

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 616-002.77-078.33-073.537]:681.518

Александрова Е.Н.¹, Верижникова Ж.Г.¹, Новиков А.А.¹, Баранов А.А.², Абайтова Н.Е.², Лапкина Н.А.², Роггенбук Д.³, Насонов Е.Л.¹**АВТОМАТИЗИРОВАННЫЙ АНАЛИЗ АНТИНУКЛЕАРНЫХ АНТИТЕЛ МЕТОДОМ НЕПРЯМОЙ РЕАКЦИИ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ HEP-2-КЛЕТОК**

¹ФГБУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В.А. Насоновой» РАМН, 115522, г. Москва, Российская Федерация; ²ГБОУ ВПО «Ярославская государственная медицинская академия» Минздрава России, 150000, г. Ярославль, Российская Федерация; ³Бранденбургский технический университет, г. Котбус-Сенфтенберг, 01968, г. Сенфтенберг, Германия

Выявление антинуклеарных антител (АНА) в сыворотке крови на основе непрямой реакции иммунофлюоресценции (НРИФ) с использованием клеток линии HEP-2 (НРИФ-HEP-2) – золотой стандарт и ключевой скрининговый метод лабораторной диагностики аутоиммунных ревматических заболеваний (РЗ). Автоматизированные системы интерпретации образцов флюоресценции способствуют стандартизации и повышению эффективности определения содержания АНА методом НРИФ-HEP-2.

Цель – сравнительный анализ автоматизированной и визуальной интерпретации результатов НРИФ-HEP-2 при определении содержания АНА у пациентов с РЗ.

Уровень АНА в сыворотках у 1178 больных с РЗ определяли методом НРИФ-HEP-2. Результаты НРИФ-HEP-2 оценивали путем визуальной микроскопии и с использованием автоматизированной платформы AKLIDES.

Степень согласованности позитивных/негативных результатов обнаружения ($\kappa=0,5$), типов ($\kappa = 0,7$) и титров/интенсивности свечения ($\kappa=0,45$) АНА при автоматизированной и традиционной интерпретации НРИФ-HEP-2 являлась хорошей. Несовпадение позитивных/негативных результатов исследования содержания АНА по данным автоматизированного и визуального методов оценки НРИФ-HEP-2 отметили у 18,5% пациентов. Автоматизированным методом наиболее часто определяли гомогенное (37,6%) и крапчатое (32,3%) свечение ядра; у 21,4% больных тип свечения не дифференцировался. Визуальным методом в сыворотках у большинства (72,8%) пациентов выявляли смешанный тип свечения. Смешанное свечение распознавалось системой AKLIDES как гомогенное (40,5%), крапчатое (32,7%), нуклеолярное (2,4%), центромерное (0,9%), недифференцированное (23,5%). При визуальном исследовании образцов флюоресценции с недифференцированным типом свечения у 79,8% больных идентифицировали смешанное свечение, у 5,9% – гомогенное, у 14,3% – крапчатое. Титры АНА < 1:160 ассоциировались с интенсивностью свечения 0/±; 1:160 – 0, ±, +, ++; 1:320 – +, ++; 1:640 – ++, +++; ≥ 1:1280 – +++, +++++.

В рутинной практике автоматизированная система AKLIDES позволяет идентифицировать позитивные/негативные результаты определения содержания АНА сопоставимо с классическим визуальным методом интерпретации НРИФ-HEP-2 и прогнозировать максимальный конечный титр АНА в сыворотках у больных с РЗ по интенсивности флюоресценции. Для подтверждения результатов автоматизированной оценки типов ядерного свечения и уточнения титров АНА рекомендуется дополнительное экспертное визуальное исследование позитивных образцов флюоресценции.

Ключевые слова: антинуклеарные антитела; непрямая реакция иммунофлюоресценции; HEP-2-клетки; автоматизированная система интерпретации клеточных флюоресцентных тестов; аутоиммунные ревматические заболевания.

Aleksandrova E.N.¹, Verijnikova J.G.¹, Novikov A.A.¹, Baranov A.A.², Abaitova N.E.², Lapkina N.A.², Roggenbuk D.³, Nasonov E.L.¹

THE AUTOMATED ANALYSIS OF ANTI-NUCLEAR ANTIBODIES USING TECHNIQUE OF INDIRECT REACTION OF IMMUNOFLOURESCENCE WITH APPLICATION OF HEP-2-CELLS

¹V.A. Nasonova The research institute of rheumatology, 115522, Moscow, Russia; ²The Yaroslavl state medical academy, 150000 Yaroslavl, Russia; ³The Brandenburg technical university Cottbus-Senfthenberg, 01968, Senfthenberg, Germany

The identification of antinuclear antibodies in blood serum based on indirect reaction of immunofluorescence using cells of line HEP-2 (IRIF HEP-2) - a «golden standard» and key screening technique of laboratory diagnostic of autoimmune rheumatic diseases. The automated systems of interpretation of samples of fluorescence promote standardization and increase effectiveness of detection of content of antinuclear antibodies with IRIF HEP-2 technique. The study was organized to comparatively analyze automated and visual interpretation of results of IRIF HEP-2 in detection of content antinuclear antibodies in patients with rheumatic diseases. The level of antinuclear antibodies in blood serums of 1178 patients with rheumatic diseases was detected using IRIF HEP-2 technique. The results of IRIF HEP-2 were evaluated by visual microscopy and using automated

Для корреспонденции:

Александрова Елена Николаевна, науч. сотр.
Адрес: 115522, Москва, Каширское ш., 34А
E-mail: irramnlab@rambler.ru

platform «AKLIDES». The degree of consistency of positive/negative results of detection ($k=0.5$), types ($k=0.7$) and titers/intensity of fluorescence ($k=0.45$) of antinuclear antibodies under automated and traditional interpretation of IRIF HEp-2 was «good». The discordance of positive/negative results of analysis of content of IRIF HEp-2 was established in 18.5% of patients. The automated technique more often detected homogeneous (37.6%) and speckled (32.3%) fluorescence of nucleus. At the same time, there were no differentiation of type of fluorescence in 21.4% of patients. The visual technique detected mixed type of fluorescence in blood serums of most of the patients (72.8%). The mixed fluorescence was identified by system «AKLIDES» as homogeneous (40.5%), speckled (32.7%), nucleolar (2.4%), centromeric (0.9%), undifferentiated (23.5%). Under visual analysis of samples of fluorescence with undifferentiated type of fluorescence was identified as mixed (79.8%), homogeneous (5.9%) and speckled (14.3%). The titers of antinuclear antibodies less than 1:160 associated with intensity of fluorescence 0/B±; 1:160 - 0, B±, +, ++; more than 1:1280 - +++, +++++.

In common practice the automated system «AKLIDES» permits identifying positive/negative results of detection of content of antinuclear antibodies comparably with «classic» visual technique of interpretation of IRIF HEp-2 and prognosticate maximal finite tier of antinuclear antibodies in serums in patients with rheumatic diseases according intensity of fluorescence. To confirm results of automated evaluation of types of nuclear fluorescence and to specify titers of antinuclear antibodies it is recommended to apply additional expert visual analysis of positive samples of fluorescence.

Key words: antinuclear antibodies; indirect reaction of immunofluorescence; Hep-2 cells; automated system of interpretation of cell fluorescent test; autoimmune rheumatic diseases.

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 являются основным серологическим маркером аутоиммунных ревматических заболеваний (РЗ) [1–4]. Положительные результаты определения содержания АНА входят в число диагностических критериев системной красной волчанки (СКВ) [2, 5, 6], системной склеродермии (ССД) [7, 8], синдрома Шегрена (СШ) [9, 10], полимиозита/дерматомиозита (ПМ/ДМ) [11], смешанного заболевания соединительной ткани [12], лекарственной волчанки [2], аутоиммунного гепатита [2]; их применяют для оценки активности и прогноза РЗ [2–4, 6, 8, 10, 13]; они позволяют идентифицировать отдельные клинико-лабораторные субтипы РЗ [4, 8, 10, 14], служат предикторами развития аутоиммунных РЗ у бессимптомных пациентов [15]. Золотым стандартом и первичным скрининговым методом определения содержания АНА в сыворотке крови является непрямая реакция иммунофлюоресценции (ИРИФ) с использованием в качестве субстрата клеток линии HEp-2 (эпителиальные клетки рака гортани человека) (ИРИФ-HEp-2) [2, 16, 17]. Применение стандартизованных HEp-2-клеток позволяет существенно повысить чувствительность метода и достоверно описать различные типы свечения ядра. При тестировании АНА методом ИРИФ их обозначают как антинуклеарный фактор (АНФ). У пациентов с положительным АНФ рекомендуется проведение подтверждающих тестов на специфические АНА к отдельным ядерным антигенам с использованием методов иммуноферментного анализа (ИФА), иммуноблотта и др. [1–4, 17]. Другие скрининговые методы определения содержания АНА (ИФА, мультиплексные технологии), устанавливающие наличие в сыворотках антител к ограниченному количеству очищенных/рекомбинантных антигенов или смеси антигенов (ядерному гомогенату) с измененными либо утраченными эпитопами, увеличивают процент ложноотрицательных результатов и не могут заменить тестирование АНФ с помощью ИРИФ [16, 17]. Вместе с тем рутинная техника флюоресцентной микроскопии имеет ряд ограничений, к которым относятся методические различия (тип микроскопа, используемые тест-системы и реагенты, время инкубации и др.), субъективная характеристика титра и типа свечения АНФ, необходимость длительного обучения персонала, отсутствие квалифицированной экспертной оценки результатов исследования, что приводит к значительной внутри- и межлабораторной вариабельности полученных данных. Разработка автоматизированных систем интерпретации клеточных флюоресцентных тестов создает предпосылки для стандартизации и улучшения вос-

производимости ИРИФ-HEp-2 при определении содержания АНА у пациентов с РЗ [17–19].

Цель исследования – сравнительный анализ автоматизированной и визуальной интерпретации результатов ИРИФ-HEp-2 при определении содержания АНА в сыворотках у пациентов с РЗ.

Материалы и методы. Исследовали сыворотки у 1178 пациентов (185 с СКВ, 148 с СШ, 181 с ССД, 44 с ПМ/ДМ, 60 с перекрестным синдромом, 35 с антифосфолипидным синдромом, 525 с другими РЗ), наблюдавшихся в ФГБУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В.А. Насоновой» РАМН в течение 2012 г. Содержание АНА определяли методом ИРИФ-HEp-2 с помощью коммерческого набора реагентов AKLIDES® ANA («Medipan GmbH», Германия) согласно инструкции фирмы-изготовителя. Результаты ИРИФ-HEp-2 обрабатывали с использованием автоматизированной платформы AKLIDES («Medipan GmbH», Германия) на основе многопараметрического анализа внутриклеточных структур [18–21] и путем визуальной оценки образцов флюоресценции под микроскопом AXIOSKOP 40 («Zeiss», Германия) двумя экспертами. При анализе полученных данных учитывали максимальный титр обнаружения АНФ в исследуемых сыворотках, интенсивность и тип свечения [2, 3]. Титры АНФ определяли визуальным методом. Нормальные титры АНФ составляли <1:160, низкопозитивные – 1:160–1:320, умеренно-позитивные – 1:640, высокопозитивные – 1:1280 и выше. Интенсивность флюоресцентного сигнала оценивали автоматизированной системой AKLIDES в условных единицах (усл. ед.) и +: значения < 70 усл. ед. соответствовали -; 70–100 усл. ед. – +/-; 100–200 усл. ед. – +; 200–500 усл. ед. – ++; 500–1000 усл. ед. – +++; ≥1000 усл. ед. – +++++. Определяли следующие типы свечения: гомогенное, крапчатое, дискретное крапчатое (центромерное), нуклеолярное. АНФ-позитивные сыворотки со смешанным типом свечения, который не идентифицируется анализатором AKLIDES, рассматривали отдельно.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0 («StatSoft», США). Для измерения степени согласованности автоматизированной и визуальной интерпретации результатов определения содержания АНА применяли коэффициент к Коэна [22]. Согласованность результатов оценивали как слабую ($k < 0,4$), хорошую ($0,4 < k \leq 0,75$) и высокую ($k > 0,75$).

Результаты и обсуждение. Сравнительная частота позитивных/негативных результатов исследования уровня АНФ в сыворотках у 1178 пациентов с РЗ при использовании автоматизированной и визуальной флюоресцентной микроскопии представлена в табл. 1. Позитивные/негативные результаты определения содержания АНФ на анализаторе AKLIDES и рутинным методом совпадали у 81,5% больных (позитивные у 66,6%, негативные у 14,9%). Среди 942 пациентов, пози-

Таблица 1

Частота положительных и отрицательных результатов определения содержания АНФ в сыворотках у 1178 пациентов с РЗ при интерпретации данных с помощью автоматизированной системы AKLIDES и визуальной микроскопии

Результат автоматизированной интерпретации	Результат визуальной интерпретации		Итого
	положительный $\geq 1:160$	негативный $< 1:160$	
Позитивный $\geq 1:160$	784 (66,6)	158 (13,4)	942 (80,0)
Негативный $< 1:160$	60 (5,1)	176 (14,9)	236 (20,0)
Всего ...	844 (71,6)	334 (28,4)	1178 (100)

Примечание. Здесь и в табл. 2–4 в скобках указан процент.

тивных по данным системы AKLIDES, у 784 (83,2%) положительные результаты выявления АНФ были подтверждены визуальным методом. Среди 236 больных с отрицательными результатами определения содержания АНФ на анализаторе AKLIDES 176 (74,6%) имели негативные показатели и в визуальном тесте. Несовпадение позитивных и негативных результатов исследования содержания АНА при сравнении автоматизированного и визуального методов оценки НРИФ-НЕР-2 отметили у 218 (18,5%) пациентов. 158 (13,4%) больных были АНФ-позитивными при использовании платформы AKLIDES, но АНФ-негативными по данным визуальной микроскопии. У 60 (5,1%) пациентов АНФ выявляли классическим визуальным методом, и он не идентифицировался автоматизированной системой AKLIDES. Степень согласованности позитивных/негативных результатов исследования уровня АНФ при интерпретации данных с помощью анализатора AKLIDES и визуальной микроскопии оценили как хорошую ($\kappa = 0,5$).

В образцах сывороток у АНФ-позитивных пациентов с РЗ ($n = 784$) провели сравнительный анализ результатов оценки типов свечения при использовании системы AKLIDES и визуальной техники (табл. 2). Автоматизированным методом наиболее часто определяли гомогенное и крапчатое свечение (у 37,6 и 32,3% больных соответственно), у 21,4% – недифференцированный тип свечения. Визуальным методом в сыворотках у большинства (72,8%) пациентов выявляли смешанный (гомогенный + крапчатый) тип свечения АНФ. Смешанное свечение ($n = 571$) распознавалось анализатором AKLIDES как гомогенное у 231 (40,5%) больных, крапчатое – у 187 (32,7%), нуклеолярное – у 14 (2,4%), центромерное – у 5 (0,9%), недифференцированное – у 134 (23,5%). При визуальном исследовании образцов флюоресценции ($n = 168$) с недифференцированным типом свечения в 134 (79,8%) из них идентифицировали смешанное свечение, в 10 (5,9%) – гомогенное, в 24 (14,3%) – крапчатое. В табл. 3 сопоставлены результаты автоматизированной и визуальной интерпретации типов свечения у АНФ-позитивных пациентов с РЗ ($n = 179$)

Таблица 2

Результаты автоматизированной и визуальной интерпретации типов свечения в сыворотках у 784 АНФ-позитивных пациентов с РЗ

Тип свечения	Интерпретация		p
	автоматизированная	визуальная	
Homogeneous (гомогенное)	295 (37,6)	61 (7,8)	$< 0,001$
Speckled (крапчатое)	253 (32,3)	100 (12,8)	$< 0,001$
Nucleolar (нуклеолярное)	24 (3,1)	9 (1,1)	0,013
Centromere (центромерное)	44 (5,6)	43 (5,5)	$> 0,05$
Недифференцированное	168 (21,4)	0	$< 0,001$
Homogeneous + Speckled (смешанное)	0	571 (72,8)	$< 0,001$
Всего ...	784	784	

после исключения из исследования случаев с недифференцированным и смешанным свечением ($n = 605$), которые не распознаются системой AKLIDES. Автоматизированная оценка результатов флюоресцентных тестов характеризовалась более частым выявлением гомогенного (35,7%) и крапчатого (36,9%) свечения, визуальная – крапчатого свечения (42,4%). Нуклеолярное и центромерное свечение идентифицировали обоими методами примерно с одинаковой частотой (5–5,5 и 21,9–24,1% соответственно). Совпадение по типам свечения при автоматизированной и визуальной интерпретации результатов НРИФ-НЕР-2 (без учета недифференцированного и смешанного свечения) наблюдали у 143 (80%) больных; согласованность типов свечения была хорошей ($\kappa = 0,7$).

Взаимосвязь между титрами АНФ и интенсивностью сигналов флюоресценции показана в табл. 4. Как следует из табл. 4, нормальные титры АНФ ($< 1:160$) ассоциировались с интенсивностью свечения $0/\pm$ (у 72,2%); $1:160$ – с $0/\pm$, $+$ и $++$ (у 99,6%); $1:320$ – с $+$ и $++$ (у 80,7%); $1:640$ – с $++$ и $+++$ (у 83,2%); $\geq 1:1280$ – с $+++$ и $++++$ (у 100%) (см. табл. 4). Степень согласованности титров и интенсивности свечения АНФ у 1178 пациентов с РЗ определили как хорошую ($\kappa=0,45$).

Полученные результаты подтверждают данные литературы о хорошей согласованности автоматизированной и визуальной интерпретации НРИФ-НЕР-2 при исследовании содержания АНА в сыворотках у пациентов с аутоиммунными РЗ [20, 21, 23–26].

Позитивные/негативные результаты определения уровня АНФ рутинным методом и на анализаторе AKLIDES совпадали у 81,5% пациентов с РЗ ($\kappa=0,5$). В работах других авторов согласованность позитивных/негативных результатов выявления АНА по данным автоматизированной и визуальной оценки НРИФ-НЕР-2 достигала 90–99,4% ($\kappa = 0,554–0,984$) [20, 21, 23–26]. В целом у обследованных нами пациентов

Таблица 3

Результаты автоматизированной и визуальной интерпретации типов свечения в сыворотках у 179 АНФ-позитивных пациентов с РЗ*

Визуальная интерпретация/Автоматизированная интерпретация	Homogeneous (гомогенный)	Speckled (крапчатый)	Nucleolar (нуклеолярный)	Centromere (центромерный)	Итого
Homogeneous (гомогенный)	41 (22,9)	21 (11,7)	0	2 (1,1)	64 (35,8)
Speckled (крапчатый)	10 (5,6)	54 (30,2)	0	2 (1,1)	66 (36,9)
Nucleolar (нуклеолярный)	0	1 (0,6)	9 (5,0)	0	10 (5,6)
Centromere (центромерный)	0	0	0	39 (21,8)	39 (21,8)
Всего ...	51 (28,5)	76 (42,5)	9 (5,0)	43 (24,0)	179

Примечание. * – из анализа исключили АНФ-позитивных больных ($n = 605$) с недифференцированным и смешанным типами свечения.

Взаимосвязь между титрами и интенсивностью свечения АНФ в сыворотках у 1178 пациентов с РА

Титр (визуальный метод)/Интенсивность свечения (AKLIDES)	< 1:160	1:160	1:320	1:640	≥ 1:1280	Всего
0 / ±	241 (20,5)	71 (6,0)	19 (1,6)	5 (0,4)	0	336 (28,5)
+	81 (6,9)	80 (6,8)	49 (4,2)	1 (0,1)	0	211 (17,9)
++	12 (1,0)	73 (6,2)	185 (15,7)	84 (7,1)	0	354 (30,0)
+++	0	1 (0,1)	32 (2,7)	168 (14,3)	10 (0,8)	211 (17,9)
++++	0	0	5 (0,4)	45 (3,8)	16 (1,4)	66 (5,6)
Итого...	334 (28,4)	225 (19,1)	290 (24,6)	303 (25,7)	26 (2,2)	1178 (100)

с РЗ ($n = 1178$) чувствительность определения содержания АНА с помощью автоматизированной платформы AKLIDES была выше, чем при использовании визуальной микроскопической техники (80 и 71,6% соответственно; $p < 0,05$). Данные о более высокой чувствительности выявления АНА на анализаторе AKLIDES (95–97%) по сравнению с таковой при ручном методе (74–92%) у больных ССД и ПМ/ДМ представлены М. Kivity и соавт. [23]. Возможными причинами несовпадения результатов автоматизированной и визуальной идентификации позитивности/негативности ядерного свечения являются расхождения в оценке отрицательных/низких титров АНФ и интенсивности сигнала флюоресценции; учет цитоплазматического свечения системой AKLIDES; артефакты, связанные с некачественной окраской препаратов.

Одной из важных проблем автоматизированной оценки характера ядерного свечения при определении содержания АНА методом НРИФ-НЕР-2 служит трудность дифференцировки гомогенного типа свечения от различных форм мелкого диффузного крапчатого свечения ядра и цитоплазмы клетки. Другим сложным аспектом автоматизированной обработки результатов клеточных флюоресцентных тестов является распознавание смешанного свечения при сочетании в одном АНФ-позитивном образце сыворотки больного 4–5 различных типов флюоресценции за счет аутоантител, реагирующих с множеством ядерных антигенов [20, 21, 25, 26]. В нашей работе автоматизированная система AKLIDES идентифицировала в основном гомогенное (37,6%) и крапчатое (32,3%) свечение, однако у 21,4% больных регистрировала недифференцированный тип свечения, который у 79,8% из них распознавался визуальным методом как смешанный. После исключения из анализа недифференцированного и смешанного свечения совпадение по типам флюоресценции при автоматизированной и визуальной интерпретации положительных результатов НРИФ-НЕР-2 составило 80% ($\kappa = 0,7$). По данным литературы, согласованность результатов автоматизированной и визуальной оценки типов свечения в АНА-позитивных образцах варьирует от 26 до 94% [21, 25, 26]. Расхождения в интерпретации типов ядерного свечения при автоматизированной и визуальной обработке результатов НРИФ-НЕР-2 могут быть связаны с комбинацией различных типов свечения в одном образце (смешанное свечение), наличием редких типов свечения (антител к ядерной мембране, аппарату Гольджи и др.), титрами АНФ. В связи с этим рекомендуется проведение дополнительного визуального исследования АНА-позитивных образцов флюоресценции для уточнения и классификации типов ядерного свечения [20–23, 25, 26].

Полученные результаты подтверждают данные D. Roggenbuck и соавт. [27] о хорошей согласованности титров АНА с интенсивностью флюоресценции, оцениваемой системой AKLIDES, что создает предпосылки для прогнозирования максимальных конечных титров этих аутоантител без дополнительного разведения исследуемых сывороток.

Заключение. В рутинной практике автоматизированная платформа AKLIDES позволяет объективно и быстро идентифицировать позитивные и негативные результаты определе-

ния содержания АНА сопоставимо с классическим визуальным методом интерпретации НРИФ-НЕР-2, а также прогнозировать максимальный конечный титр АНА в сыворотках у пациентов с РЗ по интенсивности сигнала флюоресценции. Для подтверждения результатов автоматизированной оценки типов ядерного свечения и уточнения титров АНА рекомендуется дополнительное экспертное визуальное исследование позитивных образцов флюоресценции.

ЛИТЕРАТУРА

- Wiik A.S., Gordon T.P., Kavanaugh A.F., Lahita R.G., Reeves W., van Venrooij W.J. et al. IUIS/WHO/AF/CDC Committee for the Standardization of Autoantibodies in Rheumatic and Related Diseases. Cutting edge diagnostics in rheumatology: the role of patients, clinicians, and laboratory scientists in optimizing the use of autoimmune serology. *Arthritis Rheum.* 2004; 51: 291–8.
- Solomon D.H., Kavanaugh A.J., Schur P.H.; American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Immunologic Testing Guidelines. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: antinuclear antibody testing. *Arthritis Rheum.* 2002; 47: 434–44.
- Tozzoli R., Bizzaro N., Tonutti E., Villalta D., Bassetti D., Manoni F. et al. Guidelines for the laboratory use of autoantibody tests in the diagnosis and monitoring of autoimmune rheumatic diseases. *Am. J. Clin. Pathol.* 2002; 117: 316–24.
- Александрова Е.Н., Новиков А.А. Лабораторная диагностика ревматических заболеваний. В кн.: *Насонов Е.Л., ред. Ревматология: Клинические рекомендации. 2-е изд.* М.: ГЭОТАР-Медиа; 2010: 19–76.
- Petri M., Orbai A.M., Alarcón G.S., Gordon C., Merrill J.T., Fortin P.R. et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2012; 64: 2677–86.
- Kavanaugh A.F., Solomon D.H.; American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Immunologic Testing Guidelines. Guidelines for immunologic laboratory testing in the rheumatic diseases: anti-DNA antibody tests. *Arthritis Rheum.* 2002; 47: 546–55.
- Jordan S., Maurer B., Michel B., Distler O. Performance of the new EULAR/ACR classification criteria for systemic sclerosis in clinical practice. *Ann. Rheum. Dis.* 2013; 72 (Suppl. 3): 60.
- Reveille J.D., Solomon D.H.; American College of Rheumatology Ad Hoc Committee of Immunologic Testing Guidelines. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: anticentromere, Scl-70, and nucleolar antibodies. *Arthritis Rheum.* 2003; 49: 399–412.
- Васильев В.И., Симонова М.В., Сафонова Т.Н. Критерии диагноза болезни и синдрома Шегрена. В кн.: *Насонова В.А., Бунчук Н.В., ред. Избранные лекции по клинической ревматологии.* М.: Медгиз; 2001: 112–32.
- Kavanaugh A., Tomar R., Reveille J., Solomon D.H., Homburger H.A. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. American College of Pathologists. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2000; 124: 71–81.
- Tanimoto K., Nakano K., Kano S., Mori S., Ueki H., Nishitani H. et al. Classification criteria for polymyositis and dermatomyositis. *J. Rheumatol.* 1995; 22: 668–74.
- Sharp G.C., Irvin W.S., Tan E.M., Gould R.G., Holman H.R. Mixed

- connective tissue disease—an apparently distinct rheumatic disease syndrome associated with a specific antibody to an extractable nuclear antigen (ENA). *Am. J. Med.* 1972; 52: 148–59.
13. Bertsias G., Ioannidis J.P., Boletis J., Cervera R., Dostal C., Font J. et al. EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus. Report of a Task Force of the EULAR Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics. *Ann. Rheum. Dis.* 2008; 67: 195–205.
 14. Hengstman G.J.D., van Engelen B.G.M., Venrooij W.J. Myositis specific autoantibodies: changing insights in pathophysiology and clinical associations. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2004; 16: 692–9.
 15. Bizzaro N., Tozzoli R., Shoenfeld Y. Are we at a stage to predict autoimmune rheumatic diseases? *Arthritis Rheum.* 2007; 56: 1736–44.
 16. Meroni P.L., Schur P.H. ANA screening: an old test with new recommendations. *Ann. Rheum. Dis.* 2010; 69: 1420–2.
 17. Tozzoli R., Bonaguri C., Melegari A., Antico A., Bassetti D., Bizzaro N. Current state of diagnostic technologies in the autoimmunology laboratory. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2013; 51: 129–38.
 18. Willitzki A., Hiemann R., Peters V., Sack U., Schierack P., Rödiger S. et al. New platform technology for comprehensive serological diagnostics of autoimmune diseases. *Clin. Dev. Immunol.* 2012; 2012: 284740. doi: 10.1155/2012/284740.
 19. Roggenbuck D., Hiemann R., Bogdanos D., Reinhold D., Conrad K. Standardization of automated interpretation of immunofluorescence tests. *Clin. Chim. Acta.* 2013; 421: 168–9.
 20. Hiemann R., Büttner T., Krieger T., Roggenbuck D., Sack U., Conrad K. Challenges of automated screening and differentiation of non-organ specific autoantibodies on HEp-2 cells. *Autoimmun. Rev.* 2009; 9: 17–22.
 21. Egerer K., Roggenbuck D., Hiemann R., Weyer M.G., Büttner T., Radau B. et al. Automated evaluation of autoantibodies on human epithelial-2 cells as an approach to standardize cell-based immunofluorescence tests. *Arthritis Res. Ther.* 2010; 12(2): R40.
 22. Cohen J. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educ. Psychol. Measurement.* 1960; 20: 37–46.
 23. Kivity M., Gilburd B., Agmon-Levin N., Carrasco M.G., Tzafirir Y., Sofer Y. et al. A novel automated indirect immunofluorescence autoantibody evaluation. *Clin. Rheumatol.* 2012; 31: 503–9.
 24. Melegari A., Bonaguri C., Russo A., Luisita B., Trenti T., Lippi G. A comparative study on the reliability of an automated system for the evaluation of cell-based indirect immunofluorescence. *Autoimmun. Rev.* 2012; 11: 713–6.
 25. Voigt J., Krause C., Rohwäder E., Saschenbrecker S., Hahn M., Danckwardt M. et al. Automated indirect immunofluorescence evaluation of antinuclear autoantibodies on HEp-2 cells. *Clin. Dev. Immunol.* 2012; 2012: 651058. doi: 10.1155/2012/651058.
 26. Bonroy C., Verfaillie C., Smith V., Persijn L., De Witte E., De Keyser F., Devreese K. Automated indirect immunofluorescence antinuclear antibody analysis is a standardized alternative for visual microscope interpretation. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2013; 51(9): 1771–9. doi: 10.1515/cclm-2013-0016.
 27. Roggenbuck D., Hiemann R., Schierack P., Reinhold D., Conrad K. Digital immunofluorescence enables automated detection of antinuclear antibody endpoint titers avoiding serial dilution. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2014; 52(2): e9–e11. doi: 10.1515/cclm-2013-0543.
 4. Aleksandrova E.N., Novikov A.A. Laboratory diagnosis of rheumatic diseases. In: *Nasonov E.L., ed. Revmatologiya: Klinicheskii rekomendatsii. 2nd ed.* Moscow: GEOTAR Media; 2010: 19–76. (in Russian)
 5. Petri M., Orbai A.M., Alarcón G.S., Gordon C., Merrill J.T., Fortin P.R. et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2012; 64: 2677–86.
 6. Kavanaugh A.F., Solomon D.H.; American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Immunologic Testing Guidelines. Guidelines for immunologic laboratory testing in the rheumatic diseases: anti-DNA antibody tests. *Arthritis Rheum.* 2002; 47: 546–55.
 7. Jordan S., Maurer B., Michel B., Distler O. Performance of the new EULAR/ACR classification criteria for systemic sclerosis in clinical practice. *Ann. Rheum. Dis.* 2013; 72 (Suppl. 3): 60.
 8. Reveille J.D., Solomon D.H.; American College of Rheumatology Ad Hoc Committee of Immunologic Testing Guidelines. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: anticentromere, Scl-70, and nucleolar antibodies. *Arthritis Rheum.* 2003; 49: 399–412.
 9. Vasil'ev V.I., Simonova M.V., Safonova T.N. The criteria for the diagnosis of disease and Sjogren's syndrome. In: *Nasonova V.A., Bunchuk N.V., eds. Izbrannye lektsii po klinicheskoi revmatologii.* Moscow: Medgiz; 2001: 112–32. (in Russian)
 10. Kavanaugh A., Tomar R., Reveille J., Solomon D.H., Homburger H.A. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. American College of Pathologists. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2000; 124: 71–81.
 11. Tanimoto K., Nakano K., Kano S., Mori S., Ueki H., Nishitani H. et al. Classification criteria for polymyositis and dermatomyositis. *J. Rheumatol.* 1995; 22: 668–74.
 12. Sharp G.C., Irvin W.S., Tan E.M., Gould R.G., Holman H.R. Mixed connective tissue disease—an apparently distinct rheumatic disease syndrome associated with a specific antibody to an extractable nuclear antigen (ENA). *Am. J. Med.* 1972; 52: 148–59.
 13. Bertsias G., Ioannidis J.P., Boletis J., Cervera R., Dostal C., Font J. et al. EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus. Report of a Task Force of the EULAR Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics. *Ann. Rheum. Dis.* 2008; 67: 195–205.
 14. Hengstman G.J.D., van Engelen B.G.M., Venrooij W.J. Myositis specific autoantibodies: changing insights in pathophysiology and clinical associations. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2004; 16: 692–9.
 15. Bizzaro N., Tozzoli R., Shoenfeld Y. Are we at a stage to predict autoimmune rheumatic diseases? *Arthritis Rheum.* 2007; 56: 1736–44.
 16. Meroni P.L., Schur P.H. ANA screening: an old test with new recommendations. *Ann. Rheum. Dis.* 2010; 69: 1420–2.
 17. Tozzoli R., Bonaguri C., Melegari A., Antico A., Bassetti D., Bizzaro N. Current state of diagnostic technologies in the autoimmunology laboratory. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2013; 51: 129–38.
 18. Willitzki A., Hiemann R., Peters V., Sack U., Schierack P., Rödiger S. et al. New platform technology for comprehensive serological diagnostics of autoimmune diseases. *Clin. Dev. Immunol.* 2012; 2012: 284740. doi: 10.1155/2012/284740.
 19. Roggenbuck D., Hiemann R., Bogdanos D., Reinhold D., Conrad K. Standardization of automated interpretation of immunofluorescence tests. *Clin. Chim. Acta.* 2013; 421: 168–9.
 20. Hiemann R., Büttner T., Krieger T., Roggenbuck D., Sack U., Conrad K. Challenges of automated screening and differentiation of non-organ specific autoantibodies on HEp-2 cells. *Autoimmun. Rev.* 2009; 9: 17–22.
 21. Egerer K., Roggenbuck D., Hiemann R., Weyer M.G., Büttner T., Radau B. et al. Automated evaluation of autoantibodies on human epithelial-2 cells as an approach to standardize cell-based immunofluorescence tests. *Arthritis Res. Ther.* 2010; 12(2): R40.
 22. Cohen J. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educ. Psychol. Measurement.* 1960; 20: 37–46.
 23. Kivity M., Gilburd B., Agmon-Levin N., Carrasco M.G., Tzafirir Y., Sofer Y. et al. A novel automated indirect immunofluorescence autoantibody evaluation. *Clin. Rheumatol.* 2012; 31: 503–9.
 24. Melegari A., Bonaguri C., Russo A., Luisita B., Trenti T., Lippi G. A comparative study on the reliability of an automated system for the

REFERENCES

- evaluation of cell-based indirect immunofluorescence. *Autoimmun. Rev.* 2012; 11: 713–6.
25. Voigt J., Krause C., Rohwäder E., Saschenbrecker S., Hahn M., Danckwardt M. et al. Automated indirect immunofluorescence evaluation of antinuclear autoantibodies on HEp-2 cells. *Clin. Dev. Immunol.* 2012; 2012: 651058. doi: 10.1155/2012/651058.
26. Bonroy C., Verfaillie C., Smith V., Persijn L., De Witte E., De Keyser F., Devreese K. Automated indirect immunofluorescence antinuclear antibody analysis is a standardized alternative for visual microscope interpretation. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2013; 51(9): 1771-9. doi: 10.1515/cclm-2013-0016.
27. Roggenbuck D., Hiemann R., Schierack P., Reinhold D., Conrad K. Digital immunofluorescence enables automated detection of antinuclear antibody endpoint titers avoiding serial dilution. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2014; 52(2): e9–e11. doi: 10.1515/cclm-2013-0543.

Поступила 16.01.14

Received 16.01.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 616.514-092:612.017.1]-036.12-078.33

Ащина Л.А., Баранова Н.И., Коженкова С.В.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЦИТОКИНОВОЙ ПРОДУКЦИИ В СЫВОРОТКЕ И ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ АУТОИММУННОЙ КРАПИВНИЦЕЙ

ГБОУ ДПО «Пензенский институт усовершенствования врачей» Минздрава России, 440060, г. Пенза, Россия

Провели анализ уровня интерлейкина (IL)-4, IL-10, IL-17, IL-18 и интерферона (IFN) γ в сыворотке и в спонтанной и индуцированной продукции клетками иммунной системы методом *ex vivo* у 100 больных хронической аутоиммунной крапивницей (ХАК) и 30 здоровых лиц. У больных ХАК выявили повышение спонтанной продукции IL-4, спонтанной и индуцированной продукции IL-17 и IFN γ , снижение спонтанной и индуцированной продукции IL-18, что указывает на одновременную активацию Th1-, Th2- и Th17-популяции T-лимфоцитов. При изучении уровня цитокинов в сыворотке крови выявили только снижение уровня IL-4 у больных ХАК по сравнению с таковым у здоровых лиц. Уровень других изучаемых цитокинов достоверно не различался, что доказывает малую информативность определения содержания цитокинов в сыворотке крови и преимущество использования метода *ex vivo* с определением уровня цитокинов в цельной крови.

Ключевые слова: хроническая аутоиммунная крапивница; цитокины; спонтанная продукция; индуцированная продукция; метод *ex vivo*.

Aschina L.A., Baranova N.I., Kojenkova S.V.

THE COMPARATIVE CHARACTERISTIC OF CYTOKINE PRODUCTION IN SERUM AND WHOLE BLOOD IN PATIENTS WITH CHRONIC AUTOIMMUNE NETTLE RASH

The Pensa institute of post-graduate medical education of Minzdrav of Russia, 440060 Pensa, Russia

The sampling of 100 patients with chronic autoimmune nettle rash and control group of 30 healthy donors was analyzed for identification of level of interleukin (IL)-4, IL-10, IL-17, IL-18 and γ -interferon (IFN) in serum of patients. The same sampling was examined using method *ex vivo* for spontaneous and induced production by cells of immune system. In patients with chronic autoimmune nettle rash increasing of spontaneous production of IL-4 and spontaneous and induced production of IL-17 and IFN was identified. The decreasing of spontaneous and induced production of IL-18 was detected too. These occurrences indicate to simultaneous activation of Th1, Th2 and Th17-population of T-lymphocytes. The analysis of level of cytokines in blood serum established only decreasing of level of IL-4 in patients with chronic autoimmune nettle rash as compared with healthy individuals. The level of other analyzed cytokines had no reliable differences that demonstrate both low informativeness of detection of content of cytokines in blood serum and advantage of application of method *ex vivo* with detection of level of cytokines in whole blood.

Key words: chronic autoimmune nettle rash; cytokines; spontaneous production; induced production; method *ex vivo*.

Введение. Одной из актуальных проблем современной алергологии является хроническая аутоиммунная крапивница (ХАК), доля которой в структуре хронической крапивницы (ХК) достигает 45% [1]. Эта форма ХК является наиболее сложной в плане тяжести течения заболевания, понимания патогенетических механизмов и лечения пациентов. Результаты исследований последних лет доказали роль интерлейкина (IL)-4, IL-10, IL-17, IL-18 и интерферона (IFN) γ в им-

мунологических механизмах развития ХАК [2–5]. Однако до настоящего времени уровень цитокинов при ХАК изучали только в сыворотке крови, данные по их содержанию в цельной крови, а именно в спонтанной и индуцированной продукции клетками иммунной системы в тесте *ex vivo* отсутствуют. Кроме того, в настоящее время доказано, что данный метод является перспективным при изучении продукции цитокинов и предусматривает работу с цельной кровью без выделения клеток, что приближает изучение цитокинов к условиям *in vivo* [6]. Данный тест позволяет определить как спонтанную, так и индуцированную продукцию цитокинов клетками иммунной системы. Изучение спонтанной продукции дает возможность оценить состояние клеток в организме обследуемого человека, а индуцированной – их потенци-

Для корреспонденции:

Ащина Людмила Андреевна, науч. сотр.

Адрес: 440060, Пенза, ул. Стасова, 8а

E-mail: pushino2008@yandex.ru