Москва) и иммуноблота (ИБ) RecomBlot HCV IgG 2.0 (Mikrogen, Германия).

При разработке критериев отбора проб для дополнительного исследования (ИФТС «спектр», ИБ, ЛИА) применен подход для достижения диагностического консенсуса, согласно которому в качестве критической точки для перепроверки результатов используют КП сыворотки в ходе первичного скрининга [9] с некоторыми изменениями [3].

Пробы, для которых значение КП при первичном скрининге составило менее 6, тестировали в нескольких ИФТС. Интегрально-отрицательным считали результат в тех случаях, когда:

- ~ в одной скрининговой ИФТС результат был положительным, во второй (как правило, Monolisa anti-HCV PLUS, Version 2) – отрицательным; в одной из подтверждающих ИФТС результат был отрицательным, в другой (с отдельным определением антител к Core, NS3, NS4 NS5) обнаруживали реактивность только к одному антигену.

Интегрально-положительным считали результат в тех случаях, когда:

- ~ результат был положительным в любых трех ИФТС;
- ~ один или два скрининговых теста были положительными ($KП \geq 1$), один из подтверждающих тестов был положительным, в другом (с отдельным определением антител к Core, NS3, NS4 NS5) обнаруживали реактивность только к одному антигену.

Поиск различий между интегрально-положительной и интегрально-отрицательной группами проводили по двум статистическим критериям. Для сравнения дисперсий двух вариационных рядов использовали *f*-критерий Фишера. С целью проверки гипотезы о различии между средними двух генеральных совокупностей (интегрально-отрицательных и интегрально-положительных проб) использовали двухвыборочный *z*-тест для средних с известными дисперсиями.

В целом дизайн исследования включал следующие этапы:

1. Сравнение чувствительности и специфичности подтверждающих тестов при применении наборов реагентов ведущих российских производителей.

2. Сравнение результатов подтверждающих исследований при использовании ЛИА, ИБ и ИФТС «спектр» для выяснения, насколько ИФТС «спектр» способна обеспечить качество дополнительных исследований.

3. Разработка критериев отбора проб для дополнительных исследований.

Статистическая обработка материала проведена с помощью компьютерных программ MS Excel, BioStatistica, Statistica 6 и Clinic [1].

Количество противоречивых результатов при применении подтверждающих ИФТС планшетного формата

Руководствуясь приказом о проведении исследований на наличие антител к ВГС [4], после первичного скринингового исследования (ИФТС «РекомбиБест анти-ВГС»), 144 образца, для которых были получены положительные результаты, тестировали с использованием подтверждающей ИФТС «РекомбиБест анти-ВГС-подтверждающий тест» с отдельным выявлением анти-Core и анти-NS ВГС. Для того чтобы сравнить результаты определения анти-ВГС в двух подтверждающих диагностических системах с отдельным выявлением антител к Core-антигену и к комплексу NS-антигенов разных производителей, были проведены дополнительные исследования. Пробы, в которых были получены положительные результаты при выявлении реактивности только к комплексу NS-белков (144 пробы, КП $2,35 \pm 2,45$), были дополнительно исследованы в подтверждающей ИФТС «ДС-ИФА-Анти-НСV-спектр-ГМ» (с определением анти-Core и анти-NS ВГС). В 32 пробах (22,22%) получены противоречивые результаты в ИФТС разных производителей, в том числе в 8 пробах во второй подтверждающей ИФТС («ДС-ИФА-Анти-НСV-спектр-ГМ») обнаружены антитела к Core-белку (КП $2,16 \pm 1,29$). Эти 32 пробы, для которых получены противоречивые результаты в двух подтверждающих ИФТС, затем были протестированы с помощью ЛИА INNO-LIA HCV Ab III update. Неопределенные результаты в ЛИА получены для 11 образцов (34,4%), анти-ВГС в ЛИА были обнаружены в 9 образцах (28,1%) и не обнаружены в 12 образцах (37,5%). При сравнении результатов в ЛИА различий в специфичности и чувствительности ИФТС «РекомбиБест анти-ВГС-подтверждающий тест» и «ДС-ИФА-Анти-НСV-спектр-ГМ» не обнаружено.

Сравнение результатов дополнительных исследований, проведенных методами ЛИА, ИБ и при применении ИФТС «спектр»

Пробы (74) с низкими значениями ОП, полученными при скрининге (КП $3,14 \pm 1,78$) и при использовании подтверждающей ИФТС с отдельным выявлением антител к Core (КП

1,68 ± 1,12) и к комплексу NS-антигенов (КП 2,35 ± 2,45), были исследованы в ИФТС с отдельным выявлением антител к Core-, NS3, NS4- и NS5-антигенам ВГС и в иммуноблоте INNO-LIA HCV Ab III update. В ИФТС «спектр» получено 16 положительных (21,6%), 43 неопределенных (58,1%) и 15 отрицательных результатов (20,3%). В ИБ INNO-LIA HCV Ab III update в данной выборке было 23 положительных результата (31%), 41 неопределенный результат (55,4%) и 10 отрицательных результатов (13,5%). Менее чем в половине случаев исследования (35 из 77 проб, 47%) низкопозитивных в скрининге образцов наблюдали полное совпадение выявленных антител в ИФТС и в ЛИА. Совпадение отрицательных результатов исследования проб в ИФТС и в ЛИА наблюдали в трех пробах (4%). Итого полное совпадение результатов исследования составляло примерно 50%.

Аналогичные значения получены при сравнении результатов исследования низкопозитивных проб в ИФТС «спектр» и в ИБ RescomBlot HCV IgG 2.0. Таким образом, статистически значимых различий количества положительных, отрицательных и неопределенных результатов между ИФТС, ЛИА и ИБ не обнаружено.

Разработка критериев отбора проб для дополнительного верифицирующего исследования

Для того чтобы избежать малодостоверного при низком КП сообщения положительного результата, необходимо провести дополнительные исследования с использованием наборов реагентов, инструкции к которым содержат критерии неопределенного результата.

Отбор проб для дополнительного исследования проводился с учетом значений КП антител к различным антигенам ВГС в скрининговых и подтверждающих исследованиях.

По результатам достижения диагностического консенсуса в общей группе из 117 проб были выделены группы интегрально-отрицательных (инт-, 78 проб) и интегрально-положительных проб (инт+, 39 проб). Соответствующие распределения отличались (табл. 1). Так, в первичной скрининговой ИФТС между группами интегрально-положительных

и интегрально-отрицательных образцов величина выборочных средних КП различалась не более чем на 0,2 ($p < 0,05$). Во второй скрининговой ИФТС Monolisa anti-HCV PLUS. Version 2 обнаружено различие между дисперсиями выборок положительных и отрицательных проб ($p < 0,05$) и между средними КП не более чем на 0,9 ($p < 0,05$).

Таблица 1

Отличие групп интегрально-отрицательных и интегрально-положительных образцов в скрининговых и подтверждающих исследованиях

Группа	Маркер	Характеристика выборки	Инт+	Инт-
1	Анти-ВГС в скрининге	Среднее КП	0,372	1,78 ($p < 0,05$)
		Дисперсия	Различаются ($p < 0,05$)	
2	Анти-ВГС в скрининге	Среднее КП	1,59	2,22 ($p < 0,05$)
		Дисперсия	Не различаются	
3	Анти-Core	Среднее КП*	2,28	1,66 ($p < 0,05$)
		Дисперсия**	Различаются ($p < 0,05$)	
4	Анти-NS	Среднее КП	4,16	2,26 ($p < 0,05$)
		Дисперсия	Различаются ($p < 0,01$)	

Примечание: Инт- – интегрально-отрицательные образцы; Инт+ – интегрально-положительные образцы; группа 1 – Monolisa anti-HCV PLUS. Version 2; группа 2 – «РекомбиБест анти-ВГС тест» и «Гепа-скрин»; группы 3 и 4 – «ВГС-ДСМ-подтверждающий тест», «РекомбиБест анти-ВГС-подтверждающий тест» «ИФА-анти-HCV-спектр-GM»; * – различие дисперсий по двухвыборочному f -критерию; ** – различие средних значений по двухвыборочному z -тесту

При определении различия параметров выборок интегрально-положительных и интегрально-отрицательных образцов в первой подтверждающей ИФТС с отдельной сорбцией структурных и неструктурных АГ («ВГС-ДСМ-подтверждающий тест») обнаружено, что группы различались по средним величинам КП анти-Core (соответственно 1,66 и 2,28, при $p < 0,05$) и по дисперсиям соответствующих выборок ($p < 0,05$), а также по средним величинам КП анти-NS (соответственно 2,26 и 4,16, $p < 0,05$) и по дисперсиям соответствующих выборок ($p < 0,01$).

Таким образом, при использовании ряда критериев было отмечено различие групп интегрально-положительных и интегрально-отрицательных образцов сыворотки крови по показателям в подтверждающей ИФТС.

Критерии выборки проб для дополнительного подтверждающего исследования были рассчитаны с учетом данных о распределении в интегрально-отрицательной выборке значений КП скрининга, КП анти-Core и КП анти-NS.

Как минимум 95% значений КП в первичном скрининге проб из интегрально-отрицательной выборки попадает в интервал (0; 2,1), а 99% – в интервал (0; 2,48). Полученное нами значение КП скрининга $\leq 2,1$ может быть обоснованно принято для проведения дополнительного расширенного исследования проб в планшетных ИФТС.

В подтверждающей тест-системе при выявлении реактивности антител к Core AG 95% значений КП анти-Core проб из интегрально-отрицательной выборки попадают в интервал (0; 1,87), а 99% – в интервал (0; 2,02).

Как минимум 95% значений КП анти-NS проб из интегрально-отрицательной выборки попадают в интервал (0; 3,2), а 99% – в интервал (0; 4,16).

Соответствующие величины КП (при $< 0,05$):

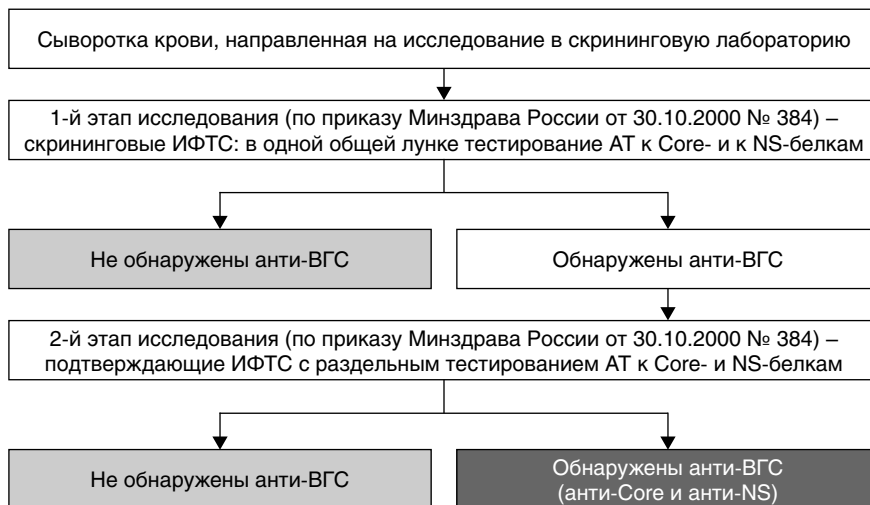
- ~ в скрининге КП анти-ВГС менее 2,1;
- ~ при подтверждении КП анти-Core менее 1,87;
- ~ КП анти-NS менее 3,2 – могут быть обоснованно приняты за пограничные значения для проведения дополнительного подтверждающего исследования образцов сыворотки, поскольку в интервалах от 0 до данных значений КП с вероятностью 95% находятся пробы с интегрально-отрицательным результатом.

На рисунке представлен разработанный нами алгоритм исследования проб сыворотки крови на наличие антител к ВГС, включающий первичный скрининг и подтверждение наличия анти-ВГС в пробах, позитивных на этапе первичного скрининга (а), а также дополнительное расширенное исследование проб с низкими (округленными до целых значений) коэффициентами позитивности в подтверждающем исследовании (б).

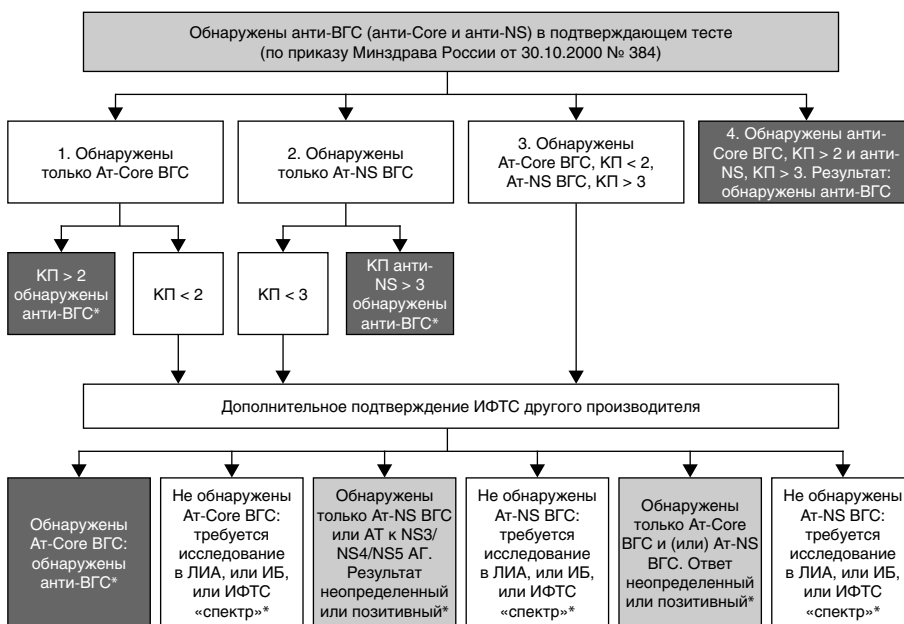
Второй (упрощенный) вариант алгоритма, в котором использовано минимальное количество наборов реагентов (в том

Практикум специалиста

а)



б)



*Усовершенствованный алгоритм исследования сыворотки крови на наличие антител к вирусу гепатита С. **Примечание:** а – алгоритм исследования проб на наличие анти-ВГС по приказу Минздрава России от 30.10.2000 № 384; б – алгоритм дополнительного исследования проб с низким КП анти-Core и (или) анти-NS в подтверждающем тесте; * – ответ в соответствии с инструкцией к тест-системе с указанием КП обнаруженных антител*

числе, возможно, только одного производителя), обеспечивающий объективность информации о результатах исследования, включает применение следующих реагентов: 1) скрининговую ИФТС с общим определением анти-ВГС; 2) подтверждающий набор реагентов с определением анти-Core и анти-NS; 3) набор реагентов с отдельным определением анти-Core, анти-NS3, анти-NS4, анти-NS5.

Простой расчет критериев для дополнительного подтверждающего исследования представлен на примере результатов, полученных в Московском научно-практическом центре дерматовенерологии и косметологии Департамента здравоохранения г. Москвы в 2014 году. Всего было исследовано 60 763 пробы сыворотки крови пациентов, из них положительные результаты (обнаружение анти-ВГС) были получены для 3206 проб (5,28%); при исследовании первично-положительных проб в подтверждающей ИФТС наличие анти-ВГС обнаружено в 2724 пробах (4,48%) (результаты интерпретировались как положительные при КП анти-Core ≥ 1 и (или) анти-NS КП анти-NS ≥ 1). Из 2724 были отобраны 196 проб с КП анти-Core ≤ 6 или с КП анти-NS ≤ 9 для разработки критериев отбора в дополнительное исследование в ИФТС «спектр» (таблица 2). Было определено количество проб, для которых получен отрицательный результат в ИФТС «спектр», а при исследовании в подтверждающей ИФТС наблюдались различные величины КП анти-Core и анти-NS. Согласно расчету, представленному в таблице 2, при исследовании проб с КП анти-Core менее 6 обнаружено, что у всех проб с отрицательными результатами в ИФТС «спектр» КП анти-Core был менее 2 в подтверждающей ИФТС (группа 1); доля отрицательных результатов в группе 1 отличалась от доли отрицательных результатов в группах 2 и 3 ($p < 0,05$).

При дополнительном исследовании проб с низкими значениями КП анти-NS обнаружено, что из интервала в подтверждающей ИФТС $1 \leq \text{КП анти-NS} \leq 3$ (104 пробы, группа 4) неопределенный результат исследования в ИФТС «спектр» был в 91 пробе, из них в 24 пробах – вследствие обнаружения анти-NS3 (26,37%), в 62 пробах – анти-NS4 (68,13%), в 5 пробах – анти-NS5 (5,49%). В этом же интервале как положительные были идентифицированы 11 проб (по совместному наличию антител к NS3 и другим неструктур-

Результаты подтверждения наличия анти-ВГС в ИФТС «спектр» в образцах сыворотки крови, низкопозитивных в подтверждающей ИФТС («РекомбиБест анти-ВГС-подтверждающий тест»)

Группы проб	Интервал ОП маркера в подтверждающей ИФТС1	Количество проб в интервале КП в подтверждающей ИФТС	Количество отрицательных проб в ИФТС «спектр», n/%	Результат в ИФТС «спектр», %
1	$1 \leq \text{КП анти-Core} \leq 2$	24	6/25*	100% всех проб с отрицательным результатом в ИФТС «спектр» выбраны из интервала ИФТС2 $1 \leq \text{КП анти-Core} \leq 2$
2	$2 < \text{КП анти-Core} \leq 3$	17	0/0	
3	$3 < \text{КП анти-Core} \leq 6$	4	0/0	
4	$1 \leq \text{КП анти-NS} \leq 3$	104	2/2	100% всех проб с отрицательным результатом в ИФТС «спектр» выбраны из интервала ИФТС2 $1 \leq \text{КП анти-NS} \leq 3$
5	$3 < \text{КП анти-NS} \leq 6$	36	0/0	
6	$6 < \text{КП анти-NS} \leq 9$	11	0/0	

Примечание: n – абсолютное количество проб; * – отличие от групп 1 и 2 при $p < 0,05$

ным антигенам ВГС), результаты исследования двух проб были отрицательными.

Из интервала в подтверждающей ИФТС3 $3 < \text{КП анти-NS} \leq 6$ (36 проб, группа 5) результаты исследования 31 пробы были неопределенными, из них в 11 пробах были обнаружены только анти-NS3 (35,48%), в 19 пробах – только анти-NS4 (61,29%), в 1 пробе – только анти-NS5 (3,22%). В этом же интервале как положительные были идентифицированы 5 проб (по наличию антител к NS3 и другим антигенам ВГС), анти-ВГС-отрицательных проб не было.

В интервале $6 < \text{КП анти-NS} \leq 9$ (11 проб, группа 6) результаты исследования 7 проб были неопределенными, из них в 3 пробах были обнаружены анти-NS3 (42,86%), в 4 пробах – анти-NS4 (57,14%). В этом же интервале как положительные были идентифицированы 4 пробы (по совместному наличию антител к NS4 и другим антигенам ВГС), анти-ВГС-отрицательных проб не было.

Таким образом, в 2014 году все отрицательные результаты в тест-системе «спектр» получены в пробах, выбранных из подтверждающей тест-системы с КП анти-Core ≤ 2 и КП анти-NS ≤ 3 , что обусловило выбор этих значений для проведения дополнительных исследований с целью предупреждения ложноположительного результата.

Многочисленные данные, представленные российскими и зарубежными исследователями, свидетельствуют о сложности интерпретации результатов исследования анти-ВГС как с помощью различных иммунохимических методов (ИФА, ЛИА и хемилюминесцентного), так и единственного метода, например ИФА [5, 10]. Наиболее актуальны результаты, полученные при использовании диагностических систем, разрешенных для лабораторной диагностики в определенной стране [5, 7]. В нашей работе сопоставлены результаты исследования проб в наиболее часто используемых в России скрининговых и подтверждающих ИФТС планшетного формата (как российских, так и зарубежных производителей).

При низкопозитивных результатах в скрининговой и в подтверждающей ИФТС, как свидетельствуют данные, полученные в многочисленных, в т. ч. наших исследованиях [2, 3, 5], оправдано критическое отношение к результатам, поскольку в ИФТС другого производителя в 10–20% случаев анти-ВГС не обнаруживают.

к сведению

Отрицательные результаты определения анти-ВГС в ИФТС планшетного формата могут сочетаться с неопределенными результатами выявления данных маркеров в ИБ; в работе Schroter M. и соавт. доля таких образцов составила 13%. Отсутствие клинических и биохимических признаков заболевания через 3 месяца привело исследователей к выводу о неспецифической реактивности проб при применении ИБ [8]. Мы использовали подход диагностического консенсуса (согласования всех полученных результатов) для определения параметров группы, пробы из которой необходимо исследовать дополнительно для достижения объективного результата, в том числе без включения в исследование иммуноблотов в качестве референсных наборов реагентов.

Полученные результаты позволяют полагать, что в лабораторной практике для исследования так называемых проблемных проб целесообразно использовать ИФТС планшетного формата с отдельным выявлением антител к Core, NS3, NS4, NS5 антигенам ВГС, в инструкции которых введены критерии неопределенного результата. Использование этих реагентов уменьшает риск сообщения ложноположительного результата за счет возможности установления неопределенного результата исследований, а представленный алгоритм обеспечивает получение объективного, в том числе неопределенного, результата исследования с указанием направленности антител к определенному антигену ВГС.

Список использованной литературы

1. Бенсман В.М. Облегченные способы статистического анализа в клинической медицине (с приложением компьютерной программы Романова А.Ю. на CD). Краснодар: изд-во КГМА, 2002.
2. Кузина Л.Е., Ястребова О.Н., Садикова Н.В. и др. Сравнительная оценка результатов определения антител к вирусу гепатита С при использовании различных иммуноферментных тест-систем и подтверждающих тестов // Вопросы вирусологии. 2004. № 6. С. 41–44.
3. Потанова А.А. Диагностическая значимость и интерпретация неоднозначных результатов исследования серологических маркеров вирусного гепатита С: Дис. ... д-ра. биол. наук. М., 2016.
4. Приказ Минздрава России от 21.10.2002 № 322 «О применении в практике здравоохранения иммуноферментных тест-систем для выявления поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) и антител к вирусу гепатита С (анти-ВГС) в сыворотке крови человека».
5. Alter M.J., Kuhnert W.L., Finelli L. Guidelines for laboratory testing and result reporting of antibody to hepatitis C virus. Centers for Disease Control and Prevention // MMWR Recomm Rep. 2003. Vol. 52. P. 1–16.
6. Pereira F.M., Zarife M.A., Reis E.A. Indeterminate RIBA results were associated with the absence of hepatitis C virus RNA (HCV-RNA) in blood donors // Rev Soc Bras Med Trop. 2014. Vol. 47. P. 12–17.
7. Ren F.R., Lv Q.S., Zhuang H. et al. Significance of the signal-to-cutoff ratios of anti-hepatitis C virus enzyme immunoassays in

- screening of Chinese blood donorse // *Transfusion*. 2005. Vol. 45. P. 1816–1822.
8. *Shroter M., Feucht H.H., Schafer P. et al.* Definition of false-positive reactions in screening for hepatitis C virus antibodies // *J. clin. Microbiol.* 1999. Vol. 137. P. 233–234.
9. *Suslov A.P., Kuzin S.N., Golosova T.V. et al.* Limits of diagnostic accuracy of anti-hepatitis C virus antibodies detection by ELISA and immunoblot assay // *Russin Journal of Immunol.* 2002. Vol. 7. P. 176–184.
10. *Tobler L.H., Tegtmeier G., Stramer S.L. et al.* Lookback on donors who are repeatedly reactive on first-generation hepatitis C virus assays: justification and rational implementation // *Transfusion*. 2000. Vol. 40. P. 15–24.
11. *Vermeersch P., Van Ranst M., Lagrou K.* Validation of a strategy for HCV antibody testing with two enzyme immunoassays in a routine clinical laboratory // *J. clin. Virol.* 2008. Vol. 42. P. 394–398.



Роль ядерно-транскрипционных факторов в иммуногистохимической диагностике злокачественных новообразований

Д.В. Буланов

канд. мед. наук, врач-патологоанатом

*Европейский медицинский центр,
гистологическая лаборатория, Москва*

Использование новых маркеров (ядерно-транскрипционных факторов), определяющих линейно-специфичные и прогностически значимые биологические свойства опухолевой клетки, позволяет патологу на современном этапе, оптимизируя имеющиеся иммуногистохимические алгоритмы, осуществлять точную морфологическую диагностику. За последнее десятилетие разработаны чувствительные и высокоспецифичные иммуногистохимические маркеры для различных эпителиальных и неэпителиальных злокачественных опухолей.

Развитие современных иммуногистохимических и молекулярно-биологических методов исследования в практике патолога позволили в определенной степени достичь успехов в диагностике и понимании биологического агрессивного потенциала злокачественных опухолей. Несмотря на это, основной проблемой в диагностической работе патолога по-прежнему считают низкодифференцированные и недифференцированные опухоли, в т. ч. метастатические, без выявленного первичного очага (без четких признаков органной принадлежности).

Иммуногистохимический метод в последнее десятилетие играет одну из ключевых ролей в диагностике злокачественных опухолей. До недавнего времени основной целью этого метода была оценка линейной дифференцировки (тканеспецифичных свойств) опухолевых клеток. К сожалению, большинство традиционных иммуногистохимических маркеров (антител), активно используемых в практике (преимущественно направ-

ленных против цитоплазматических антигенных детерминант), показали относительно ограниченную и низкую специфичность. Например, α -SMA (альфа-гладкомышечный актин) – маркер новообразований гладких мышц, довольно часто экспрессируется и в миофибробластических опухолях; α -SMA может быть также обнаружен в практически любой низко- или недифференцированной злокачественной опухоли веретеноклеточного типа гистологического строения. Белок S100 (S100B), наиболее широко используемый как маркер нейрональной клеточной дифференцировки, наряду с выраженной экспрессией в доброкачественных опухолях оболочек периферических нервов (шваннома) и вариабельной экспрессией в подгруппе злокачественных опухолей оболочек периферических нервов (malignant peripheral nerve sheath tumors, MPNST), экспрессируется в меланоцитах, хрящевых и миоэпителиальных доброкачественных и злокачественных опухолях, клетках Лангерганса, а иногда и в некоторых злокачественных карциномах, в частности в ряде карцином молочной железы.

За последнее десятилетие разработаны более чувствительные и высокоспецифичные иммуногистохимические маркеры для различных эпителиальных и неэпителиальных злокачественных опухолей. В данной работе представлена информация о некоторых новых, ранее мало изученных диагностических маркерах, которые могут служить неотъемлемой частью диагностических иммуногистохимических панелей, активно используемых в практической работе патолога.

Открытие ядерно-транскрипционных факторов (nuclear transcription factors, NTF) и изучение их функции в клетке во многом связано с именем Роджера Дэвида Корнберга, американского биохимика, лауреата Нобелевской премии (2006 г.) за изучение транскрипции у эукариот. Ядерно-транскрипционные факторы – группа внутриклеточных белков, регулирующих транскрипцию генов (т. е. активность синтеза новых белков) в клетке, что является критической функцией в механизмах эмбрионального развития и клеточного гомеостаза. Активность ядерно-транскрипционных факторов обусловлена наличием лиганд-ассоциированных взаимодействий, в частности со стероидными, тиреоидными гормонами, производными жирных кислот. Основные функции этих белков в клетке: базальная экспрессия генов, регуляция онтогенеза, ответ на внеклеточные сигналы, на изменение окружающей среды, контроль клеточного цикла. Развитие иммуногистохимических методов позволило на основе знаний о структурной организации данных белковых молекул и антигенных детерминант синтезировать высокоспецифичную группу особых антител, обозначаемых в литературе как «антитела линейно-ограниченных транскрипционных факторов» (lineage-restricted transcription factors). Использование данной группы антител для иммуногистохими-

ческой диагностики опухолей практикуется уже более 10 лет; например, использование антител TTF-1 (Thyroid transcription factor-1), CDX-2 CDX (homeobox genes essential to intestinal organogenesis and encode nuclear transcription factors), PAX-5 (gene is a member of the paired box (PAX) family of transcription factors), MyoD1 (members of the Myo-D family of transcription factors) нашло широкое применение в диагностике злокачественных опухолей различного гистогенеза. В связи с активным развитием молекулярной биологии число антител линейно-ограниченных транскрипционных факторов увеличивается лавинообразно, и к началу 2014 г. насчитывалось уже более 50 новых маркеров. С учетом молекулярно-биологических характеристик ядерно-транскрипционных факторов в настоящее время наиболее актуальными и практически значимыми в иммуногистохимической диагностике являются следующие биологические свойства ядерно-транскрипционных факторов: опухольспецифичность, органоспецифичность и прогностическая значимость.

На современном этапе развития относительно новых диагностических методов в патологической анатомии, таких как иммуногистохимия, молекулярная биология, в т. ч. *in situ*-гибридизации (флуоресцентной FISH и хромогенной CISH меток), в сочетании с использованием новых антител линейно-ограниченных транскрипционных факторов, стало возможным проводить дифференциальную диагностику ряда формально фенотипически схожих недифференцированных и низкодифференцированных эпителиальных и неэпителиальных злокачественных опухолей на совершенно ином, качественно новом уровне [3].

Опухольспецифичные ядерно-транскрипционные факторы – внутриядерные белки, возникающие в результате специфических опухольассоциированных, как правило, устойчивых генетических транслокаций, или функционирующие на этапах эмбриогенеза, – являются продуктами этих генов и не экспрессируются в нормальных тканях. Среди них следует отметить наиболее изученные опухольспецифичные ядерно-транскрипционные факторы: TLE 1 (transducin-like enhancer protein 1); TFE 3 (the specific molecular translocation der(17)t(X;17)(p11.2;q25) (basic/helix-loop-helix/leucine zipper transcription factor subfamily MiT); SOX 2, SOX 10, SOX 17 (transcriptions factors member of the sex-determining region); SALL 4 (zinc finger transcription factor); OCT 4 (POU-domain transcription factor).

TLE 1 – это опухольспецифичный ядерно-транскрипционный фактор (ген), один из четырех членов семейства генов TLE, кодирующего транскрипционные факторы, гомологичные продуктам гена *Drosophila groucho gene*. Среди функций названного гена следует отметить участие его в регуляции и контроле гемопоэза, дифференцировке нейронов на этапах эмбрионального развития. TLE 1 также играет важную роль в ре-

гуляции β -катенин зависимого сигнального пути, который играет одну из ведущих ролей в патогенезе синовиальной саркомы: серия различных ДНК-микрочиповых исследований [8] показала, что экспрессия белка TLE 1 является чувствительным и относительно высокоспецифичным маркером для синовиальной саркомы [4].

Синовиальная саркома – один из наиболее распространенных типов сарком у взрослых и составляет 6–10% из всех гистологических вариантов сарком мягких тканей. Около 70% синовиальных сарком при морфологическом исследовании характеризуются монофазным веретенклеточным строением и 30% – бифазным, при котором наряду с элементами веретенклеточного строения определяются структуры с железистым типом дифференцировки. Низкодифференцированные синовиальные саркомы, как правило, мелкокруглоклеточного строения, составляют менее 5% среди всех вариантов синовиальной саркомы и в условиях дедифференцировки могут возникнуть в любом варианте монофазной или двухфазной синовиальной опухолевой ткани. Ввиду крайне малоспецифичного иммунофенотипа нередко в практике патолога возникают трудности с проведением диагностики и дифференциальной диагностики синовиальной саркомы, особенно в случаях с низкой степенью дифференцировки опухоли. Метод FISH с целью обнаружения устойчивой опухольспецифичной транслокации t(X;18) (SS18-SSX1-2) все чаще используется для постановки окончательного диагноза синовиальной саркомы. Однако эти исследования требуют наличия хорошо сохранившегося генетического материала и пока еще недоступны для всех патоморфологических лабораторий. В связи с этим при использовании иммуногистохимической диагностики оптимальным методом морфологической верификации синовиальной саркомы является применение опухольспецифичного ядерно-транскрипционного фактора TLE 1.

Наряду с синовиальной саркомой в группе CD34-негативных сарком мягких тканей нередко возникают определенные сложности дифференциальной диагностики со злокачественной опухолью из оболочек периферических нервов (malignant peripheral nerve sheath tumors, MPNST), имеющей крайне малоспецифичный иммунофенотип. Нередко с увеличением гистологической степени злокачественности данных опухолей в них отмечается полная или частичная утрата специфических маркеров нейрональной дифференцировки (S-100, CD57, NSE). Данный гистологический вариант саркомы имеет признаки линейной нейроспецифичной дифференцировки, отражающей фенотипические свойства элементов оболочек периферических нервов. Классическая гистологическая картина злокачественной опухоли из оболочек периферических нервов представлена тесно расположенными разнонаправленными пучками, состоящими

из веретенovidных клеток с гиперхромными ядрами и нечеткими контурами цитоплазмы.

SOX 10 (member of the sex-determining region Y-related HMG-box family) – ядерно-транскрипционный фактор, участвующий в регуляции миграции клеток нервного гребня на этапах эмбриогенеза [7]. Экспрессия данного белка сохраняется в клетках с признаками глиальной, шванновской и меланоцитарной дифференцировки. Следует отметить, что сегодня SOX 10 является высокочувствительным маркером меланомы и злокачественных опухолей из оболочек периферических нервов. Его экспрессия также отмечена в карциномах молочной железы с базальным и тройным негативным нелюминальным молекулярно-биологическим подтипом рака молочной железы, для которых этот фактор имеет прогностическое значение.

В последнее время наблюдается всевозрастающий интерес к использованию ядерно-транскрипционных факторов в диагностике различных злокачественных опухолей. Особый интерес представляет использование линейно-ограниченных антител транскрипционных факторов в отношении категории опухолей из незрелых зародышевых клеток (герминогенноклеточных опухолей, germ cell tumor), в частности, таких ядерных факторов транскрипции, как: OCT 3/4, также известный как OCT 4 (POU-domain transcription factor), SALL 4 (zinc-finger transcriptional factor important for embryonic development, is mapped to chromosome 20q13), SOX 2 и SOX 17 (member's of the sex-determining region Y-related HMG-box family).

Диагностика герминогенных гонадных и экстрагонадных опухолей также нередко связана с определенными трудностями, обусловленными сложностью гистологического строения и нередко наличием элементов более одного гистологического типа. Современная панель для иммуногистохимической диагностики включает значительное число антител, которые в условиях абберантной коэкспрессии в ряде случаев, особенно при наличии нескольких компонентов в структуре герминогенной опухоли, приводят к определенным трудностям в интерпретации результатов исследования.

Использование ядерно-транскрипционных факторов позволяет оптимизировать алгоритм иммуногистохимической диагностики и количественно оценить каждый из компонентов в структуре герминогенных опухолей более одного гистологического типа. Так, OCT 3/4 – ядерно-транскрипционный фактор, играющий ключевую роль в поддержании функции плюрипотентной эмбриональной стволовой клетки, утрачивается на этапах клеточной дифференцировки. Диффузная ядерного типа экспрессия маркера OCT 3/4 отмечена в герминогенных опухолях (семинома, эмбриональный рак), которые представлены плюрипотентными

эмбриональными клетками, за исключением опухоли желточного мешка. Поэтому оптимальным в иммуногистохимической диагностике всех гистологических подтипов герминогенноклеточных опухолей является использование современного и хорошо изученного ядерно-транскрипционного фактора SALL 4. Ядерная экспрессия SALL 4 выявляется в более чем 90% герминогенноклеточных опухолей (семинозных и несеминозных), включая опухоль желточного мешка.

SOX 2 и SOX 17 – семейство SOX транскрипционных факторов осуществляет контроль дифференцировки клеток на многих этапах эмбриогенеза, таких как половая дифференцировка, нейро- и скелетогенез, и она охватывает около 20 SOX генов. Среди них SOX 2 – ядерно-транскрипционный фактор, который, согласно литературным данным, показал себя в качестве иммуногистохимического маркера при диагностике эмбрионального рака в ряду герминогенноклеточных гонадных и экстрагонадных опухолей [1].

Молекулярно-биологические исследования последних лет по изучению транскрипционного ядерного фактора SOX 17 показали его ключевую роль в канцерогенезе опухолевых клеток семиномы. Эти данные также были подтверждены результатами иммуногистохимического анализа злокачественных семинозных герминогенноклеточных опухолей (рис. 13). SOX 17 не экспрессировался в опухолевых клетках эмбрионального рака, включая «чистый» – однокомпонентный эмбриональный рак, и структурами эмбриональной карциномы в герминогенноклеточных опухолях более одного гистологического типа, а также структурах внутриканальцевого эмбрионального рака *in situ*. Также в ряде исследований отмечено выраженное иммунопозитивное окрашивание различной степени выраженности SOX 17 во всех элементах опухоли желточного мешка [6].

Таким образом, использование в рутинной практике патолога ряда новых маркеров ядерно-транскрипционных факторов позволяет оптимизировать существующие подходы иммуногистохимической диагностики злокачественных герминогенноклеточных (семинозных и несеминозных) опухолей, в т. ч. более одного гистологического типа.

TFE 3 (basic/helix-loop-helix/leucine zipper transcription factor subfamily MiT) – ядерно-транскрипционный фактор, ассоциированный со специфическим типом несбалансированной транслокации *der(17)t(X;17)(p11.2;q25)*, выявляемой в светлоклеточном варианте почечно-клеточного рака, для которого ее наличие ассоциировано с прогнозом, а также в достаточно редком гистологическом варианте саркомы мягких тканей – *alveolar soft part sarcoma*.

Alveolar soft part sarcoma относится к категории крайне редких сарком мягких тканей, на долю которой приходится около 0,5–0,9% в общей

структуре злокачественных опухолей мягких тканей. Как правило, больные – молодые пациенты широкой возрастной группы, от 15 до 35 лет. Локализация опухоли разнообразная, включающая в себя различные органы и системы (мягкие ткани конечностей, в детском возрасте – орбита, язык; реже – генитальный тракт, средостение, легкие, желудок). При микроскопическом исследовании опухоль органоидного типа строения, представленная альвеолярными и ячеистыми структурами, разделенными фиброваскулярными септами с наличием нередко в межклеточной строме воспалительного лимфоидного инфильтрата, также обнаруживаются признаки сосудистой инвазии. Опухолевые клетки с эозинофильной цитоплазмой, эпителиоидного типа с умеренно плеоморфными базофильными ядрами, в которых определяются крупные ядрышки, при использовании специальных методов окрашивания (periodic acid-Schiff-diastase) в цитоплазме опухолевых клеток выявляются кристаллические структуры. К сожалению, диагностика *alveolar soft part sarcoma* крайне трудна ввиду малоспецифичного иммунофенотипа, обусловленного абберантной коэкспрессией опухолевыми клетками самых разнообразных иммуногистохимических маркеров, включая нейрон-специфическую энолазу, виментин, α -SMA и в части случаев десмин. Таким образом, в целом иммунофенотип опухолевых клеток *alveolar soft part sarcoma* характеризуется нейрогенно-мышечным типом дифференцировки [2].

Молекулярно-биологические исследования вышеописанной саркомы позволили установить наличие несбалансированной транслокации *der(17)t(X;17)(p11.2;q25)*, коррелирующей с экспрессией ядерно-транскрипционного фактора TFE 3 в опухолевых клетках, ввиду чего при использовании морфологической верификации данного гистологического варианта опухоли в иммуногистохимическую диагностическую панель должен быть включен TFE 3.


Согласно литературным данным, несбалансированный тип транслокации *der(17)t(X;17)(p11.2;q25)*, выявляемый в части светлоклеточных вариантов почечно-клеточной карциномы у взрослых, характеризуется худшим клиническим течением заболевания и неблагоприятным прогнозом. Все вышеуказанное также может являться условием включения в панель антител, используемых для иммуногистохимической диагностики ядерно-транскрипционного фактора TFE 3 как дополнительного, прогностически значимого маркера при морфологическом исследовании светлоклеточных почечно-клеточных карцином [5].

В последние годы все большее внимание уделяется различным молекулярно-генетическим и клеточным маркерам, характеризующим фундаментальные биологические свойства опухоли. Открытие и активное использование новых маркеров (ядерно-транскрипционных факторов), определяющих линейноспецифичные и прогностически значимые био-

логические свойства опухолевой клетки, позволяет патологу на современном этапе, оптимизируя имеющиеся иммуногистохимические алгоритмы, осуществлять точную морфологическую диагностику в ряду низкодифференцированных и недифференцированных опухолей различного гистогенеза.

Список использованной литературы

1. *Adachi K., Suemori H., Yasuda S.Y., et al.* Role of SOX 2 in maintaining pluripotency of human embryonic stem cells // *Genes Cells*. 2010. Vol. 15 (5). P. 455–470.
2. *Folpe A.L., Deyrup A.T.* Alveolar soft part sarcoma: a review and update // *J. Clin. Pathol.* 2006. Vol. 59 (11). P. 1127–1132.
3. *Hornick J.L.* Novel uses of immunohistochemistry in the diagnosis and classification of soft tissue tumors // *Mod. Pathol.* 2014. Vol. 27. Suppl. 1. P. 47–63.
4. *Knösel T., Heretsch S., Altendorf-Hofmann A., et al.* TLE 1 is a robust diagnostic biomarker for synovial sarcomas and correlates with t(X;18): analysis of 319 cases // *Eur. J. Cancer*. 2010. Vol. 46 (6). P. 1170–1176.
5. *Meyer P.N., Clark J.I., Flanigan R.C., Picken M.M.* Xp11.2 translocation renal cell carcinoma with very aggressive course in five adults // *Am. J. Clin. Pathol.* 2007. Vol. 128 (1). P. 70–79.
6. *Nonaka D.* Differential expression of SOX 2 and SOX 17 in testicular germ cell tumors // *Am. J. Clin. Pathol.* 2009. Vol. 131 (5). P. 731–736.
7. *Ordóñez N.G.* Value of SOX 10 immunostaining in tumor diagnosis // *Adv. Anat. Pathol.* 2013. Vol. 20 (4). P. 275–283.
8. *Terry J., Saito T., Subramanian S., et al.* TLE 1 as a diagnostic immunohistochemical marker for synovial sarcoma emerging from gene expression profiling studies // *Am. J. Surg. Pathol.* 2007. Vol. 31 (2). P. 240–246.



Актуальные проблемы иммунопатологии ревматических заболеваний: обзор материалов школы «Современные аспекты клинической иммунологии в ревматологии»

В ФГБНУ НИИР им. В.А. Насоновой (г. Москва) 26–27 февраля 2015 г. состоялась школа «Современные аспекты клинической иммунологии в ревматологии». В ходе мероприятия с лекциями выступили ведущие специалисты института в области иммунодиагностики и лечения ревматических заболеваний. Предлагаем вниманию читателей тезисы лекций.

В лекции «Клиническая иммунология в ревматологии: от теории к практическим аспектам диагностики и терапии» академик РАН Е.Л. Насонов подчеркнул, что более 100 лет назад выдающийся немецкий ученый Пауль Эрлих сформулировал гипотезу, согласно которой гуморальный иммунный ответ против собственных клеток (*horror autotoxicus* – страх самоотравления), получивший в настоящее время название «аутоиммунитет», может быть несовместим с жизнью, приводя к необратимому поражению жизненно важных органов. По современным представлениям, аутоиммунитет – комплексный патологический процесс, в основе которого лежит нарушение толерантности и, как следствие, патологический иммунный ответ в отношении компонентов собственных тканей (аутоантигенов). В последние годы были расшифрованы многообразные нарушения иммунитета, приобретенные и/или врожденные (связанные с полиморфизмом генов, регулирующих иммунный ответ), которые реализуются на клеточном и гуморальном уровнях: тимус, кишечник, иммунные клетки периферической крови, включая Т- и В-лимфоциты, макрофаги, дендритные клетки, регуляторные Т-клетки, компоненты комплемента, цитокины и др.

Аутоиммунные заболевания (АЗ) включают более 100 нозологических форм и весьма распространены в популяции, ими страдает около 8% населения земного шара. АЗ условно подразделяются на органоспе-

цифические и органонеспецифические (системные), наиболее ярким примером которых являются воспалительные ревматические заболевания (РЗ). В процессе изучения АЗ стало очевидным, что патогенез многих из них не укладывается в рамки классических представлений о механизмах развития этой патологии, которую связывают в первую очередь с активацией приобретенного иммунитета и гиперпродукций патогенных аутоантител. Это позволило сформировать концепцию «аутовоспаления», основоположником которой является гениальный русский ученый Илья Мечников. Он впервые открыл реакции клеточного иммунитета, продемонстрировав роль макрофагов в развитии воспаления в отсутствие сывороточных факторов (аутоантител) (фагоцитарная теория иммунитета). Следует напомнить, что в 1908 г. Илья Мечников и Пауль Эрлих были удостоены Нобелевской премии за исследования в области иммунологии.

В настоящее время установлено, что развитие аутовоспалительных заболеваний связано с активацией не приобретенного (как при классических АЗ), а врожденного иммунитета. Ключевую роль в этом процессе играют Toll-подобные рецепторы (TLR) и NOD-подобные рецепторы, распознающие определенные последовательности (pattern) микроорганизмов, компонентов ядра, высвобождающихся из подвергнутых апоптозу (или НЕТозу) клеток, кристаллы мочевой кислоты, холестерина и др. Установлено, что представитель семейства NOD-подобных молекул NLRP3 является компонентом цитоплазматического комплекса (инфламасома), который регулирует активацию каспазы 1 – фермента, конвертирующего неактивные провоспалительные интерлейкины (ИЛ) (такие как про-ИЛ-1, про-ИЛ-18 и про-ИЛ-33) в активные формы.

Наряду с открытием редких моногенных аутовоспалительных заболеваний, связанных с мутациями гена NLRP3, накапливаются данные о роли аутовоспалительного процесса в развитии ряда классических АЗ человека. Полагают, что именно гиперпродукция ИЛ-1, связанная с активацией (или мутацией) NLRP3 инфламасомы, является ведущим механизмом, объединяющим аутоиммунные и аутовоспалительные заболевания. Формирование концепции о взаимосвязи между аутоиммунитетом и аутовоспалением, несомненно, является одним из крупнейших достижений биологии и медицины начала XXI в. Она положена в основу современной классификации иммуноопосредованных (иммуновоспалительных) заболеваний человека. В XXI в. ревматология относится к числу наиболее бурно развивающихся медицинских специальностей, которая эффективно адаптирует достижения и вносит вклад в прогресс мировой фундаментальной и клинической медицины.

Системные аутоиммунные ревматические заболевания (САРЗ) – гетерогенная группа иммуновоспалительных болезней человека, включающая ревматоидный артрит (РА), системную красную волчанку (СКВ), си-

стемную склеродермию (ССД), синдром Шегрена (СШ), идиопатические воспалительные миопатии (полимиозит (ПМ) / дерматомиозит (ДМ)), антифосфолипидный синдром (АФС) и системные васкулиты, ассоциированные с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами.

Актуальность проблемы САРЗ для современной медицины определяется их высокой распространенностью в популяции, трудностью их ранней диагностики, быстрым развитием инвалидности и неблагоприятным жизненным прогнозом.

к сведению

Теоретическим основанием для объединения этих заболеваний в один класс является не только сходство клинических проявлений, отражающее системное воспаление внутренних органов, но и наличие общих иммуногенетических факторов предрасположенности и патогенетических механизмов, связанных с нарушениями в системе иммунитета. Такие САРЗ, как РА и СКВ, не только наиболее тяжелые хронические заболевания человека, но и модели для изучения фундаментальных механизмов патогенеза и подходов к фармакотерапии других распространенных форм неинфекционных заболеваний, в т. ч. атеросклеротического поражения сосудов, злокачественных новообразований и др.

Изучение проблем иммунопатологии САРЗ традиционно находится в центре внимания ФГБНУ НИИР им. В.А. Насоновой и в последние годы проводится в рамках двух основных направлений научных исследований: «Инновационные технологии в диагностике и лечении ревматических заболеваний взрослых и детей» (№ 0514-2014-0002) и «Разработка концепции персонифицированной медицины на основе инновационных технологий диагностики, лечения и профилактики аутоиммунных ревматических заболеваний (№ 0514-2014-0031)», входящих в программу фундаментальных исследований государственных академий наук (2013–2020 гг.).

Для лечения САРЗ специально разработаны уникальные биотехнологические препараты (моноклональные антитела, рекомбинантные белки), подавляющие активность провоспалительных цитокинов и патологическую активацию Т- и В-клеток. К генно-инженерным биологическим препаратам (ГИБП) относят ингибиторы ФНО-а (этанерцепт, инфликсимаб, адалимумаб, голимумаб и цертолизумаб); ингибитор рецепторов интерлейкина ИЛ-6 – тоцилизумаб; анти-В клеточные препараты – ритуксимаб и белимумаб; блокатор активации Т-лимфоцитов – абатацепт и др. Наряду с ГИБП разрабатываются группы химически синтезированных пероральных противовоспалительных лекарственных препаратов нового поколения (т. н. малые молекулы), модулирующие внутриклеточную сигнализацию в иммунокомпетентных клетках (в первую очередь ингибиторы JAK киназы и SYK киназы).

Применение комплекса инновационных методов лабораторной диагностики позволяет оценить сложные молекулярные механизмы патогенеза САРЗ, что создает предпосылки для расширения возможностей ранней диагностики, оценки активности, тяжести и исходов патологического процесса и ответа на проводимое лечение в рамках концепции персонализированной («таргетной») терапии этих заболеваний [12].

Д-р мед. наук Е.Н. Александрова изложила **основные принципы иммунодиагностики РЗ**. Отмечено, что прогресс в диагностике РЗ связан с бурным развитием иммунологических и молекулярно-биологических методов исследования широкого спектра молекулярных и клеточных биомаркеров (аутоантител; острофазовых белков; цитокинов, хемокинов, факторов роста; маркеров активации сосудистого эндотелия; иммуноглобулинов, криоглобулинов; компонентов системы комплемента; субпопуляций лимфоцитов; продуктов метаболизма костной и хрящевой ткани; гормонально-метаболических показателей; генетических, эпигенетических, транскриптомных маркеров) в крови, синовиальной жидкости, моче, биоптатах синовиальной оболочки, почек и других пораженных тканей. Лабораторные тесты, применяемые в ревматологии, позволяют получить объективную информацию о наличии и характере иммунопатологических изменений у обследуемых пациентов, что является важным инструментом для ранней диагностики, оценки активности, тяжести течения, прогноза болезни и эффективности проводимой терапии.

Оптимальный выбор спектра иммунологических тестов для обследования пациентов обеспечивается стандартами лабораторной диагностики РЗ. Стандартизация методов иммунодиагностики в ревматологии включает:

- ~ анализ клинической информативности лабораторных тестов (диагностической чувствительности и специфичности, отношения правдоподобия положительных и отрицательных результатов, ROC-кривых);
- ~ расчет референтных пределов анализируемых показателей с выделением негативных, низкопозитивных, умеренно позитивных и высокопозитивных уровней;
- ~ оценку кратности определения лабораторных биомаркеров;
- ~ создание алгоритмов лабораторной диагностики;
- ~ соблюдение технологии взятия биоматериала и его доставки в лабораторию;
- ~ контроль качества лабораторных исследований;
- ~ использование современных методик и высокотехнологичного аналитического оборудования;
- ~ определение экономической эффективности лабораторных тестов.

Центральное место в лабораторной диагностике РЗ занимают тесты, связанные с обнаружением аутоантител. Основными диагностически-

ми лабораторными маркерами САРЗ являются антинуклеарные антитела (АНА), ревматоидный фактор (РФ), антитела к цитруллинированным белкам (АЦБ), антинейтрофильные цитоплазматические антитела (АН-ЦА), антифосфолипидные антитела (АФЛ). Положительные результаты определения аутоантител входят в число диагностических критериев САРЗ, используются для оценки активности и прогноза этих заболеваний, играют важную роль в диагностике РЗ на ранней стадии, позволяют идентифицировать отдельные клинико-лабораторные субтипы САРЗ, служат предикторами развития САРЗ у бессимптомных пациентов. Следует подчеркнуть, что аутоантитела, специфичные только для одного РЗ, встречаются очень редко. САРЗ характеризуются одномоментным присутствием нескольких типов аутоантител в одной сыворотке, т. н. профилем аутоантител, оценка которого существенно увеличивает диагностическую ценность определения данных биомаркеров. Разработаны стандартные профили аутоантител, составлен перечень первичных (скрининговых), вторичных (подтверждающих) и дополнительных иммунологических тестов для диагностики САРЗ. Важно подчеркнуть, что обнаружение аутоантител при отсутствии клинических признаков не является достаточным для постановки диагноза аутоиммунного заболевания, т. к. отмечено нарастание частоты выявления аутоантител у лиц пожилого возраста, на фоне приема лекарственных препаратов, при инфекциях, злокачественных новообразованиях, у здоровых родственников пациентов с аутоиммунными заболеваниями. При оценке клинического значения аутоантител также необходимо учитывать стойкость и выраженность их гиперпродукции.

Наряду с аутоантителами важными маркерами РЗ служат острофазовые показатели (СОЭ, С-реактивный белок (СРБ), сывороточный амилоидный белок А, кальпротектин, прокальцитонин, ферритин и др.), позволяющие оценить воспалительную активность заболевания, характер прогрессирования и прогноз исходов хронического воспалительного процесса, эффективность терапии. Другие лабораторные биомаркеры имеют меньшее клиническое значение для диагностики РЗ [1].

Лекция канд. биол. наук А.А. Новикова была посвящена методам иммунного анализа и роли мультиплексных технологий в лабораторной диагностике РЗ. В 1950–1960 гг. были разработаны классические методы иммунохимического анализа первого поколения (пассивная агглютинация, фиксация комплемента, иммунопреципитация, двойная иммунодиффузия, контриммуноэлектрофорез, непрямая реакция иммунофлуоресценции) для качественного и полуколичественного измерения аутоантител в сыворотке крови. В 1970–1980 гг. появились количественные методы иммунохимического анализа второго поколения (радиоиммунный анализ (РИА), иммуноферментный анализ (ИФА), иммуноблот,

иммунодот, иммунонефелометрия, иммунохемилюминесцентный анализ, иммунофлуориметрический анализ и др.). К концу XX в. автоматизация данных технологий привела к возникновению методов иммунометрического анализа третьего поколения, способствовавших стандартизации и повышению аналитической надежности лабораторных исследований.

Последнее десятилетие отмечено быстрым внедрением в лабораторную практику методов мультиплексного анализа, основанных на генетических, эпигеномных, транскриптомных и протеомных технологиях с использованием ДНК и белковых микрочипов, полимеразной цепной реакции и проточной цитометрии. Мультиплексные аналитические системы позволяют одновременно определять до 100 и более различных биомаркеров в небольшом объеме биологической жидкости (50 мкл), что наряду с резким увеличением производительности и экономической эффективности исследования значительно улучшает внутри- и межлабораторную сопоставимость полученных результатов. В ревматологии наиболее широкое распространение получили протеомные технологии мультиплексного иммунного анализа, которые наиболее полно и объективно отражают сложность и многообразие молекулярных механизмов патогенеза САРЗ. Разработаны наборы реагентов на основе планарных и суспензионных микрочипов для определения профилей аутоантител и ряда других белковых биомаркеров САРЗ. Мультиплексные диагностические платформы обладают более высокой аналитической чувствительностью по сравнению с рутинными методами иммунного анализа. Это, в частности, создает важные предпосылки для обнаружения профилей антиген-специфических антител у ранее серонегативных больных САРЗ.

Пока еще не удалось обнаружить высокоспецифичный иммунологический маркер, который выявлялся бы только при одном конкретном РЗ, поэтому в лабораторной практике начинают применяться обладающие большей клинической информативностью диагностические индексы, полученные путем многопараметрического анализа широкого спектра биомаркеров (многопараметрический диагностический индекс). В ФГБНУ НИИР им. В.А. Насоновой достигнуты существенные успехи в разработке и применении многопараметрических диагностических индексов, основанных на измерении сывороточных биомаркеров с использованием мультиплексной технологии «X-мар» у больных РА, что позволило радикально улучшить раннюю диагностику, оценку активности заболевания и прогнозирование ответа на лечение ГИБП [1, 13, 14].

В лекции **«Значение клинической иммунологии в диагностике и стратегии терапии ревматоидного артрита»** *д-р мед. наук Д.Е. Каратеев* отметил, что развитие РА сопровождается образованием большого количества аутоантител, включая РФ, АЦБ (антитела к циклическому ци-

труллинированному пептиду (АЦЦП), антитела к модифицированному цитруллинированному виментину (АМЦВ) и др.), антитела к карбамилированным белкам (анти-CarP), пептидил аргинин деминазе (РАD), энлазе, коллагену II типа, глюкозо-6-фосфат изомеразе, гликопротеину хряща 39, Ра33, иммуноглобулин-связывающему белку (ViP). Все эти антитела могут определяться при раннем РА, а многие – на доклинической стадии болезни (до развития типичной симптоматики), что важно для ранней диагностики заболевания. Иммунологические маркеры имеют немаловажное значение и для выбора терапии РА. Так, высокие уровни РФ и АЦБ в сыворотке крови ассоциируются с хорошим ответом на ритуксимаб, тоцилизумаб и абатацепт. Данные о наиболее эффективной терапии ингибиторами ФНО-α у больных РА, серонегативных по РФ и АЦБ, противоречивы и нуждаются в уточнении [11, 15].

В лекции канд. мед. наук А.С. Авдеевой «**Иммунологические эффекты современной терапии ревматоидного артрита**» обсуждались результаты собственных исследований влияния базисных противовоспалительных препаратов (БПВП), в первую очередь метотрексата и ГИБП, на иммунологические показатели у пациентов с РА.

Продемонстрирована положительная динамика уровня острофазовых показателей при использовании метотрексата как у пациентов с ранним РА, так и у больных с длительным течением заболевания. На фоне терапии ГИБП также отмечено снижение СОЭ и концентрации СРБ, наиболее выраженное при применении тоцилизумаба. Выявлено уменьшение концентрации IgM РФ в сыворотках крови больных РА, получавших метотрексат и ГИБП. Уровень АЦЦП в большинстве случаев оставался высоким на всем протяжении лечения БПВП и ГИБП. Показана важная роль IgM РФ и АМЦВ в качестве предикторов эффективного ответа на терапию ритуксимабом и тоцилизумабом. Установлено снижение уровня матриксной металлопротеиназы-3 (ММП-3) в крови при раннем РА на фоне лечения метотрексатом, а также у больных развернутым РА, получающих ритуксимаб и тоцилизумаб. Отмечена прогностическая роль ММП-3 при РА. В частности, исходная концентрация ММП-3 менее 51,3 нг/мл ассоциируется с отсутствием рентгенологического прогрессирования через 48 недель на фоне терапии тоцилизумабом. Определение уровня ММП-3 также может быть полезным для прогнозирования сохранения ремиссии / низкой активности болезни при лечении тоцилизумабом и для оценки клинической эффективности метотрексата у пациентов с ранним РА. Применение БПВП (метотрексата), а также ГИБП приводит к снижению уровня провоспалительных цитокинов, хемокинов и факторов роста в сыворотках крови больных РА.

Показано, что хороший ответ на адалимумаб к 12-й неделе лечения по критериям European League Against Rheumatism (EULAR) наблюдается

при концентрации препарата в сыворотке крови более 2,85 мкг/мл, в то время как уровень адалимумаба более 4,9 мкг/мл к 24-й неделе ассоциируется с развитием ремиссии / низкой активности заболевания к 24-й неделе терапии. В группе больных РА с низким уровнем адалимумаба в сыворотке крови к 24-й неделе терапии регистрировались более высокие показатели клинико-лабораторной активности заболевания по сравнению с пациентами с адекватной концентрацией адалимумаба. Антитела к адалимумабу выявлялись у 12% больных через 12 недель и у 10% – через 24 недели терапии адалимумабом. В группе больных с наличием антител к адалимумабу отмечено нарастание активности заболевания к 24-й неделе терапии.

Таким образом, в настоящее время выделен ряд потенциальных лабораторных биомаркеров, позволяющих осуществлять персонализированный мониторинг и прогнозирование эффективности терапии ГИБП при РА, что создает реальные предпосылки для оптимизации и снижения стоимости лечения этой группой препаратов [2–4].

В лекции *д-ра мед. наук Е.Н. Александровой* дана **характеристика механизмов развития иммуногенности ГИБП и лабораторных методов исследования данного феномена**. Показано, что ГИБП обладают потенциальной иммуногенностью – способностью индуцировать у пациента развитие нежелательного иммунного ответа с образованием антител к новым чужеродным белковым компонентам (эпитопам) данных лекарственных средств. Триггерным механизмом иммуногенности служат различия в пептидных последовательностях и трехмерной структуре у молекул ГИБП и собственных белков организма. Наиболее часто образование антител к лекарственным препаратам у больных РЗ индуцируют ингибиторы ФНО- α инфликсимаб (10–60%) и адалимумаб (1–87%), реже – голимумаб (0–7%) и цертолизумаб (5–8%), еще более редко – этанерцепт (0–5,6%). Частота выявления антител к ритуксимабу составляет 4,3–11%, абатацепту – 1,6–5,8%, тоцилизумабу – 1,6%. Иммуногенность ГИБП зависит от структуры (наличие чужеродных, негуманизированных участков молекулы ГИБП; полиморфизм пептидных последовательностей молекул терапевтических моноклональных антител, связанный с аллотипом/идиотипом иммуноглобулинов; изменения в процессе производства/упаковки/агрегации препарата и др.), способа применения (доза, кратность введения, длительность терапии), совокупности клинических факторов (характер и степень тяжести основного заболевания, сопутствующая патология, наличие инфекции, генетическая предрасположенность, дополнительная иммуносупрессивная терапия). Иммуногенность ГИБП проявляется изменением фармакокинетики и фармакодинамики с уменьшением сывороточной концентрации ГИБП до субоптимального уровня, снижением клинического ответа на проводимую терапию, развитием тяжелых инфузионных

реакций, увеличением риска тромбозомболических осложнений, аутоиммунными нарушениями.

Снижение терапевтической эффективности ГИБП при связывании с антилекарственными антителами опосредуется двумя механизмами: нейтрализацией функционально активных участков молекул ГИБП и усилением клиренса ГИБП через образование иммунных комплексов.

Установлено, что обнаружение антител к этанерцепту не оказывает значительного влияния на эффективность препарата, т. к. антитела к этанерцепту не обладают нейтрализующей активностью. Лабораторные тесты для оценки иммуногенности ингибиторов ФНО- α включают измерение сывороточной концентрации ГИБП (инфликсимаб, адалимумаб и др.) с помощью ИФА и антител к ГИБП методами bridging ИФА и антигенсвязывающего РИА.

Выявление антилекарственных антител – сложная методическая проблема. На результаты лабораторных тестов влияет образование иммунных комплексов между антилекарственными антителами и ГИБП, а также воздействие ряда сывороточных факторов (IgM РФ, естественных антител, IgG4). В доступных для использования тест-системах антитела к ГИБП обнаруживаются только при низком уровне или отсутствии ГИБП в крови, как правило, в конце интервала между приемами препарата. Поэтому в реальной клинической практике оценку иммуногенности ГИБП рекомендуется начинать с определения сывороточного уровня препарата, а измерение концентрации антилекарственных антител проводить при его выраженном снижении. При этом забор крови у пациентов для определения ГИБП и антител к ним должен проводиться строго перед очередным назначением ГИБП.

По данным метаанализа, обнаружение антител к инфликсимабу и адалимумабу у пациентов с РА, анкилозирующим спондилитом, псориатическим артритом и воспалительными заболеваниями кишечника сопровождается снижением клинического эффекта терапии данными ГИБП на 68%, а комбинированное лечение ингибиторами ФНО- α и метотрексатом или азатиоприном/меркаптопурином позволяет снизить частоту образования антилекарственных антител на 47%.

В настоящее время доказана нецелесообразность перехода на следующий ингибитор ФНО- α у больных РА с недостаточной эффективностью первого и отсутствием антител к нему, таким пациентам рекомендуется назначение ГИБП с другими механизмами действия. Предложен алгоритм оценки иммуногенности ингибиторов ФНО- α при лечении РА на основании определения уровней ГИБП и антилекарственных антител в сопоставлении с клиническим эффектом проводимой терапии для принятия решений о необходимости изменения дозы и интервалов введения препарата (интенсификация, редукция или прекращение терапии); пере-

ходе на альтернативный ингибитор ФНО α ; переключении на другой класс ГИБП. Применение данного алгоритма в реальной клинической практике позволяет более эффективно контролировать достижение хорошего ответа на терапию ГИБП и активность болезни [5].

В лекции профессора Т.М. Решетняк были представлены современные данные о **лабораторной диагностике антифосфолипидного синдрома**. АФС – клиничко-лабораторный симптомокомплекс, характеризующийся венозными и/или артериальными тромбозами, акушерской патологией, тромбоцитопенией и гиперпродукцией антифосфолипидных антител (АФЛ). АФЛ – гетерогенная популяция аутоантител, распознающих антигенные детерминанты анионных и нейтральных фосфолипидов и комплексные эпитопы, образующиеся в процессе взаимодействия фосфолипидов и фосфолипидсвязывающих белков плазмы крови. АФЛ являются серологическим маркером АФС и фактором риска развития тромботических осложнений и акушерской патологии при данном заболевании.

В число лабораторных диагностических критериев АФС входят положительные результаты обнаружения антител к кардиолипину (АКЛ) классов IgG/IgM, антител к β 2-гликопротеину I ($\alpha\beta$ 2-ГП I) классов IgG / IgM и волчаночного антикоагулянта (ВА). АФЛ должны определяться в двух и более исследованиях с интервалом не менее двух недель. IgG/IgM АКЛ должны определяться в сыворотке в титрах, превышающих 40 GPL/MPL (или 99-й перцентиль у здоровых доноров), в двух и более исследованиях с интервалом не менее 12 недель с помощью стандартного ИФА, позволяющего выявлять β 2-ГП I-зависимые АКЛ. IgG/IgM $\alpha\beta$ 2-ГП I должны определяться в сыворотке с помощью стандартного ИФА в диагностических титрах, превышающих 99-й перцентиль у здоровых доноров, в двух и более исследованиях с интервалом не менее 12 недель. ВА должен определяться в плазме в двух и более исследованиях с интервалом не менее 12 недель в фосфолипидзависимых коагуляционных тестах стандартным методом, включающим несколько этапов.

Диагноз АФС не может быть установлен, если промежуток между выявлением АФЛ и клиническими признаками заболевания составляет менее 12 недель и более 5 лет. Для постановки диагноза АФС достаточно одного из трех лабораторных критериев (ВА, АКЛ или $\alpha\beta$ 2-ГП I), в то же время наличие у больного нескольких лабораторных критериев АФС указывает на значительное увеличение риска тромботических осложнений. Наряду с этим вероятность тромбозов возрастает при наличии у пациентов высокопозитивных уровней АФЛ, а также IgG АКЛ и IgG $\alpha\beta$ 2-ГП I. При использовании в качестве диагностических критериев АФС, положительные результаты определения IgG АКЛ и IgM АКЛ имеют умеренную чувствительность, но низкую специфичность. ВА и IgG/IgM $\alpha\beta$ 2-ГП I являются более специфичными, но менее чувствительными диагности-

ческими маркерами АФС по сравнению с IgG/IgM АКЛ. В качестве дополнительных лабораторных маркеров АФС предлагается использовать: антитела к 1 домену $\beta 2$ -ГП I; IgA антитела к кардиолипину и $\beta 2$ -GPI; антитела к протромбину/фосфатидилсерину (тесно коррелируют с обнаружением ВА, полезно исследовать для диагностики и мониторинга АФС на фоне антикоагулянтной терапии) [17].

Д-р мед. наук Е.Н. Александрова выступила с лекцией **«Роль антинуклеарных антител в диагностике и прогнозировании эффективности терапии ГИБП при системных аутоиммунных ревматических заболеваниях»**. Антинуклеарные антитела (АНА) – гетерогенная группа аутоантител, реагирующих с различными компонентами ядра и цитоплазмы. Семейство АНА включает антитела к ДНК, гистонам, нуклеосомам, экстрагируемым ядерным антигенам (Sm, U1RNP, Ro/SSA, La/SSB, Scl-70, Jo-1), ядрышковым антигенам, центромерам и другим клеточным структурам. АНА относятся к числу основных диагностических лабораторных маркеров САРЗ. Положительные результаты определения АНА входят в число диагностических критериев СКВ, ССД, СШ, ПМ/ДМ, смешанного заболевания соединительной ткани, лекарственной волчанки, аутоиммунного гепатита; применяются для оценки активности и прогноза САРЗ; позволяют идентифицировать отдельные клинико-лабораторные субтипы СКВ, ССД, ДМ/ПМ и др. САРЗ; служат предикторами развития аутоиммунных РЗ на доклинической стадии.

Особое внимание в последние годы уделяется методическим аспектам определения АНА. Согласно рекомендациям American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism (ACR и EULAR), «золотым стандартом» и первичным скрининговым методом определения АНА в сыворотке крови является НРИФ с использованием в качестве субстрата клеток линии HEp-2 (НРИФ-HEp-2). При двухэтапной стратегии иммунодиагностики САРЗ пациентам с положительными результатами обнаружения АНА методом НРИФ-HEp-2 рекомендуется проведение подтверждающих тестов для выявления специфических антител к отдельным ядерным антигенам (дсДНК, экстрагируемым ядерным антигенам) с помощью ИФА, иммуноблота и др. технологий. Некоторые типы АНА (антитела к центромерам, PCNA, митотическому аппарату клетки, комплексу Гольджи) хорошо обнаруживаются методом НРИФ на HEp-2 клетках, что исключает необходимость их дальнейшего исследования с помощью подтверждающих тестов. Выбор спектра подтверждающих тестов при определении аутоантигенспецифических АНА зависит от типа ядерного/цитоплазматического свечения, титров АНА в НРИФ-HEp-2 и совокупности клинических факторов. Некоторые разновидности антител к экстрагируемым ядерным антигенам, в частности антитела к SS-A/Ro, рибосомальному белку Р и Jo-1, могут не выявляться методом НРИФ-

HEp-2. При отрицательных результатах определения антител к SS-A/Ro, рибосомальному белку Р и Jo-1 в НРИФ-HEp-2, но высокой вероятности наличия у больного СКВ, СШ, неонатальной волчанки, врожденной поперечной блокады сердца или ПМ/ДМ следует использовать альтернативные методы идентификации данных аутоантител (ИФА, иммуноблот и др.).

В последние годы широкое распространение получили скрининговые методы определения АНА на основе ИФА и мультиплексных технологий. По мнению экспертов EULAR и ACR, новые методы иммунного анализа не могут заменить первичный скрининг АНА с помощью НРИФ-HEp-2, т. к. идентифицируют антитела к ограниченному количеству очищенных/рекомбинантных ядерных антител, что приводит к увеличению числа ложноотрицательных результатов до 35%. Лаборатории, проводящие скрининговое определение АНА с использованием ИФА, иммуноблота, мультиплексных диагностических систем, должны предоставить данные о такой же или более высокой чувствительности и специфичности этих методов по сравнению с НРИФ-HEp-2. Автоматизированные системы интерпретации клеточных флуоресцентных тестов способствуют стандартизации и повышению эффективности определения АНА и др. аутоантител методом НРИФ.

Продемонстрировано влияние анти-В-клеточной терапии ритуксимабом и белимумабом на уровень АНА в сыворотках больных САРЗ. Показано, что через 3–6–12 месяцев после курса лечения ритуксимабом у больных СКВ наблюдается уменьшение сывороточной концентрации антител к дсДНК, нуклеосомам, кардиолипину и С1q. Достоверного снижения уровня антител к Ro/SS-A, La/SS-B, РНП, гистонам и Sm на фоне терапии ритуксимабом не выявлено. Увеличение концентрации антител к дсДНК, нуклеосомам, экстрагируемым ядерным антигенам и С1q, как правило, предшествует обострению СКВ при лечении ритуксимабом. Белимумаб снижает уровень АНА в крови, при этом препарат более эффективен, чем стандартная терапия, у пациентов с высокой серологической активностью заболевания (увеличением концентрации адсДНК и снижением концентрации компонентов комплемента).

Таким образом, исследование АНА может быть полезным для мониторинга и прогнозирования эффективности терапии ГИБП [1, 2].

Д-р мед. наук, проф. Л.П. Ананьева в лекции «**Клиническое значение склеродермических аутоантител**» отметила, что склеродермические антитела, отличающиеся высокой диагностической специфичностью при ССД (90–99%), направлены против «эксклюзивного» набора аутоантигенов – растворимых ядерных белков (10–15 мишеней). Частота выявления АНА в НРИФ-HEp-2 составляет 87–95%. В настоящее время выделяют семь разновидностей антиген-специфических АНА, характерных для ССД: анти-

центромерные антитела (20–30%), антитела к топоизомеразе I или Scl-70 (15–20%), РНК полимеразе III (2–15%), РМ-Scl (3%), Th/To (2–5%), Ku (1–10%) и рибонуклеопротейну (8%). Частота выявления АНА при ССД зависит от географического региона, особенностей окружающей среды, генетического фона. Каждое из аутоантител в отдельности обнаруживается у небольшой (1–30%) группы больных с определенной клинической картиной, характером течения ССД, прогнозом и имеет четкие генетические ассоциации. Каждый больной ССД является носителем одного (редко больше) типа аутоантител, который не меняется в процессе развития заболевания.

Новые классификационные критерии ССД 2013 года наряду с клиническими и инструментальными параметрами включают иммунологические показатели – три специфических аутоантитела: антицентромерные антитела, антитела к топоизомеразе I (Scl-70) и антитела к РНК полимеразе III. Антитела к топоизомеразе I ассоциируются с интерстициальным поражением легких, антицентромерные антитела – с легочной артериальной гипертензией, а антитела к РНК полимеразе III – со склеродермической почкой. Выявление склеродермических антител дает возможность уже на раннем этапе заболевания разработать необходимый комплекс обследования и адекватную тактику лечения. Известно, что в дебюте ССД может проявляться маломанифестно – в виде изолированного синдрома Рейно или отека кистей (иногда проходящего) без нарушения общего состояния. Эти клинические синдромы часто встречаются в популяции (до 10%), но их принадлежность к ССД постулируется только при обнаружении антинуклеарного фактора и антигенспецифичных склеродермических антител [6].

Д-р мед. наук, проф. С.Г. Раденска-Лоповок представила доклад «**Иммуноморфологическая характеристика синовиальной оболочки при ревматических заболеваниях**». Повышенная инфильтрация Т- и В-клетками значительно отличает ревматоидный синовит от синовитов при других заболеваниях. Ревматоидный синовит характеризуется выраженными пролиферативными и воспалительными изменениями с формированием фолликулоподобных структур. Учитывая наличие CD22L+ и CD20+ клеток в центре фолликулоподобных структур, их образование можно расценивать как проявление эктопического лимфоидного неогенеза. Важно отметить, что лимфонеогенез не ассоциируется с выраженностью эрозивного процесса в суставах или развитием ревматоидных узелков, а рассматривается как вторая и третья степени воспалительной инфильтрации при РА. Значительное место в морфогенезе ревматоидного синовита занимают макрофаги, экспрессирующие CD68, которые синтезируют различные провоспалительные цитокины и металлопротеиназы в полости сустава. Провоспалительные цитокины стимулируют продукцию гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора стромальными клетками. Среди кроющих синовиоцитов име-

ются фибробластоподобные клетки, секретирующие матриксные металлопротеиназы и провоспалительные цитокины, поддерживая тем самым дальнейшее развитие патологического процесса. В составе инфильтрата при ревматоидном синовите обнаруживаются также антиген-презентирующие дендритные клетки.

Синовит при **анкилозирующем спондилоартрите** (АС) имеет иную природу. Воспалительный инфильтрат содержит значительно меньше CD4+ и CD20+ лимфоцитов, чем при РА. Обнаруживаются особые макрофаги (M2-CD163+) и лейкоциты. Типичным морфологическим признаком синовита при АС является гиперваскуляризация с образованием извилистых сосудов.

В развитии синовита при **остеоартрозе** ведущим фактором служит биомеханика. Травматические воздействия приводят к синтезу повреждающих молекул, которые посредством сигнальных распознающих рецепторов на синовиальных макрофагах, фибробластоподобных клетках или хондроцитах индуцируют местный синтез провоспалительных медиаторов. Ангиогенез, индуцированный воспалением, и повышенная сосудистая проницаемость приводят к инфильтрации плазменными белками, работающими как повреждающие молекулы.

Таким образом, воспаление в синовиальной оболочке при РА, АС и остеоартрозе характеризуется различными звеньями морфогенеза, что доказывается экспрессией различных клеточных маркеров [16].

В лекции канд. мед. наук И.А. Гусевой «**Клиническая иммуногенетика ревматических заболеваний**» было отмечено, что идентификация генетических факторов, ассоциированных и/или сцепленных с заболеванием, является одной из важнейших проблем современной молекулярной биологии и медицины, в частности ревматологии. Актуальность таких исследований определяется тем, что РЗ входят в большую группу мультифакториальных болезней, клинический фенотип которых чрезвычайно полиморфен и является результатом взаимодействия полигенной составляющей и факторов внешней среды.

Ассоциация генетических маркеров (полиморфизмов) с заболеванием считается доказанной, если:

- ~ в полногеномных ассоциативных исследованиях (GWAS) на материале тысяч пациентов и лиц контрольной группы достоверность различий очень высока ($p \leq 5 \times 10^{-8}$);
- ~ ассоциация реплицирована в других независимых исследованиях на материале сотен пациентов и лиц контрольной группы при уровне достоверности различий $p < 0,05$;
- ~ ассоциированный ген является экспрессирующим или локализован в регуляторном сайте ДНК;
- ~ известна функция продуктов гена.

Наиболее сильные ассоциативные связи при P3 выявлены с главным комплексом гистосовместимости (Major Histocompatibility Complex), у человека эта система чаще обозначается как антигены тканевой совместимости (Human Leukocyte Antigens, HLA). Важным маркером AC, особенно аксиального спондилоартрита, служит ген HLA-B*27, который вносит существенный вклад в патогенез заболевания. Антиген HLA-B5 (серологически определяемый субтип B51 или аллель B*5101) ассоциирован с предрасположенностью к развитию болезни Бехчета. В России тестирование субтипа HLA-B51 актуально для верификации диагноза болезни Бехчета у жителей Южного и Северного Кавказа. Антигены HLA-B13, 16 (38), 17 (57) 27, Cw6 часто выявляются у больных с псориатическим артритом. Аллели *01, *0401*0404, *0405, *0408, *10 локуса HLA-DRB1-SE (SE – Shared Epitope, общий, схожий эпитоп) имеют выраженную ассоциативную взаимосвязь с предрасположенностью к развитию РА, особенно с продукцией аутоантител (АЦЦП) и прогрессированием эрозивного поражения суставов. Самые высокие уровни АЦЦП и прогрессирование эрозирования уже в первый год наблюдения регистрируются у носителей двойной дозы SE (например *01/*0401, *0401/*0401 и т. д.). Ассоциация ССД с аллелем HLA-DRB1*05 (*11) в значительной мере обусловлена взаимосвязью данного маркера с продукцией антител к Scl-70 и антицентромерных антител. При СКВ аллель HLA-DRB1*03 ассоциирован с продукцией анти-Ro и анти-La аутоантител. Отмечена необходимость тестирования полиморфизмов генов CYP2C9, VCORC1, а также PROC при назначении варфарина [10].

Д-р мед. наук Е.Н. Галушко представила **клинико-лабораторную характеристику анемии при ревматических заболеваниях**. Анемия – одно из наиболее частых гематологических нарушений у больных РА, ее частота колеблется от 30 до 70%, а на первом году заболевания составляет 25%. Анемия при РА классифицируется как анемия хронического заболевания (АХЗ) (анемия воспаления, цитокин-индуцированная анемия). Патогенез АХЗ мультифакторный, в его основе лежит иммуноопосредованный механизм: цитокины и клетки ретикуло-эндотелиальной системы вызывают изменения в гомеостазе железа, пролиферации эритроидных предшественников, продукции эритропоэтина и продолжительности жизни эритроцитов. Доказано, что при АХЗ происходит обратное поступление железа из эритроидных клеток в костномозговые макрофаги, т. е. развивается феномен «нарушения утилизации железа». В течение последних лет широко обсуждается роль гепсидина как ключевого регулятора метаболизма железа. Биосинтез гепатоцитами острофазных белков (в т. ч. гепсидина) регулируется всей группой провоспалительных цитокинов, но ИЛ-6 отводится особая роль гепатоцит-активирующего фактора, релирующего гемопоэз. При воспалении концентрация ИЛ-6 в крови резко воз-

растает, что приводит к увеличению продукции гепсидина гепатоцитами. Гепсидин, в свою очередь, блокирует выход Fe из макрофагов и абсорбцию Fe в кишечнике, индуцируя развитие гипоферремии и в дальнейшем анемии. Определение сывороточного гепсидина может применяться для дифференциальной диагностики характера анемического синдрома у больных РА. Это имеет важное практическое значение: некорректная трактовка состояния пациента с АХЗ как имеющего дефицит железа влечет за собой неэффективную терапию железом с риском развития осложнений [8].

В лекции канд. мед. наук Л.В. Кондратьевой «**Адипоцитокينات и метаболические маркеры при ревматоидном артрите**» отмечено, что жировые клетки способны продуцировать большое число адипоцитокиннов (АЦК), из которых наиболее изучены лептин, адипонектин, висфатин и резистин. АЦК обладают разнообразными функциями и свойствами. Лептин ассоциируется с развитием метаболического синдрома, инсулинорезистентности, сахарного диабета 2-го типа, сердечно-сосудистых осложнений. Как правило, при этих состояниях отмечается также увеличение уровня висфатина и резистина и снижение концентрации адипонектина. АЦК влияют не только на адипоциты и эндотелий, но и на клетки иммунной системы (макрофаги, моноциты, нейтрофилы и лимфоциты), фибробласты синовиальной оболочки, хондроциты, остеобласты и остеокласты. Лептин, висфатин, резистин имеют провоспалительные свойства, их концентрации коррелируют с уровнями провоспалительных цитокинов (ФНО- α , ИЛ-1, ИЛ-6). Адипонектину приписывалось противовоспалительное действие. Однако результаты, полученные у пациентов с ожирением и сердечно-сосудистыми заболеваниями, а также в культурах клеток, не полностью подтвердились. В большинстве исследований при РА обнаружено увеличение концентрации адипонектина в сыворотке крови и синовиальной жидкости и его взаимосвязь с рентгенологическим прогрессированием заболевания. Сходные данные были получены в отношении висфатина. Лептин при РА, как и в общей популяции, прежде всего отражает наличие метаболических нарушений, он коррелирует с объемом талии, индексом массы тела пациента, инсулинорезистентностью. Важным маркером инсулинорезистентности является отношение лептин/адипонектин, изменения которого могут опережать динамику расчетного индекса НОМА-IR, учитывающего уровни глюкозы и инсулина. Интересно, что зависимости толщины комплекса интима-медиа сонных артерий и кальциноза коронарных артерий от уровней каких-либо АЦК при РА не выявлено. В ряде работ наблюдалась прямая корреляция между уровнями лептина, резистина, висфатина в крови и клинико-лабораторными показателями активности заболевания (СОЭ, СРБ, DAS28). Данные о влиянии

противовоспалительной терапии на уровне АЦК при РА нуждаются в уточнении [9].

Лекция *д-ра мед. наук, проф. Б.С. Белова* была посвящена **проблеме инфекций и вакцинации в ревматологии**. Актуальность данной темы обусловлена повышенным риском развития коморбидных инфекций вследствие как фонового РЗ, так и необходимости применения препаратов с иммуносупрессивным действием. Показано нарастание частоты коморбидных инфекций при лечении всеми ГИБП, зарегистрированными в России. Пневмония занимала первое место в структуре коморбидных инфекций во всех исследованиях. Проанализированы многочисленные литературные данные и подробно освещены рекомендации EULAR, посвященные вакцинации при РЗ. Вакцинация против гриппа и пневмококковой инфекции показана всем больным САРЗ, поскольку среди них риск летальных исходов от инфекций нижних дыхательных путей достаточно высок.

Представлены результаты выполняемого в ФГБНУ НИИР им. В.А. Насоновой исследования, посвященного изучению эффективности и безопасности 23-валентной полисахаридной пневмококковой вакцины «Пневмо-23» у больных РА. В течение однолетнего периода наблюдения клинических и рентгенологических симптомов пневмонии не наблюдали ни в одном случае. Титры антител к групповому пневмококковому антигену за период наблюдения были повышены более чем в 2 раза по сравнению с исходным уровнем как в группе больных РА в целом, так и в подгруппах с различными схемами терапии. Хорошая переносимость вакцины отмечена у 68% больных. Поствакцинальные реакции (боль, припухлость и гиперемия кожи в месте инъекции вакцины), наблюдавшиеся в 32% случаев, были кратковременными, полностью обратимыми и не требовали применения противодействующих мер. Развития каких-либо аутоиммунных реакций или эпизодов обострения РА не наблюдали. Наши результаты свидетельствуют о достаточной клинической эффективности, иммуногенности и хорошей переносимости указанной вакцины у больных РА. Несомненно, данное исследование нуждается в продолжении с целью оценки отдаленных результатов вакцинации при РА [7].

Таким образом, в рамках школы обсуждался широкий круг тем, касающихся актуальных вопросов генетики, патогенеза, иммуноморфологии, лабораторной диагностики, клиники и лечения иммуновоспалительных РЗ и коморбидной патологии (инфекций, анемии, кардиоваскулярных и метаболических нарушений). Проведение подобного рода школ имеет важное практическое значение для обучения специалистов высокотехнологичным методам иммунодиагностики и лечения РЗ.

Список использованной литературы

1. Александрова Е.Н., Новиков А.А., Насонов Е.Л. Актуальные вопросы лабораторной диагностики системных аутоиммунных ревматических заболеваний // *Лаборатория*. 2014. № 4. С. 3–9.

2. Александрова Е.Н., Новиков А.А., Насонов Е.Л. Роль лабораторных биомаркеров в мониторинге и прогнозировании эффективности терапии ревматических заболеваний генно-инженерными биологическими препаратами // *Современная ревматология*. 2014. № 1. С. 5–13.

3. Авдеева А.С., Александрова Е.Н., Насонов Е.Л. Клиническое значение матриксных металлопротеиназ при ревматоидном артрите (обзор литературы и собственные данные) // *Научно-практическая ревматология*. 2014. № 1. С. 79–84.

4. Авдеева А.С., Александрова Е.Н., Каратеев Д.Е. и др. Эффективность адалимумаба при раннем ревматоидном артрите в зависимости от уровня препарата в сыворотке крови и наличия антилекарственных антител // *Научно-практическая ревматология*. 2014. № 6. С. 624–630

5. Александрова Е.Н. Иммуногенность генно-инженерных биологических препаратов при ревматоидном артрите // *Генно-инженерные биологические препараты в лечении ревматоидного артрита*. / Под ред. Е.Л. Насонова. М.: Има-Пресс, 2013. С. 317–331.

6. Ананьева Л.П. Новые классификационные критерии системной склеродермии // *Научно-практическая ревматология*. 2013. № 5. С. 539–544.

7. Белов Б.С. Терапия генно-инженерными биологическими препаратами и инфекции у больных ревматоидным артритом: актуальность и перспективы // *Научно-практическая ревматология*. 2014. № 3. С. 322–330.

8. Галушко Е.А., Беленький Д.А., Александрова Е.Н., Кашикова Л.Н. Роль гепсидина в развитии анемии у больных ревматоидным артритом // *Научно-практическая ревматология*. 2012. № 3. С. 19–24.

9. Горбунова Ю.Н., Попкова Т.В., Кондратьева Л.С. и др. Метаболический синдром при ревматоидном артрите: роль адипонектина (предварительные результаты) // *Научно-практическая ревматология*. 2013. № 4. С. 391–395.

10. Гусева И.А., Насонов Е.Л. Генетика ревматоидного артрита // *Генно-инженерные биологические препараты в лечении ревматоидного артрита*. / Под ред. Е.Л. Насонова. М.: Има-Пресс, 2013. С. 47–64.

11. Каратеев Д.Е., Лучихина Е.Л., Демидова Н.В. и др. Первое российское стратегическое исследование фармакотерапии ревматоидного артрита (РЕМАРКА): результаты лечения 130 больных в течение 12 месяцев // *Научно-практическая ревматология*. 2014. № 6. С. 607–614.

12. Насонов Е.Л., Александрова Е.Н., Новиков А.А. Аутоиммунные ревматические заболевания – проблемы иммунопатологии и персонализированной терапии // Вестник РАМН. 2015. № 2. С. 169–182.

13. Новиков А.А., Александрова Е.Н., Насонов Е.Л. Протеомные исследования в ревматологии // Научно-практическая ревматология. 2012. № 6. С. 56–62.

14. Новиков А.А., Александрова Е.Н., Герасимов А.Н. Многопараметрический анализ биомаркеров в лабораторной диагностике раннего ревматоидного артрита // Научно-практическая ревматология. 2013. № 2. С. 111–116.

15. Новиков А.А., Александрова Е.Н., Черкасова М.В., Насонов Е.Л. Современные методы лабораторной диагностики ревматоидного артрита // Научно-практическая ревматология. 2010. № 1. С. 31–45.

16. Раденска-Лоповок С.Г. Ревматические заболевания. Морфологическая диагностика / Под ред. Г.А. Франк, Р.М. Балабановой. М.: Практическая медицина. 2014. 95 с.

17. Решетняк Т.М. Антифосфолипидный синдром: современное состояние и задачи на будущее // Научно-практическая ревматология. 2013. № 1. С. 11–14.



ОБМЕН ОПЫТОМ

HTSA – современная методика количественного определения фекальных биомаркеров в диагностике заболеваний кишечника

Т.И. Долгих

*заведующая централизованной
лабораторией,*

С.Б. Галилейская

*врач клинической лабораторной
диагностики*

*Централизованная лаборатория бюджетного
учреждения здравоохранения Омской области
«Клинический диагностический центр»,*

А.М. Иванов

*д-р мед. наук, зав. каф. клинической биохимии
и лабораторной диагностики*

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

Е.А. Лялюкова

доцент каф. семейной медицины ПДО

*Государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Омская государственная медицинская академия»
Минздрава России*

В статье представлены данные о раннем выявлении рака кишечника на основе одновременного количественного определения уровня фекальных биомаркеров – гемоглобина и трансферрина методом HTSA (hemoglobin transferrin simultaneous assay). Новый диагностический тест, имеющий высокую чувствительность и специфич-

ность, значительно повышает эффективность обследования, направленного на выявление патологии желудочно-кишечного тракта и ранней формы рака кишечника (I–II стадия), что позволяет использовать его в программе диспансеризации при исследовании кала на скрытую кровь иммунохимическим методом.

В последние годы продолжается поиск лабораторных биомаркеров, позволяющих обеспечить раннее выявление патологий кишечника. Различные воздействия на кишечник могут способствовать повышению проницаемости слизистой оболочки, развитию воспаления и образованию язв. Такие клинические проявления, как абдоминальная боль, изменение консистенции и частоты стула, метеоризм, встречаются при многих заболеваниях (дивертикулярная болезнь, синдром раздраженного кишечника, аденома, рак, микроскопический колит, антибиотико-ассоциированная диарея и др.), что затрудняет постановку диагноза и приводит к несвоевременному оказанию медицинской помощи. При наличии сходных симптомов у пациентов с органическими или функциональными (синдром раздраженной кишки) заболеваниями органов брюшной полости нередко назначаются дорогостоящие, болезненные инвазивные процедуры [3, 4, 12].

Рациональный подход к диагностике может базироваться на вспомогательном использовании неинвазивных тестов, таких как определение концентрации фекального трансферрина и гемоглобина. В случае положительных результатов пациентам назначается дополнительное обследование (колоноскопия).

Одной из важных проблем современной медицины является диагностика онкологических заболеваний. Особую трудность представляет выявление рака кишечника на ранних стадиях [1, 3, 4, 7, 10]. В 2014 г. в России было выявлено 61 874 новых случая колоректального рака (КРР): 35 089 случаев рака ободочной кишки и 26 785 случаев рака прямой кишки [6]. В структуре онкологической заболеваемости рак толстой кишки занимает пятое место у мужчин (после рака легкого, желудка, кожи и предстательной железы) и четвертое – у женщин (после рака груди, кожи и желудка), а в качестве причины смерти – второе место у женщин (после рака груди) и третье место у мужчин (после рака легких и желудка).

Важную роль в развитии предраковых состояний и рака кишечника играет воспаление стенки кишки инфекционного и аутоиммунного характера, в т. ч. болезнь Крона [4, 9, 18, 19]. Наряду с этим в настоящее время изучены генетические предикторы и механизмы развития заболевания [14, 16], в т. ч. ассоциированные с канцерогенным действием

бактериальных токсинов [6, 8, 11]. Помимо метаболических нарушений, способствующих канцерогенезу, и модулирования иммунного ответа, многие бактерии продуцируют токсины, обладающие канцерогенным действием путем влияния на межклеточные взаимодействия, внутриклеточную передачу сигнала или индуцирование мутаций и эпигенетических изменений [11, 14]. Таким образом, бактериальные токсины могут функционировать и как иницирующие, и как развивающие агенты [11]. Например, способностью вырабатывать токсины с канцерогенным действием обладают некоторые штаммы *Escherichia coli*, поскольку синтезируемый ими колибактин вызывает двуспиральные разрывы в ДНК, что приводит к онкогенным мутациям [11]. Другие штаммы *E. coli* продуцируют цитотоксический некротизирующий фактор 1, активирующий белки семейства Rho, которые характеризуются ГТФ-азной активностью и являются ключевыми для регуляции многих витальных процессов (пролиферации, выживания, апоптоза, ангиогенеза и др.).

Выявление патологии верхнего отдела толстого кишечника, в т. ч. рака ободочной кишки, представляет сложность для клинициста. Японские специалисты [13, 17] доказали, что о поражении верхних отделов толстого кишечника свидетельствует повышенный уровень фекального трансферрина, который попадает в просвет кишечника при повреждении слизистой оболочки кишки и сохраняется в кале более длительное время, чем гемоглобин.

Учитывая бессимптомное развитие рака кишечника на ранних стадиях, наличие предикторов процесса, в т. ч. воспалительный процесс, а также возможность малигнизации участков поражения слизистой оболочки кишечника при аутоиммунной патологии, обследованию с целью выявления предраковых состояний и рака желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) подлежат различные группы взрослого населения. Проведенная совместно с гастроэнтерологами научно-практическая работа [2] показала высокую эффективность рационального подхода к диагностике патологии ЖКТ.

В России проводятся эпидемиологические исследования для оценки распространенности КРР. Результаты таких исследований, выполненных в Кемеровской области (1995–2012 гг.), выявили тенденцию стабильного роста заболеваемости злокачественными опухолями ободочной и прямой кишки [4, 5]. При этом отмечена высокая заболеваемость и смертность от КРР: уровень заболеваемости составил 38,97 на 1 тыс. населения.

Широко используемый в России тест на скрытую кровь, на результат которого влияет соблюдение пациентом диеты и прием ряда препаратов, не обладает необходимой диагностической чувствительностью. По данным за 2012 г., в Кемеровской области при проведении профи-

лактических осмотров с использованием теста на скрытую кровь выявляемость КРР составила 4,48% от общего числа зарегистрированных больных КРР. Обращает на себя внимание низкая выявляемость больных с III и IV стадиями заболевания – 60,63% [4].

Приведенные данные свидетельствуют о необходимости поиска новых подходов к выявлению онкологических заболеваний кишечника. Последние исследования указывают на то, что в качестве потенциального биомаркера рака и предраковых поражений кишечника может рассматриваться фекальный трансферрин. Комбинация количественного определения фекального трансферрина и гемоглобина имеет самый высокий в настоящее время уровень диагностической чувствительности: 96% у пациентов с раком кишечника и 88% у пациентов с предраковыми состояниями [17]. При скрининге пациентов с низким риском развития КРР данное комплексное исследование позволило установить наличие опухолевого процесса в 30% случаев, что предопределило успешное использование в практике двух маркеров для скрининга КРР.

Количественное определение иммунохимическими методами гемоглобина и трансферрина в кале дает прогноз о вероятности, стадии и локализации КРР [13].

внимание!

В рамках государственной программы «Развитие здравоохранения в Российской Федерации» в соответствии с приказом Минздрава России от 03.02.2015 № 36-ан «Об утверждении порядка диспансеризации определенных групп взрослого населения» в перечень исследований внесено исследование кала на скрытую кровь иммунохимическим методом.

В последние годы в ряде регионов России (Омская область, Ханты-Мансийский автономный округ – Югра, г. Дубна Московской обл. и др.) обследование населения для выявления КРР проводится иммунохимическим методом на основе технологии iFOBТ/FIT. Значительным преимуществом данного метода является то, что обследование пациентов может проводиться без изменения обычного режима питания (не требуется специальная диета) и без ограничения в приеме лекарственных препаратов и витаминов (витамина С). Одновременное определение концентрации фекального гемоглобина и трансферрина все шире внедряется в практику российского здравоохранения. Это значительно улучшает диагностику, чувствительность методики значительно повышается за счет комбинации данных тестов [2, 17].

HTSA* позволяет в кратчайшие сроки выявить (или исключить) наличие лабораторных признаков повреждения слизистой оболочки

* HTSA (hemoglobin transferrin simultaneous assay) – метод одновременного количественного определения уровня фекального гемоглобина и трансферрина.

кишечника, а также уровень и глубину повреждения. Установлено, что повышенный уровень фекального трансферрина свидетельствует о преимущественном поражении верхних отделов, а фекального гемоглобина – нижних отделов кишечника. Высокие значения обоих показателей позволяют сделать заключение об обширном процессе. Чем выше показатель, тем больше глубина либо зона поражения [17].

Опыт врачей Клинического диагностического центра показал целесообразность использования двухдневного варианта HTSA с учетом того факта, что в случае повреждения слизистой оболочки кишечника включаются механизмы защиты (ограничение очага поражения), и это может привести к уменьшению концентрации биомаркера. При использовании двухдневного варианта изменения показателей установлены дополнительно у 42,9% пациентов (в отличие от однодневного варианта). В случае подозрения на скрытое кровотечение из верхних либо нижних отделов кишечника или при скрининге КРР следует определять оба параметра (важное значение имеет концентрация аналита, особенно для наблюдения в динамике и оценки эффективности лечения).

Расширение возможностей лаборатории за счет внедрения HTSA позволяет:

- ~ повысить выявляемость воспалительных заболеваний, предраковых состояний и КРР на ранних стадиях с последующей, вполне обоснованной, колоноскопией;
- ~ провести дифференциальный диагноз между синдромом раздраженной кишки и органическим поражением стенки кишки;
- ~ снизить количество необоснованно назначенных колоноскопий;
- ~ сформировать группы риска по развитию КРР и эффективно осуществлять мониторинг;
- ~ своевременно проводить адекватные лечебные мероприятия.

Автоматизированный метод позволяет вести статистику, регистрируя результаты скрининга, и, соответственно, оценить его эффективность и истинную ситуацию с распространенностью данного вида новообразований среди населения региона.

Учитывая тот факт, что бактериальные токсины выступают в качестве иницирующих и стимулирующих факторов развития предраковых состояний и рака кишечника [11], мы полагаем, что особую группу наблюдения должны составить пациенты с перенесенной кишечной инфекцией, особенно сопровождавшейся гемоколитом.

Необходимо особо отметить целесообразность использования данного теста в педиатрии. При обследовании детей в возрасте от 1 года до 15 лет через 3–4 недели после завершения стандартной терапии кишечных инфекций (стафилококковая инфекция, ротавирусная инфекция, эшерихиоз, дизентерия) установлено, что у 23,6% пациентов оставались

признаки повреждения слизистой оболочки кишечника: уровень трансферрина превышал нормативные показатели в 3–4 раза, гемоглобина – в 7–10 раз. У троих детей с болезнью Крона отмечались очень высокие показатели: уровень трансферрина превышал нормативные значения в 5–7 раз, гемоглобина – в 10–18 раз, что свидетельствовало о системном выраженном процессе (с учетом этих результатов диагноз был выставлен гастроэнтерологом в течение двух дней) [2]. Для контроля лечения пациента с инфекционным поражением кишечника (особенно с гемоколитом), сопровождающимся повышенным содержанием трансферрина либо гемоглобина в кале, целесообразно в динамике оценивать оба показателя.

Стандартизация преаналитического этапа при использовании метода HTSA обеспечивается сбором биоматериала в контейнеры со специальным жидким наполнителем и палочкой для сбора образца, дозирующей необходимое количество кала. Использование метода не требует специальной диеты и отмены препаратов, значительно удлиняет период хранения биоматериала до доставки в лабораторию без снижения качеств (до 7 дней). Полная автоматизация аналитического процесса позволяет исключить влияние человеческого фактора на результат анализа. При использовании одного контейнера с калом наряду с определением уровня трансферрина можно параллельно определить уровень гемоглобина.

Следует отметить значительные преимущества определения фекального трансферрина и гемоглобина по технологии iFOBT/FIT [2] перед известным тестом на скрытую кровь в кале: во-первых, превосходство по чувствительности и специфичности; во-вторых, данная технология позволяет определять глубину и уровень поражения; в-третьих, маркеры оцениваются количественно и повышают диагностическую эффективность (в т. ч. на ранних стадиях) за счет определения трансферрина; в-четвертых, диета и прием препаратов не сказываются на результатах анализа; в-пятых, трансферрин подтверждает ложноотрицательные результаты исследования на гемоглобин. Оптимально использование двухдневного варианта (кал забирается при двух актах дефекации) с учетом того факта, что в случае повреждения слизистой оболочки кишечника могут реализовываться механизмы ее защиты.

На базе Клинического диагностического центра и Омской государственной медицинской академии был проведен анализ результатов обследования 486 пациентов (средний возраст $51,3 \pm 8,7$ лет, 61,9% женщин и 38,1% мужчин), обратившихся к врачу по поводу кишечных расстройств (изменение частоты и характера стула, абдоминальный болевой синдром или дискомфорт). Основным поводом для обследования были «симптомы тревоги» (возраст старше 50 лет, короткий анамнез за-

болевания, необъяснимая потеря веса, персистенция симптомов, боли в животе, изменение консистенции и частоты стула, метеоризм). Этим пациентам проводилось параллельное исследование кала методом HTSA и тест на скрытую кровь с использованием иммунохроматографии. При применении метода HTSA положительные результаты были получены у 112 чел. (23,0%), при этом структура положительных результатов показала, что только уровень трансферрина был повышен в 41 случае, гемоглобина и трансферрина – в 38, и только гемоглобина – в 33 случаях.

Тест на скрытую кровь дал положительные результаты только у 24 чел. (4,9% случаев) – в 5 раз меньше, чем метод HTSA. Среди пациентов, у которых получен отрицательный результат, были 2 чел. с КРР (III–IV стадия). Это подтверждает низкую чувствительность стандартного теста по определению скрытой крови в кале. Совпали положительные результаты по определению гемоглобина у 16 пациентов. У пациентов, у которых исследование выявило повышенное содержание трансферрина, стандартный тест на скрытую кровь в кале давал отрицательные результаты.

Таким образом, подтверждена высокая чувствительность метода HTSA. Использование новой методики, обладающей более высокой чувствительностью и специфичностью, значительно повышает результативность обследования пациентов при выявлении патологии ЖКТ и рака кишечника на ранних стадиях, что позволяет широко и эффективно ее применять в процессе диспансеризации при исследовании кала на скрытую кровь иммунохимическим методом.

Список использованной литературы

1. Биомаркеры для эпидемиологического мониторинга рака // *Prev.* 2009. № 8. С. 2182–2185. <http://cebpa.aacrjournals.org/content/18/8/2182.abstract> (дата обращения 24.09.2015)
2. Долгих Т.И. Фекальный трансферрин в комплексной диагностике заболеваний желудочно-кишечного тракта // *Справочник заведующего КДЛ.* 2014. № 7. С. 18–24.
3. Егоренков В.В., Моисеенко Ф.В. Скрининг рака толстой кишки // *Практическая онкология.* 2010. № 2. С. 81–87.
4. Животовский А.С., Кутихин А.Г., Брусина Е.Б., Цитко Е.А. Эпидемиология колоректального рака: обзор факторов // *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2013. № 1. С. 58–64.
5. Кутихин А.Г., Брусина Е.Б., Животовский А.С. и др. Связь микрофлоры толстого кишечника с возникновением колоректального рака // *Эпидемиология и инфекционные болезни.* 2012. № 4. С. 44–52.
6. Состояние онкологической помощи населению России в 2014 году / под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздрава России, 2015. 31 с.

7. Andersen V., Halfvarson J., Vogel U. Colorectal cancer in patients with inflammatory bowel disease: Can we predict risk? // *World J. Gastroenterol.* 2012. Vol. 18. P. 4091–4094.
8. Cai G., Xu Y., Lu H. et al. Clinicopathologic and molecular features of sporadic microsatellite- and chromosomal-stable colorectal cancers // *Internat. J. Colorectal. Dis.* 2008. № 4. P. 365–373.
9. Chan A.T., Giovannucci E.L. Primary prevention of colorectal cancer // *Gastroenterology.* 2010. Vol. 6. P. 2029–2043.
10. El-Tawil A.M. Colorectal cancer and pollution // *World J. Gastroenterol.* 2010. Vol. 16. P. 3475–3477.
11. Nougayrede P., Homburg S., Taieb F. et al. Escherichia coli induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells // *Science.* 2006. Vol. 313. P. 848–851.
12. Wilschut J.A., Habbema J.D., van Leerdam M.E. et al. Fecal occult blood testing when colonoscopy capacity is limited // *J. Natl. Cancer Inst.* 2011. Vol. 103. P. 1741–1751.
13. Kobayashi K., Katon J., Misawa A. et al. Quantitative Immunological Fecal Occult Blood Test Predicts Probability, Stage, and Location of Colorectal Cancer // *Health Evaluation and Promotion.* 2003. Vol. 30. № 4. P. 468–471.
14. Candela M., Guidotti M., Fabbri A. et al. Human intestinal microbiota: cross-talk with the host and its potential role in colorectal cancer // *Crit. Rev. Microbiol.* 2011. Vol. 37. P. 1–14.
15. Levin T.R., Corley D.A. Colorectal-cancer screening – coming of age // *N. Engl. J. Med.* 2013. Vol. 369. P. 1164–1166.
16. McConnell B.B., Yang V.W. The role of inflammation in the pathogenesis of colorectal cancer // *Curr. Colorectal Cancer Rep.* 2009. Vol. 5. P. 69–74.
17. Miyoshi H., Uchida K., Matsuse R. et al. Clinical study of a new fecal occult blood test using a combination assay of hemoglobin and transferrin // *Gastroenterologia Japonica.* 1991. Vol. 26. P. 151–156.
18. Saleh M., Trinchieri G. Innate immune mechanisms of colitis and colitis-associated colorectal cancer // *Nat. Rev. Immunol.* 2011. Vol. 11. P. 9–20.
19. Schwartz M., Regueiro M. Prevention and treatment of postoperative Crohn's disease recurrence: an update for a new decade // *Curr. Gastroenterol. Rep.* 2011. Vol. 13. № 1. P. 95–100.



ОБМЕН ОПЫТОМ

Применение метода линейного иммуноблоттинга для определения антител классов G и M к основным возбудителям инфекций TORCH-группы

С.Г. Марданлы

канд. мед. наук, президент, директор по науке,

В.А. Арсеньева

старший микробиолог отдела перспективных разработок,

Е.А. Амелина

канд. биол. наук, начальник отдела перспективных разработок,

С.С. Марданлы

директор по развитию

ЗАО «ЭКОлаб», Московская обл., г. Электрогорск

С.В. Ротанов

*д-р мед. наук, профессор кафедры дерматовенерологии леч.
факультета ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова МЗ России,
врач клинической лабораторной диагностики
ФГБУ «ГНЦДК» МЗ России*

Авторами разработана методика определения антител к основным возбудителям TORCH-группы в формате линейного иммуноблоттинга. При исследовании 141 образца аттестованного контрольного материала промышленного производства показаны 100% чувствительность и специфичность исследований предложенной методики. Для определения чувствительности и специфичности методики в соответствии требованиями ГОСТ Р 53022.3-2008 определена ее

клиническая информативность. Исследование образцов крови, полученных у беременных и лиц, проходивших диагностическое обследование, продемонстрировало более высокие показатели клинической информативности выявления специфических АТ методом линейного иммуноблоттинга по сравнению с иммуноферментным анализом.

Благодаря комплексу мероприятий общественного здравоохранения в Российской Федерации в последние годы наблюдается устойчивое снижение показателей младенческой смертности. Так, по официальным данным Федеральной службы государственной статистики (Росстат), в 2014 г. показатель относительной смертности детей в возрасте до одного года составил 7,4 случая на 1000 новорожденных против 8,2 – в 2013 г. (снижение на 9,8%). В структуре причин, обуславливающих перинатальную гибель плодов и новорожденных, существенную роль играют внутриутробные или врожденные инфекции (ВУИ), развивающиеся в результате анте- или интранатального инфицирования плода при вертикальном (трансплацентарном) пути передачи инфекционного агента от матери [2–4, 13, 15, 18–20].

Актуальность изучения проблемы ВУИ обусловлена не только существенными пери- и постнатальными потерями, но также и тем, что у новорожденных, перенесших ВУИ на ранних этапах гестации, часто определяется патология развития, приводящая к серьезным нарушениям здоровья и инвалидности. Установлено, что проникновение возбудителя инфекции в организм плода на ранних этапах его развития приводит к нарушениям правильной закладки тканей и систем органов и формированию в поврежденных органах фиброзно-склеротических трансформаций, в то время как ВУИ в поздний фетальный период чаще сопровождаются воспалительным повреждением отдельных органов и систем или генерализованным поражением [1–3, 14, 15, 21].

Истинная частота распространенности ВУИ до настоящего времени не установлена, по данным отдельных научных исследований, она может составлять 6–10% [2, 13, 20], в отдельных регионах достигать 22,6% [1, 3, 15, 18, 20] и даже 53% [5].

Развитие ВУИ плода не обязательно проявляется в виде манифестных форм при рождении или в ближайший неонатальный период, при этом отмечается, что у новорожденных клинические проявления ВУИ не имеют специфических признаков, что затрудняет их этиологическую диагностику. Указанное обстоятельство привело к тому, что наиболее значимые ВУИ с позиций тяжести поражения плода и новорожденного были объединены в общую группу. Для обозначения этой патологии был предложен термин «TORCH-инфекции» – аббревиатура латинских наименований основных заболеваний (Toxoplasmosis, Rubella, Cytomegalia, Herpes и Other infections); в разряд «другие» специалисты включают широкий круг инфекций, увели-

чивающийся с развитием знаний о них: сифилис, листериоз, вирусные гепатиты, ВИЧ-инфекцию, хламидиоз, микоплазмоз и другие [2, 5, 14, 19, 21].

Скудность клинической симптоматики и отсутствие специфицирующих признаков у TORCH-инфекций способствовали привлечению лабораторных методов для их выявления и верификации этиологических факторов. При обследовании беременных и новорожденных приоритет получили косвенные методы лабораторной диагностики TORCH-инфекций, направленные на выявление в крови маркеров специфического иммунного ответа (антител) и оценку динамики их концентрации [6–12, 17]. Для обнаружения и количественной оценки специфических АТ используют преимущественно иммуноферментный анализ (ИФА) и линейный иммуноблоттинг (ЛИБ).

Преимуществом применения технологии иммуноблоттинга является возможность оценки присутствия специфических АТ к отдельным иммунокомпетентным антигенам одного или нескольких возбудителей инфекций при проведении одного лабораторного исследования [6, 7].

к сведению

Для дифференцированного определения антител одновременно к нескольким антигенам возбудителей TORCH-инфекций авторами настоящей работы разработана медицинская технология иммунохимического лабораторного исследования в формате ЛИБ, при которой в качестве твердой фазы (иммуносорбента) используются полоски нитроцеллюлозной мембраны (стрипы) с дискретно размещенными на них антигенами возбудителей инфекции.

При изучении литературных данных о специфичности и иммуногенности для человека были отобраны очищенные нативные и рекомбинантные антигены основных возбудителей TORCH-инфекций для последующего их размещения на иммуносорбенте:

- ~ нативный антиген *Toxoplasma gondii* и рекомбинантный аналог антигена токсоплазмы р30;
- ~ нативный антиген вируса краснухи;
- ~ рекомбинантный аналог мозаичного антигена цитомегаловируса, содержащий иммунодоминантные последовательности белков pp150, pp52, pp28 и gB;
- ~ рекомбинантные аналоги антигена G1 вируса простого герпеса 1 типа и антигена G2 вируса простого герпеса 2 типа.

Кроме этого, на иммуносорбенте были размещены:

- ~ международный стандарт ВОЗ Anti-Rubella Immunoglobulin, Human NIBSC code: RUBI-1-94, представляющий собой антитела к вирусу краснухи – иммуноглобулины человека класса G в концентрации 15–20 МЕ/мл (линия «Rub. Cut off»);

~ три контрольные линии, две из которых («0,5+» и «2,0+») содержат иммуноглобулины человека класса G или M в разных концентрациях для калибровки результатов исследования, и одна линия («КВО») содержит антитела к IgG/IgM человека для контроля внесения образца.

Размещение антигенных линий на стрипах представлено на схеме (рисунок).

Для оценки чувствительности и специфичности разработанных методик исследованы контрольные сыворотки, содержавшие (n = 94) и не содержавшие (n = 47) антитела к антигенам возбудителей инфекций TORCH-группы:

- ~ «Стандарт AT-G(+/-) *T. gondii*», ЗАО «МБС»;
- ~ «Рубелла – контрольная панель сывороток», ЗАО «Вектор-Бест»;
- ~ «Стандарт AT-G (+/-) ЦМВ» ОСО 42-28-360-01, ЗАО «МБС»;
- ~ Anti-CMV Mixed Titer Performance Panel PT C203, фирмы Sera Care Life Sciences, USA;
- ~ «ЦМВ-IgM – контрольная панель сывороток», ЗАО «Вектор-Бест»;
- ~ «Стандарт AT-G(+/-) ВПГ-1,2» ОСО 42-28-373-04, ЗАО «МБС»;
- ~ «ВПГ-IgM, IgG-авидность – контрольная панель сывороток», ЗАО «Вектор-Бест».

При исследовании всех перечисленных панелей контрольных сывороток с использованием разработанной методики получено полное совпадение результатов определения специфических антител с паспортными характеристиками каждой панели, и таким образом была показана 100% чувствительность и специфичность новой методики.

Клиническую информативность по ГОСТ Р 53022.3-2008 [16] комплекта № 1 новой методики изучали при исследовании 1115 сывороток крови, полученных у беременных женщин и лиц, проходивших лабораторное обследование в диагностическом центре El Clinic (г. Электрогорск) и в Московской областной станции переливания крови (г. Москва). В качестве реагентов сравнения использовали соответствующие наборы для определения антител

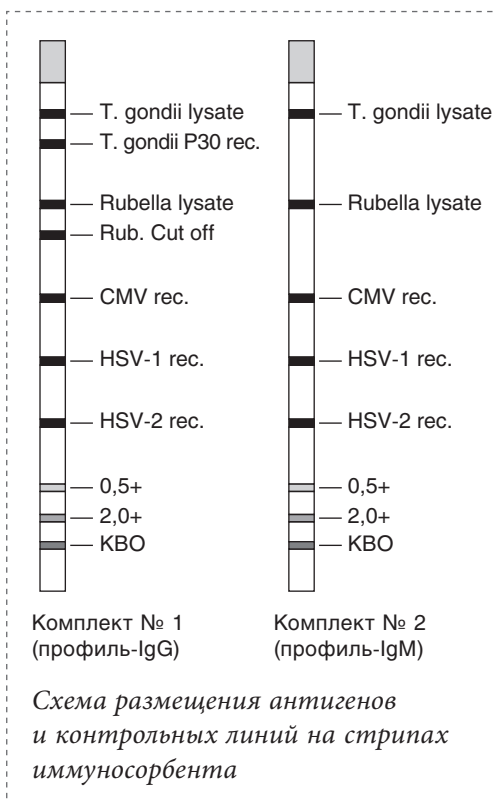


Схема размещения антигенов и контрольных линий на стрипах иммуносорбента

к антигенам каждого из возбудителей TORCH-группы методом ИФА, разрешенные к применению в Российской Федерации.

Полученные результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1

Результаты обнаружения специфических антител класса G к антигенам возбудителей TORCH-инфекций методами ИФА и линейного иммуноблоттинга в 1115 образцах крови

Возбудитель инфекции	Токсоплазма		Вирус краснухи		ЦМВ		ВПГ-1		ВПГ-2	
	ИФА	ЛИБ	ИФА	ЛИБ	ИФА	ЛИБ	ИФА	ЛИБ	ИФА	ЛИБ
Результат исследования										
Положительный	63	65	255	259	219	220	149	152	30	30
Неопределенный	8	5	13	9	5	4	4	0	4	0
Отрицательный	182	183	66	66	99	99	27	28	151	155
Всего	253	253	334	334	323	323	180	180	185	185

Представленные данные демонстрируют наличие расхождений результатов определения антител класса G разными методами (ИФА и ЛИБ): к возбудителю токсоплазмоза – в 3 (1,19%) случаях из 253, краснухи – в 4 (1,16%) из 344, к ЦМВ – в 1 (0,31%) из 323, к ВПГ-1 – в 4 (2,22%) из 180 и к ВПГ-2 – в 4 (2,16%) из 185 случаев. Эти 16 образцов, в которых при выявлении АТ методами ИФА и ЛИБ были получены дискордантные результаты, дополнительно исследованы при использовании наборов реагентов Recomline TORCH Screening IgG фирмы «Микроген» (Германия) (табл. 2).

Таблица 2

Сопоставление результатов обнаружения специфических антител класса G к антигенам возбудителей TORCH-инфекций при использовании линейного иммуноблоттинга в 16 образцах крови

№ образца	Возбудитель инфекции									
	Токсоплазма		Вирус краснухи		ЦМВ		ВПГ-1		ВПГ-2	
	Л	Р	Л	Р	Л	Р	Л	Р ВПГ1+2	Л	Р
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
2	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
3	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
5	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+/-

Окончание табл. 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
6	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
7	+	+	+/-	+/-	+/-	+	+	+	+	+
8	-	-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-
9	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
12	-	-	+	+	+/-	+	+	+	-	-
13	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
14	-	-	+	+	+/-	-	+	+	-	-
15	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
16	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

R – Recomline TORCH Screening IgG (R).

Л – новая методика в формате ЛИБ.

Как следует из приведенных в табл. 2 данных, результаты выявления АТ при использовании новой методики в подавляющем большинстве случаев – в 75 (93,75%) из 80 – совпадали с таковыми при применении набора реагентов Recomline TORCH Screening IgG.

Детализированный анализ полученных данных позволил установить полное совпадение результатов определения специфических антител к возбудителю токсоплазмоза и ВПГ-1 при применении названных методик, расхождение результатов в отношении определения антител к *Rubella virus* – по 1 образцу, к ЦМВ – по 3 образцам и к ВПГ-2 – по 1 образцу. При этом из установленных 5 случаев расхождения в 3 – различие заключалось между результатами положительными («+») и неопределенными («+/-»), в 2 случаях – между неопределенными («+/-») и отрицательными («-»).

По совокупности совпадающих результатов исследования биологических образцов методами ИФА и ЛИБ двумя наборами реагентов разных производителей осуществлен расчет и сравнительная оценка показателей клинической информативности (клинической чувствительности, специфичности и диагностической эффективности) предложенной методики определения специфических АТ (табл. 3).

Представленные данные позволили прийти к заключению о достаточно высокой диагностической эффективности разработанной методики и применявшихся наборов реагентов. На основании полученных данных можно полагать, что при выявлении разночтений в результатах скринингового определения специфических IgG методами ИФА и ЛИБ, при-

Таблица 3

**Показатели клинической информативности определения IgG
к возбудителям TORCH-инфекций**

Используемые реагенты		Возбудитель инфекции				
		Токсо-плазма	Вирус краснухи	ЦМВ	ВПГ-1	ВПГ-2
Клиническая чувствительность						
Наборы для определения АТ к возбудителям TORCH-инфекций «ЭКО-лаб»	ИФА	99,2	99,1	99,1	98,3	100
Новая методика	ЛИБ	100	99,7	99,4	100	100
Recomline TORCH Screening IgG	ЛИБ	100	100	100	100	100
Клиническая специфичность						
Наборы для определения АТ к возбудителям TORCH-инфекций «ЭКО-лаб»	ИФА	99,6	100	99,7	99,4	98,4
Новая методика	ЛИБ	100	100	99,7	100	99,5
Recomline TORCH Screening IgG	ЛИБ	100	100	100	99,4	100
Диагностическая эффективность						
Наборы для определения АТ к возбудителям TORCH-инфекций «ЭКО-лаб»	ИФА	99,6	99,1	98,8	97,8	98,4
Новая методика	ЛИБ	100	99,7	99,1	100	99,5
Recomline TORCH Screening IgG	ЛИБ	100	100	100	99,4	100

оритет имеют данные, полученные методом ЛИБ, так как для них была установлена более высокая диагностическая эффективность (99,4–100%).

Для определения клинической информативности методики, разработанной для определения специфических АТ класса IgM методом ЛИБ, исследовали 860 сывороток крови, полученных от беременных женщин и лиц, проходивших плановое или специализированное обследование в диагностических целях. Наборами реагентов сравнения служили соответствующие наборы реагентов для определения антител IgM к антигенам возбудителей группы TORCH-инфекций, имеющие регистрацию в Российской Федерации. Полученные результаты представлены в табл. 4.

При определении антител класса М получено большее количество расхождений в результате определения АТ при применении методов

Таблица 4

Результаты обнаружения специфических антител класса М к антигенам возбудителей TORCH-инфекций методами ИФА и линейного иммуноблоттинга в 860 образцах крови

Возбудитель инфекции	Токсоплазма		Вирус краснухи		ЦМВ		ВПГ-1		ВПГ-2	
	ИФА	ЛИБ	ИФА	ЛИБ	ИФА	ЛИБ	ИФА	ЛИБ	ИФА	ЛИБ
Результат исследования										
Положительный	11	14	9	12	52	62	9	11	4	5
Неопределенный	41	18	11	6	40	16	11	3	12	4
Отрицательный	195	215	216	218	128	142	167	173	190	197
Всего	247	247	236	236	220	220	187	187	206	206

ИФА и ЛИБ: АТ к возбудителю токсоплазмоза – в 24 (9,72%) случаях из 247, краснухи – в 5 (2,12%) из 236, ЦМВ – в 24 (10,91%) из 220, ВПГ-1 – в 8 (4,28%) из 187 и ВПГ-2 – в 8 (3,88%) из 206 случаев.

Все образцы крови, в которых при выявлении АТ методами ИФА и ЛИБ были получены дискордантные результаты, были дополнительно исследованы при использовании набора реагентов Recline TORCH Screening IgG фирмы «Микроген» (Германия). Результаты исследования двумя методиками (метод ЛИБ) были сопоставлены, что позволило установить их полное совпадение в 80% случаев: причем при определении специфических АТ IgM к возбудителю токсоплазмоза – в 50% случаев, к вирусу краснухи – в 90%, к ЦМВ – в 75%, к ВПГ-1 – в 83% и к ВПГ-2 – в 100% случаев.

По совпадающим результатам исследования методом ЛИБ образцы были аттестованы по содержанию в них IgM к основным антигенам возбудителей TORCH-группы и для них рассчитаны показатели клинической информативности по ГОСТ Р 53022.3-2008 (табл. 5).

Таблица 5

Показатели клинической информативности определения IgM к возбудителям TORCH-инфекций

Используемые реагенты		Возбудитель инфекции				
		Токсоплазма	Вирус краснухи	ЦМВ	ВПГ-1	ВПГ-2
1	2	3	4	5	6	7
Клиническая чувствительность						
Наборы для определения АТ к возбудителям TORCH-инфекций «ЭКОлаб»	ИФА	78,6	75	81,7	81,8	80
Новая методика	ЛИБ	100	100	96,55	100	100

Окончание табл. 5

1	2	3	4	5	6	7
Recomline TORCH Screening IgG	ЛИБ	100	100	100	100	100
Клиническая специфичность						
Наборы для определения АТ к возбудителям TORCH-инфекций «ЭКОлаб»	ИФА	86,1	98,18	88,9	96,53	96,45
Новая методика	ЛИБ	94,8	99,10	98,61	100	100
Recomline TORCH Screening IgG	ЛИБ	100	100	100	99,42	100
Диагностическая эффективность						
Наборы для определения АТ к возбудителям TORCH-инфекций «ЭКОлаб»	ИФА	85,8	97,03	87,3	95,7	96,12
Новая методика	ЛИБ	95,14	99,15	98,2	100	100
Recomline TORCH Screening IgG	ЛИБ	100	100	100	99,5	100

Результаты изучения полученных показателей позволили установить более высокую клиническую информативность определения АТ класса IgM к антигенам возбудителей TORCH-группы методом ЛИБ (98,6–100%), нежели ИФА (75–98,0%); при этом разработанная авторами методика показала результаты, не уступающие соответствующему зарубежному набору.

Список использованной литературы

1. *Голева О.П., Богза О.Г.* Состояние младенческой смертности в современной России. Журнал научных публикаций аспирантов и докторантов. 2013. № 3. URL:<http://www.jurnal.org/articles/2013/med7.html> (дата обращения 28.02.2015).
2. *Гриноу А., Осборн Дж., Сазерленд Ш.* [Ред.] Врожденные перинатальные и неонатальные инфекции. М.: Медицина, 2000. 288 с.
3. *Заплатников А.Л., Коровина Н.А., Корнева М.Ю., Чебуркин А.В.* Внутриутробные инфекции: диагностика, лечение, профилактика // Лечащий врач. 2005. № 8. URL:<http://www.lvrach.ru/2005/08/4532901/> (дата обращения 28.03.2015).
4. *Заплатников А.Л., Коровина Н.А., Корнева М.Ю., Чебуркин А.В.* Риск вертикального инфицирования и особенности течения неонатального периода у детей с внутриутробной инфекцией // Русский медицинский журн. 2005. № 13. С. 45–47.
5. *Землянский О.А.* Эпидемиология внутриутробных инфекций плодов и новорожденных и оптимизация системы слежения за ними. Автореферат дисс. ... на соискание ученой степени д-ра мед. наук: 14.00.30 - эпидемиология. Москва, 2004.
6. *Марданлы С.Г.* Иммуноферментные тест-системы ЗАО «ЭКОлаб» для диагностики простого герпеса // Клиническая лабораторная диагностика. 2008. № 2. С. 35–38.

7. *Марданлы С.Г., Асратян А.А.* Иммуноферментные тест-системы для диагностики цитомегаловирусной инфекции // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2008. № 3. С. 98–100.

8. *Марданлы С.Г.* Разработка и испытания новых иммуноферментных тест-систем для диагностики токсоплазмоза // Клиническая лабораторная диагностика. 2009. № 2. С. 37–40.

9. *Марданлы С.Г., Гафаров Р.Р., Амелина Е.А.* Разработка иммуноферментных тест-систем для диагностики краснухи // Клиническая лабораторная диагностика. 2012. № 5. С. 46–48.

10. *Марданлы С.Г.* Задачи и перспективы совершенствования клинической лабораторной диагностики инфекций группы TORCH // Вестник службы крови. 2013. № 2. С. 50–54.

11. *Марданлы С.Г., Томашевская Н.А., Мухина А.И. и др.* Опыт использования комплекса тест-систем для диагностики инфекций TORCH-группы // Эпидемиология и инфекционные болезни: Актуальные вопросы. 2014. № 5. С. 65–69.

12. *Марданлы С.Г., Арсеньева В.А., Акиншина Ю.А. и др.* Разработка нового набора реагентов для скрининговой диагностики с целью одновременного обнаружения антител к каждому из основных возбудителей инфекций TORCH-группы методом линейного иммуноблоттинга // Эпидемиология и инфекционные болезни: Актуальные вопросы. 2014. № 6. С. 24–29.

13. *Медовиков П.С.* Причины детской смертности. СПб., 2004. 214 с.

14. *Нисевич Л.Л., Талалаев А.Г., Каск Л.Н. и др.* Врожденные вирусные инфекции и маловесные дети // Вопросы современной педиатрии. 2002. № 1. С. 9–13.

15. *Царегородцев А.Д., Рюмина И.И.* Заболеваемость новорожденных внутриутробными инфекциями и задачи по ее снижению в Российской Федерации. Рос. вестн. перинатол. и педиатрии. 2001. № 46. С. 4–7.

16. Национальный стандарт Российской Федерации. ГОСТ Р 53022.3-2008. «Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов». (Утв. приказом Росстандарта № 557-ст от 18 декабря 2008 г. «Об утверждении национального стандарта»).

17. Протоколы диагностики, лечения и профилактики внутриутробных инфекций у новорожденных детей. М.: ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ, 2002.

18. *Acolet D., Golightly S., Springett A.* Perinatal Mortality Confidential Enquiry into Maternal and Child Health (CEMACH): Perinatal Mortality 2006: England, Wales and Northern Ireland. London: CEMACH, 2008.

19. *Chan A., King J.F., Flenady V. et al.* Classification of perinatal deaths: development of the Australian and New Zealand classifications // J Paediatr Child Health. 2004. Vol. 40. P. 340–347.

20. Neonatal and perinatal mortality: country, regional and global estimates / WHO library Cataloguing-in-Publication Data. URL:http://whqlibdoc.who.int/publications/2006/9241563206_eng.pdf (дата обращения 02.03.2015).

21. *Remington J.S., Klein J.O. [eds.]* Infectious Disease of the Fetus and Newborn Infant. 5th ed. Philadelphia, PA: WB Saunders Co, 2001. P. 389–424.