

ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНТНАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИНЕЙТРОФИЛЬНЫХ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

*Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии,
г. Минск, Республика Беларусь*

Основной тенденцией последнего десятилетия является прогрессивное увеличение частоты системных васкулитов, аутоиммунных заболеваний почек и желудочно-кишечного тракта. В развитии данных заболеваний большое значение придается антинейтрофильным цитоплазматическим антителам (АНЦА), гетерогенной популяции аутоантител, реагирующих с различными ферментами цитоплазмы нейтрофилов, в первую очередь с протеиназой-3, миелопероксидазой, реже – лактоферином, катепсином G и другими антигенами [1]. ANCA имеют большое патогенетическое значение при гранулематозе Вегенера (антиген протеиназа-3), микроскопическом полиартериите (антиген миелопероксидаза), аллергическом (эозинофильном) гранулематозном ангиите (антиген миелопероксидаза) и т. д. [1, 2]. «Золотым» стандартом для выявления таких антител является метод непрямой иммунофлюоресценции. Рост системных васкулитов, аутоиммунных заболеваний почек и желудочно-кишечного тракта приводит к увеличению материальных затрат для осуществления своевременной диагностики, этиотропного и патогенетического лечения, проведения профилактических мероприятий, особенно в условиях необходимости приобретения валютозатратных импортных тест-систем. В связи с этим, целью настоящей работы стала разработка отечественной иммунофлюоресцентной диагностической тест-системы для определения АНЦА в сыворотке крови человека и оценка ее диагностических параметров (чувствительность, специфичность и др.).

Для разработки тест-системы были применены стандартные методы обработки и стерилизации используемой лабораторной посуды, способы выделения и фиксации нейтрофилов на стекле, а также метод непрямой иммунофлюоресценции для выявления АНЦА с последующим учетом реакции на люминесцентном микроскопе [3], статистический анализ результатов.

Для получения нейтрофил-субстратных слайдов была проведена отработка условий выделения нейтрофилов и их нанесения в лунки предметных стекол, их фиксация, определение посевной дозы клеток для получения оптимального клеточного монослоя и воспроизведения типичной для них морфологии. В ходе экспериментальных исследований подобраны фиксаторы, оптимальными из ко-

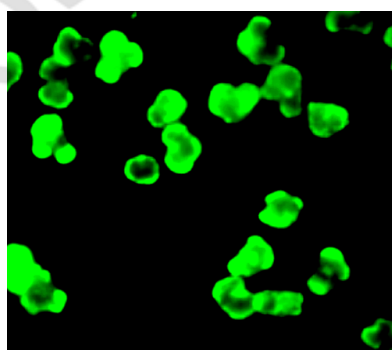
торых, обеспечивающими сохранность и морфологическую структуру клеток, являются охлажденный этанол и метанол в режиме 10 минутной экспозиции при комнатной температуре. Формирование равномерного клеточного слоя нейтрофилов получено с применением концентрации клеток 1 млн/мл в посевной дозе, вносимой в объеме 25 мкл на лунку. Стабильность реактогенных свойств нейтрофильных слайдов установлена в условиях их хранения в герметичной упаковке с силикогелевым наполнителем в холодильной камере при температуре +4°C - +8°C в течение 6 месяцев.

Для создания отечественной тест-системы были отработаны также условия и методы получения компонентов, составляющих композицию набора (получение контрольных образцов сывороток, растворов и др.). В состав разрабатываемой иммунофлюоресцентной тест-системы для определения АНЦА включаются 10 компонентов (нейтрофил-субстратные слайды, контрольные сыворотки, вспомогательные растворы и реактивы).

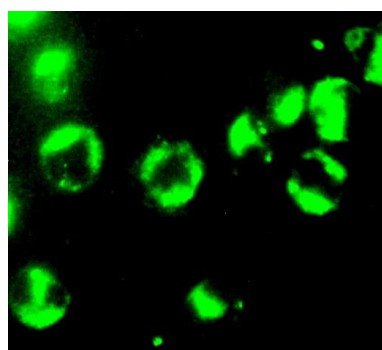
Эффективность тест-системы была изучена и подтверждена такими важными диагностическими параметрами как специфичность, воспроизводимость, чувствительность и аналитическая чувствительность.

Специфичность является одним из базовых (основных) показателей способности тест-системы дифференцировать искомые аутоантитела от близкородственных аутоантител.

Для теста на специфичность была поставлена реакция непрямой иммунофлюоресценции на лабораторных образцах слайдов с использованием положительных (цитоплазматический и перинуклеарный) и отрицательного контролей из прототипной тест-системы (ImmuGlo, США). На нейтрофил-субстратных слайдах, полученных в условиях нашей лаборатории, специфичность подтверждена типом цитоплазматического и перинуклеарного свечения, характерного для иммунной реакции ANCA со специфическими антигенами (рис.).



pANCA



cANCA

Рис. ANCA свечение на лабораторных нейтрофильных слайдах (увеличение 400х, фиксатор этанол)

Воспроизводимость оценивалась, как способность тест-системы давать тот же результат при повторном ее применении. Для теста на воспроизводимость использовали высокоактивные (++++) , среднеактивные (+++/++) и низкоактивные (+/+/-) положительные сыворотки по ANCA. Каждая из сывороток проверялась не менее чем с 3-кратной повторностью на 3-х сериях слайдов. Полученные

данные суммированы и проанализированы статистически. Статистическую обработку проводили методом дисперсионного анализа повторных измерений, рассматривая межлуночную и внутрисуночную вариацию, степени свободы и статистический параметр F [4]. Полученные данные представлены в табл. 1-3.

Таблица 1

Дисперсионный анализ повторных измерений высокоактивных сывороток

| Слайд | N | Среднее | Стд Откл | СОС | |
|------------------------------------|---|---------|----------|-----------------|------------------|
| 1 | 8 | 100 | 0 | 0 | |
| 2 | 8 | 100 | 0 | 0 | |
| 3 | 8 | 100 | 0 | 0 | |
| | | | Вариация | Степени свободы | Оценка дисперсии |
| Вариабельность от лунки к лунке | | | 0 | 7 | |
| Вариабельность от слайда к слайду: | | | 0 | 16 | |
| 1. Обусловленная повторами | | | 0 | 2 | 0 |
| 2. Остаточная | | | 0 | 14 | 0 |
| Общая | | | 0 | 23 | |
| F=1,000 | | | P=0,393 | | |

Таблица 2

Дисперсионный анализ повторных измерений среднеактивных сывороток

| Слайд | N | Среднее | Стд Откл | СОС | |
|------------------------------------|---|---------|----------|-----------------|------------------|
| 1 | 8 | 62,5 | 13,36 | 4,725 | |
| 2 | 8 | 62,5 | 13,36 | 7,725 | |
| 3 | 8 | 65,62 | 12,94 | 4,575 | |
| | | | Вариация | Степени свободы | Оценка дисперсии |
| Вариабельность от лунки к лунке | | | 3307 | 7 | |
| Вариабельность от слайда к слайду: | | | 416,7 | 16 | |
| 1. Обусловленная повторами | | | 52,08 | 2 | 26,04 |
| 2. Остаточная | | | 364,6 | 14 | 26,04 |
| Общая | | | 3724 | 23 | |
| F=1,000 | | | P=0,393 | | |

Таблица 3

Дисперсионный анализ повторных измерений низкоактивных сывороток

| Слайд | N | Среднее | Стд Откл | СОС | |
|------------------------------------|---|---------|----------|-----------------|------------------|
| 1 | 8 | 23,44 | 4,419 | 1,562 | |
| 2 | 8 | 25 | 0 | 0 | |
| 3 | 8 | 25 | 0 | 0 | |
| | | | Вариация | Степени свободы | Оценка дисперсии |
| Вариабельность от лунки к лунке | | | 45,57 | 7 | |
| Вариабельность от слайда к слайду: | | | 104,2 | 16 | |
| 1. Обусловленная повторами | | | 13,02 | 2 | 6,51 |
| 2. Остаточная | | | 91,15 | 14 | 6,51 |
| Общая | | | 149,7 | 23 | |
| F=1,000 | | | P=0,393 | | |

В наших опытах уровень параметра F составил 1,000. Критические значения F для определенных в наших опытах чисел степеней свободы $v_{\text{меж}} = 2$ и $v_{\text{внут}} = 14$, составляет 6,51, то есть больше полученного нами (1,000), что свидетельствует о полной воспроизводимости результатов.

Основываясь на статистическом анализе результатов тестирования сывороток, полученные лабораторные нейтрофил-субстратные слайды характеризуются как обладающие стабильностью воспроизведения количественных параметров тестируемых сывороток. Различие результатов по слайдам находилось в пределах статистически недостоверной ($P > 0,05$) вариабельности опытов.

Для расчета воспроизводимости (В) использовали следующую формулу [5]:

$$B = \frac{S \times K - M}{S \times K} \times 100\%$$

где S – количество использованных образцов, K – число повторов, M – количество невоспроизведённых результатов. В наших опытах воспроизводимость составила 98%.

В оценке чувствительности исходили из общепринятого понимания чувствительности как способности тест-системы выявлять минимальное количество иммунных компонентов, в том числе аутоантител. Аналитическая чувствительность подразумевает выявление минимального количества аутоантител, при котором система обладает 100% воспроизводимостью.

При определении чувствительности тест-системы высокоактивную сыворотку по ANCA раститрованную методом двойных разведений с 1:20 до 1:2560 вносили на слайды 3-х лабораторных серий. По результатам титрования было показано, что методом РНИФ на изготовленных слайдах, ANCA обнаруживаются в положительной сыворотке в разведении 1:640.

Для теста на аналитическую чувствительность также использовали высокоактивную сыворотку в разведении с 1:20 до 1:2560. На всех изученных слайдах с испытуемой сывороткой в разведении 1:160 были отмечены адекватные результаты с интенсивностью свечения на уровне +++++. Полученные результаты показали, что при разведении 1:160 разработанная нами тест-система обладает 100% воспроизводимостью.

В заключение в рамках выполнения государственной научно-технической программы «Инфекции и микробиологические биотехнологии» (научный руководитель – член-корреспондент НАН Беларуси, профессор Л.П. Титов) на основе слайдов с нейтрофилами разработана отечественная диагностическая тест-система для выявления ANCA. В ходе работы определены основные диагностические параметры разработанной лабораторной серии тест-системы. Воспроизводимость тест-системы составила 98%, специфичность была подтверждена типом специфического свечения, чувствительность характеризовалась выявлением аутоантител в титре 1:640, аналитическая чувствительность – в титре 1:160. Полученная лабораторная серия тест-системы подготовлена для проведения ее апробации в клинических лабораториях. Разработан комплект научно-технической документации (лабораторный регламент, технические условия и инструкция по применению).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Окороков, А. Н.* Диагностика болезней внутренних органов / А. Н. Окороков. М.: Мед. лит., 2014. Т. 2: Диагностика ревматических и системных заболеваний соединительной ткани. Диагностика эндокринных заболеваний. 576 с.
2. *Pollard, K. M.* Autoantibodies and Autoimmunity. Molecular Mechanisms in Health and Disease / K. M. Pollard. WILEY-VCH, 2006. 635 p.

3. *Клиническое* руководство по лабораторным тестам / под ред. Н. Тица. М.: Юнимед-пресс, 2003. 54 с.

4. *Трухачева, Н. В.* Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica / Н. В. Трухачева. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. 384 с.

5. *Ткачев, В. К.* ИФА-диагностика сифилиса: информ.-метод. пособие / В. К. Ткачев, Т. Г. Вяткина. 3-е изд. Новосибирск: Вектор-Бест, 2005. 48 с.