

М.О. Трусевич, О.Т. Андреева, Л.П. Титов

Характеристика отечественной иммунофлуоресцентной тест-системы для выявления антинейтрофильных цитоплазматических антител в сыворотке крови больных с иммунопатологией

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии

Разработана диагностическая иммунофлуоресцентная тест-система для выявления антинейтрофильных цитоплазматических антител и определены ее основные диагностические параметры. Использование данной тест-системы открывает широкие возможности для клиницистов с целью лабораторного подтверждения ANCA-ассоциированных заболеваний.

Ключевые слова: антинейтрофильные цитоплазматические антитела, непрямая иммунофлуоресценция, отечественная тест-система.

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 (ANCA), гетерогенной популяции аутоантител, реагирующих с различными ферментами цитоплазмы нейтрофилов, в первую очередь с протеиназой-3, миелопероксидазой, реже – лактоферинном, 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. [3, 5]. «Золотым» стандартом для выявления таких антител является метод непрямой иммунофлуоресценции.

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 являлось разработка отечественной иммунофлуоресцентной диагностической тест-системы для определения ANCA в сыворотке крови больных с иммунопатологией и оценка ее диагностических параметров (чувствительность, специфичность и др.).

Материалы и методы. 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 иммунофлуоресценции для выявления ANCA с последующим учетом реакции на люминесцентном микроскопе [2]. Для изучения диагностических параметров тест-системы использовали сыворотки крови больных с системной красной волчанкой (n=52), ревматоидным артритом (n=12) и некротизирующим гломерулонефритом (n=26). Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программного обеспечения «CellQuest», «Statistica 6.0» и «Microsoft Office Excel».

Результаты и обсуждение. 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 которых, 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 $+4^{\circ}\text{C}$ - $+8^{\circ}\text{C}$ 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 ANCA включаются 10 компонентов (нейтрофил-субстратные слайды, контрольные сыворотки, вспомогательные растворы и реактивы).

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

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-х кратной повторностью на 3-х сериях слайдов. Полученные данные суммированы и проанализированы статистически. Статистическую обработку проводили методом дисперсионного анализа повторных измерений, рассчитывая межлуночную и внутрилуночную вариацию, степени свободы и статистический параметр F [1]. 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. Различия результатов по слайдам находились в пределах статистически недостоверной ($P > 0,05$) вариабельности опытов. Для расчета воспроизводимости (В) использовали следующую формулу [4]:

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 разлитую 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. 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.1).

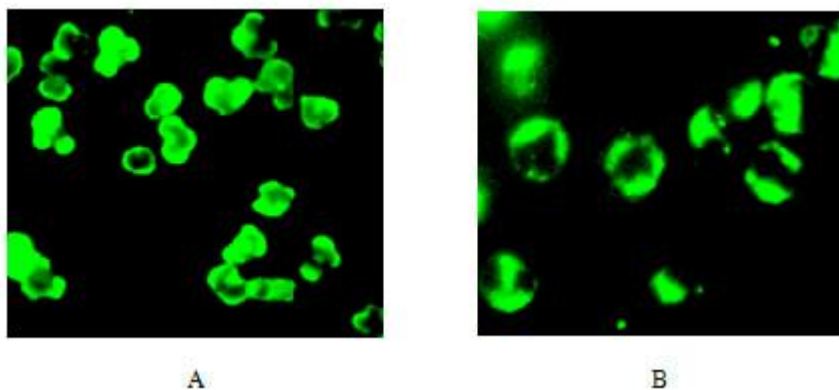


Рисунок 1. ANCA свечение на лабораторных нейтрофильных слайдах (увеличение 400х, фиксатор этанол). А – перинуклеарное свечение (pANCA), В – цитоплазматическое свечение (cANCA).

Выводы. В 2010 г. 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. На полученную лабораторную серию тест-

системы разработан комплект научно-технической документации (лабораторный регламент, технические условия и инструкция по применению).

Литература

1. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц; пер. с англ. М.: Практика, 1998. 459 с.
2. Клиническое руководство по лабораторным тестам / под ред. Н. Тица. М.: Юнимед-пресс, 2003. 54 с.
3. Окороков, А. Н. Диагностика болезней внутренних органов / А. Н. Окороков. М.: Мед. Лит., 2001. Т. 2: Диагностика ревматических и системных заболеваний соединительной ткани. Диагностика эндокринных заболеваний. 576 с.
4. Ткачев, В. К. ИФА-диагностика сифилиса: информ.-метод. пособие / В. К. Ткачев, Т. Г. Вяткина. 3-е изд., перераб. и доп. Новосибирск: ЗАО «Вектор-Бест», 2005. 48 с.
5. Pollard, K. M. Autoantibodies and autoimmunity. Molecular Mechanisms in health and Disease / K. M. Pollard. WILEY-VCH, 2006. 635 p.