

ГЕРПЕТИФОРМНЫЙ ДЕРМАТОЗ ДЮРИНГА: ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

*Колос Ю.В., Лукьянов А.М., Левченя М.В.
Белорусский государственный медицинский университет
Г. Минск, Республика Беларусь*

Введение. Герпетиформный дерматоз Дюринга (ГДД) – это хроническое рецидивирующее заболевание аутоиммунной природы, характеризующееся зудом, полиморфными высыпаниями (уртикарные элементы, сгруппированные папуло-везикулезные и везикулезные элементы, эрозии, эскориации) и ассоциированное с глютенной энтеропатией. Развитие заболевания возможно в любом возрасте, но чаще в 20-60 лет. Мужчины болеют в 1,5-2 раза чаще, чем женщины [1].

«Золотым» стандартом диагностики данной патологии является обнаружение гранулярных отложений IgA на вершущках сосочков дермы при проведении прямой реакции иммунофлюоресценции с кожным биоптатом [1-4].

Серологическими маркерами ГДД являются циркулирующие в крови аутоантитела (преимущественно IgA) к тканевой/эпидермальной трансглутаминазе, глиадину. Для обнаружения данных аутоантител могут быть использованы непрямая реакция иммунофлюоресценции (нРИФ) с субстратом печени или пищевода обезьяны, иммуноблоттинг, иммуноферментный анализ (ИФА) [1-7].

При постановке ИФА пластины с нанесенными антигенами культивируются с исследуемой сывороткой, после чего добавляется антииммуноглобулиновая сыворотка, меченная ферментом. Результаты учитываются по изменению цвета субстрата. В настоящее время доступны коммерческие ИФА тест-системы, содержащие широкий набор антигенов, таких как: тканевая и эпидермальная трансглутаминаза, глиадин, деаминированные пептиды, полученные из глиадина. Данные антигены, как правило, получены генно-инженерным путём и имеют высокую степень очистки. Это обуславливает высокую специфичность (до 98-100%) и чувствительность (до 96-98%) данного теста. Также метод ИФА исключает субъективный фактор, связанный с визуальной оценкой результатов, как в случае с нРИФ [3, 4, 6, 7].

Цель работы: оценить диагностическую значимость иммуноферментного анализа для диагностики герпетиформного дерматоза Дюринга.

Материалы и методы.

В качестве материала для проведения ИФА использовали 22 сыворотки пациентов с аутоиммунными буллезными дерматозами со следующими клиническими диагнозами (МКБ 10):

1. L 13.0 Герпетиформный дерматоз Дюринга (n=14).
2. L12.0 Буллезный пемфигоид (n=3);
3. L10.0 Вульгарная пузырчатка (n=5).

Контролем служили сыворотки здоровых доноров (n=10).

Клинический диагноз выставляли на основании данных анамнеза, осмотра пациентов, цитологического анализа содержимого пузырей.

Иммуноферментный анализ проводили с использованием тест-систем Euroimmun Anti-Tissue Transglutaminase ELISA (Ig A) и Euroimmun Anti-Gliadin (CAF-3X) ELISA (Ig A). В состав данных тест-систем ИФА входили 12 восьми-луночных стрипов, покрытых антигенным субстратом (тканевая трансглутаминаза и деаминированные пептиды, полученные из глиадина соответственно), а также ряд вспомогательных компонентов, необходимых для постановки ИФА: положительный и отрицательный контроли, калибраторы (3 штуки), ферментативный конъюгат IgA, буфер для разведения образцов, промывочный буфер (10х концентрат), раствор хромогена (тетраметилбензидин), стоп-реагент (0,5 М серная кислота), инструкция по применению.

В отдельные лунки планшета для ИФА вносили в соответствии со схемой внесения реагентов по 100 мкл калибраторов, положительного и отрицательного контролей, разведенных образцов сыворотки крови. Инкубировали при комнатной температуре (18-25°C) в течение 30 минут. Удаляли содержимое лунок, затем последовательно промывали все лунки 3 раза, каждый раз внося по 300 мкл приготовленного промывочного буфера в каждую лунку. Далее вносили в лунки планшета по 100 мкл конъюгата фермента (меченных пероксидазой антител к IgA человека). Инкубировали при комнатной температуре (18-25 °C) в течение 30 минут. Промывали, как описано выше. Вносили в лунки планшета по 100 мкл раствора хромоген/субстрат. Инкубировали при комнатной температуре (18-25°C) в течение 15 минут (предохраняя от воздействия прямых солнечных лучей). Далее вносили в лунки планшета по 100 мкл стоп-реагента в той же последовательности и с той же скоростью, как и раствор хромоген/субстрат.

С помощью планшетного спектрофотометра BioTek ELx800 измеряли интенсивность окрашивания в лунках при длине волны 450 нм.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программного обеспечения STATISTICA 10.0, нормальность распределения оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка.

Результаты и обсуждение. Аутоантитела (Ig A) к глиадину выявлены у 8 из 14 пациентов с клиническим диагнозом L 13.0 ГДД (57,1% пациентов), что свидетельствует в пользу данного диагноза. Концентрации антител к глиадину в позитивных сыворотках (>20 ОЕд/мл) варьировали от 21,6 до 78,7 ОЕд/мл. Значения концентраций антител характеризовались ненормальным распределением ($p < 0,05$), медиана (Me) составила 8,8 ОЕд/мл, квартили (25%-75%) - 3,4-30,8 ОЕд/мл (таблица 1).

Таблица 1 – Содержание антител в сыворотках пациентов (тест-системы Euroimmun Anti-Gliadin (CAF-3X) ELISA (Ig A) и Euroimmun Anti-Tissue Transglutaminase ELISA (Ig A]).

№ п/п (n=22)	Клинический диагноз (МКБ-10)	Антитела (IgA) к глиадину, ОЕд/мл*	Антитела (IgA) к трансглутаминазе, ОЕд/мл*
1	L 10.0	6,0	4,4
2	L 13.0	0,2	6,2
3	L 10.0	55,4	27,1
4	L 10.0	0,3	0,0
5	L 10.0	8,9	2,6
6	L 13.0	30,8	11,1
7	L 13.0	35,9	0,8
8	L 13.0	54,7	67,6
9	L 13.0	21,6	3,9
10	L 13.0	26,4	12,8
11	L 13.0	12,8	17,4
12	L 13.0	23,3	4,0
13	L 13.0	8,4	5,7
14	L 13.0	7,1	0,0
15	L 13.0	0,0	1,9
16	L 12.0	3,4	4,8
17	L 10.0	0,0	0,0
18	L 12.0	0,7	5,5
19	L 13.0	8,7	0,9
20	L 13.0	52,2	3,8
21	L 12.0	4,2	0,0
22	L 13.0	78,7	54,5
Me (25%-75%)		8,8 (3,4-30,8)	4,2 (0,9-11,1)

*диагностический титр антител 20 ОЕд/мл.

Аутоантитела к тканевой трансглутаминазе (Ig A) выявлены у 2 пациентов из 14 с клиническим диагнозом L 13.0 ГДД (14,3% пациентов), что также свидетельствует в пользу данного диагноза. Концентрации антител к тканевой трансглутаминазе в позитивных сыворотках (> 20 ОЕд/мл) варьировали от 27,1 до 67,4 ОЕд/мл. Значения концентраций антител характеризовались ненормальным распределением ($p < 0,05$), медиана (Me) составила 4,2 ОЕд/мл, квартили (25%-75%) - 0,9-11,1 ОЕд/мл (таблица 1).

В 2 сыворотках пациентов с L 13.0 ГДД выявлены аутоантитела как к глиадину, так и к тканевой трансглутаминазе.

Таким образом, только у 8 пациентов из 14 (57,1%) диагноз L 13.0 Герпетиформный дерматоз Дюринга был подтвержден серологически. В 6 сыворотках пациентов с клиническим диагнозом ГДД аутоантитела к транsgлютаминазе и глиадину в диагностически значимых титрах не выявлены, что вызывает сомнения в правильности постановки диагноза ГДД и требует дальнейшего диагностического поиска.

В сыворотках пациентов с клиническим диагнозом L 10.0 Вульгарная пузырчатка и L 12.0 Буллезный пемфигоид аутоантитела к тканевой транsgлютаминазе и глиадину отсутствовали либо выявлялись в диагностически незначимых титрах, что объясняется другим антигенным спектром при этих заболеваниях и выработкой аутоантител преимущественно к десмоглеину-1 и -3 в случае пузырчатки и антигенам BP180 и BP230 при буллезном пемфигоиде. Однако у одного пациента с клиническим диагнозом L10.0 Вульгарная пузырчатка выявлены аутоантитела к транsgлютаминазе и глиадину в высоком диагностическом титре, что требует дальнейшей верификации диагноза в данном случае.

В группе контрольных сывороток исследуемые аутоантитела не определялись или присутствовали в очень низких титрах.

Выводы.

1. Показана возможность использования иммуноферментного анализа для диагностики герпетиформного дерматоза Дюринга.

2. Полученные данные свидетельствуют о возможной гипердиагностике герпетиформного дерматоза Дюринга в случае постановки диагноза только на основании клинических и рутинных лабораторных данных (цитологическом методе).

3. Иммунологические методики должны быть обязательным этапом верификации диагноза герпетиформного дерматоза Дюринга.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Emedicine Dermatology: Dermatitis Herpetiformis [Electronic resource] / 2012. - Mode of access: <http://emedicine.medscape.com/article/1062640-overview>
2. Direct immunofluorescence in cutaneous vesiculobullous lesions [Electronic resource] / 2012. – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18306538>.
3. Schmidt E. Modern diagnosis of autoimmune blistering skin diseases / E. Schmidt [et. al.] // Autoimmun. Rev. - 2010. - №10. - P. 84-89.
4. Sidonia Mihai. Immunopatology and molecular diagnosis of autoimmune bullous diseases / Mihai Sidonia [et al.] // J. Cell. Mol. Med. - 2007. - № 3. Vol. 11. - P. 462-481.
5. Pas HH. Immunoblot assay in differential diagnosis of autoimmune blistering skin diseases / HH. Pas // Clin. Dermatol. – 2001. - №19. - P. 622-630.
6. Recombinant Human Tissue Transglutaminase ELISA for Diagnosis Of Gluten-sensitive Enteropathy [Electronic resource] / 2013. - Mode of access: <http://www.clinchem.org/content/45/12/2142.long>
7. Transglutaminases as diagnostically relevant autoantigens in patients with gluten sensitivity [Electronic resource] / 2013. - Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16405713>