

Ткаченко О.Ю.¹, Лапин С.В.¹, Мазинг А.В.¹, Лазарева Н.М.¹, Шмонин А.А.¹, Соловьева Л.Н.¹, Бондарева Е.А.¹, Сельков С.А.², Чепанов С.В.², Тотолян А.А.³

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЕТЕКЦИИ АНТИФОСФОЛИПИДНЫХ АНТИТЕЛ

¹ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова Минздрава РФ, 197022, Санкт-Петербург;

²ФГБНУ «НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта», 199033, Санкт-Петербург;

³Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, 197101, Санкт-Петербург

Лабораторная диагностика антифосфолипидного синдрома (АФС) состоит в выявлении антифосфолипидных антител (АФА) методом иммуноферментного анализа (ИФА), а именно в детекции антикардиолипидных (аКл) антител и антител к β_2 -гликопротеину (β_2 Гп). Несмотря на то, что серологическая диагностика играет решающую роль в постановке диагноза АФС, использование лабораторных тестов затруднено их недостаточной стандартизацией. Новым подходом к детекции антифосфолипидных антител стало использование иммуноблоттинга на основе поливинилиденфторидной (ПВДФ) мембраны. Преимущество этого метода по сравнению с методом ИФА — использование для сорбции антигенов гидрофобной твердой фазы. Пористая структура ПВДФ мембраны ориентирует гидрофильные участки фосфолипидов и обеспечивает тем самым более плотное их распределение, имитируя билипидный слой мембран живого организма. Для уточнения и сравнения ценности разных методов мы сопоставили результаты измерения АФА на ИФА тест-системах разных производителей и наборах реактивов для иммуноблоттинга. Нами собрана коллекция биоматериала 47 пациентов с некардиоэмболическими ишемическими инсультами, 20 пациентов с рецидивирующими тромбозами глубоких вен нижних конечностей и 50 пациентов с акушерской патологией, а также 30 здоровых доноров. В данных сыворотках измерены аКлIgG, аКлIgM, β_2 ГП методом ИФА с помощью немецких тест-систем фирм Euroimmun и Orgentec Diagnostica, образцы с наиболее высоким титром — методом иммуноблоттинга на реактивах фирмы Medipan. На основании измерений АФА различными ИФА тест-системами частота β_2 ГП составила 31% для Euroimmun ИФА наборов реактивов, 78% — для Orgentec Diagnostica ИФА тест-систем, аКлIgG — 2 и 30%, аКлIgM — 31 и 54% соответственно. Измерив АФА методом иммуноблоттинга на тест-системах фирмы Medipan в биообразцах с наиболее высокими титрами, мы обнаружили β_2 ГП у всех пациентов, аКлIgG — у 70%, аКлIgM — у 30% пациентов. Сходимость между тремя коммерческими наборами реактивов варьирует от 20 до 88%. Стандартизация коммерческих тест-систем все еще не достигнута. Новый метод иммуноблоттинга может быть использован в сочетании с классическими методами серологической диагностики АФС. Отсутствие алгоритмов диагностики и стандартизации различных тест-систем для детекции АФА ставит под сомнение достоверность серологического диагноза АФС, а следовательно и существование АФС как нозологической единицы.

Ключевые слова: антифосфолипидный синдром; антифосфолипидные антитела; иммуноферментный анализ; иммуноблоттинг; стандартизация.

Для цитирования: Ткаченко О.Ю., Лапин С.В., Лазарева Н.М., Шмонин А.А., Соловьева Л.Н., Бондарева Е.А., Сельков С.А., Чепанов С.В., Тотолян А.А. Сравнительный анализ иммунологических методов детекции антифосфолипидных антител. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62(1): 40-44

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-1-40-44>

Tkachenko O.Yu.¹, Lapin S.V.¹, Mazing A.V.¹, Lazareva N.M.¹, Shmonin A.A.¹, Solovieva L.N.¹, Bondareva E.A.¹, Selkov S.A.², Chepanov S.V.², Totolian A.A.³

THE COMPARATIVE ANALYSIS OF IMMUNOLOGIC TECHNIQUES OF DETECTION OF ANTI-PHOSPHOLIPID ANTIBODIES

¹The I.P. Pavlov first St. Petersburg state medical university, 197022 St. Petersburg, Russia

²The D.O. Ott research institute of obstetrics, gynecology and reproductology, 199033 St. Petersburg, Russia

³The Pasteur Sankt-Peterburgskii` research institute of epidemiology and microbiology, 197101 St. Petersburg, Russia

The laboratory diagnostic of anti-phospholipid syndrome consists in detection of anti-phospholipid antibodies using technique of enzyme-linked immunosorbent assay namely in detection of anti-cardiolipin antibodies and antibodies to β_2 -glycoprotein. In spite of the fact that serological diagnostic plays a key role in diagnosing anti-phospholipid syndrome application of laboratory tests is complicated by their insufficient standardization. The new approach to detection of anti-phospholipid antibodies became application of immune blotting on the basis of polyvinylidene fluoride membrane. As compared with enzyme-linked immunosorbent assay, the advantage of the mentioned technique is in using hydrophobic solid phase for sorption of antigens. The porous structure of polyvinylidene fluoride membrane orientates hydrophilic areas of phospholipids and by that ensures their more dense distribution imitating bi-lipid layer of membranes of living organism. To specify and compare value of different techniques the comparison was implemented concerning the results of measurement of anti-phospholipid antibodies in enzyme-linked immunosorbent assay test-systems of various manufacturers and reagents kits for immune blotting. The collection was assembled including bio-materials from 47 patients with non-cardioembolic ischemic strokes, 20 patients with recurrent thrombosis of deep veins of lower extremities and 50 patients with obstetrics pathology and also 30 healthy donors. In the given serums aKlaIgG, aKlaIgM, β_2 glycoprotein I were measured using enzyme-linked immunosorbent assay technique assisted by test-systems of Euroimmun and Orgentec

Diagnostica and the samples with the highest titre using immune blotting technique with reagents manufactured by Medipan. On the basis of measurement of anti-phospholipid antibodies by various enzyme-linked immunosorbent assay test-systems the rate of $\alpha\beta$ 2glycoprotein I amounted to 31% in case of Euroimmun reagents kits for enzyme-linked immunosorbent assay, 78% in case of Orgentec Diagnostica test-systems for enzyme-linked immunosorbent assay, aKlaIgG - 2% and 30%, aKlaIgM - 31% and 54% correspondingly. The measurement of anti-phospholipid antibodies using immune blotting technique on Medipan test-systems in bio-samples with the highest titres detected $\alpha\beta$ 2glycoprotein I in all patients, aKlaIgG in 70% and aKlaIgM in 30% of patients. The convergence between three commercial reagents kits varies from 20% to 88%. The standardization of commercial test-systems still to be achieved. The new technique of immune blotting can be applied jointly with classic techniques of serological diagnostic of anti-phospholipid syndrome. The absence of algorithms of diagnostic and standardization of different test-systems for detection of anti-phospholipid antibodies prejudices reliability of serological diagnosis of anti-phospholipid syndrome and therefore existence of anti-phospholipid syndrome as a nosologic unit.

Key words: anti-phospholipid syndrome; anti-phospholipid antibodies; enzyme-linked immunosorbent assay; immune blotting; standardization

For citation: Tkachenko O.Yu., Lapin S.V., Mazing A.V., Lazareva N.M., Shmonin A.A., Solovieva L.N., Bondareva E.A., Selkov S.A., Chepanov S.V., Totolian A.A. The comparative analysis of immunologic techniques of detection of anti-phospholipid antibodies. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (1): 40-44. (in Russ.)*. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-1-40-44>

For correspondence: Tkachenko O.Yu., researcher of research center of molecular medicine of the I.P. Pavlov first St.Petersburg state medical university e-mail: tkachenie@mail.ru

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study was supported by the Russian scientific foundation, agreement № 16-15-00118

Received 27.06.2016
Accepted 01.08.2016

Введение. Антифосфолипидные антитела (АФА) — серологический маркер антифосфолипидного синдрома (АФС), который характеризуется венозными и/или артериальными тромбозами, акушерской патологией, тромбоцитопенией, а также разнообразными неврологическими, кожными, сердечно-сосудистыми нарушениями, характер и выраженность которых зависят от локализации тромботической окклюзии в том или ином сосудистом бассейне [1]. Основными лабораторными показателями АФС служат волчаночный антикоагулянт (ВАК), антикардиолипиновые антитела (аКЛ) и антитела к β_2 -гликопротеину 1 ($\alpha\beta_2$ ГП1) [2]. β_2 -гликопротеин 1 (β_2 ГП1) — фосфолипид-связывающий белок и кофактор, необходимый для взаимодействия АФА с фосфолипидами [1]. Оценка титра АФА и количество положительных тестов позволяет разделить пациентов по группам риска. Пациенты, положительные по всем трем тестам, а также и пациенты с высоким титром антикардиолипиновых антител (аКл) (> 40 GPL или MPL) состоят в группе наиболее высокого риска развития клинических проявлений [2]. В структуре других этиологических причин АФС — вероятная причина 14% инсультов, 11% инфарктов миокарда, 10% тромбозов глубоких вен, 6% патологии беременности, 9% выкидышей. У 30—40% пациентов с системной красной волчанкой присутствуют антифосфолипидные антитела, но только у 10% есть проявления антифосфолипидного синдрома [3].

Несмотря на то что серологическая диагностика играет решающую роль в постановке диагноза АФС, использование лабораторных тестов затруднено их недостаточной стандартизацией. Классический метод детекции аКЛ и $\alpha\beta_2$ ГП1 — иммуноферментный анализ (ИФА). Оригинальные стандарты сыворотки, содержащей АФА, (стандарты Харриса) были первой попыткой глобальной стандартизации тест-систем для диагностики АФС на основе первых радиоиммунных методов [2, 4, 5]. Доступность этих стандартов ограничена. В качестве альтернативных могут использоваться референсные материалы на основе моноклональных человеческих антител, так называемые стандарты АФА Саппоро, но на данный момент они не получили широкого распространения [2, 8, 9].

Новый подход к детекции антифосфолипидных антител — использование иммуноблоттинга. Преимущество этого метода — сорбция антигенов на PVDF-мембране на основе

гидрофобного поливинилиденфторида. Его пористая структура ориентирует гидрофильные участки фосфолипидов и обеспечивает тем самым их плотное распределение. Данный метод более полно отражает связь антител с антигеном в организме пациентов с АФС [10].

Цель нашего исследования — сопоставление классических и новых методов детекции АФА и оценка их диагностической ценности в постановке серологического диагноза АФС.

Материал и методы. Для оценки встречаемости АФА и сопоставимости тестов для их выявления проведен анализ информационной базы данных специализированной лаборатории за 2013—2014 гг. Комплексный тест, включающий определение аКЛIgG, аКЛIgM, $\alpha\beta_2$ ГП1, выполнен 885 пациентам.

Нами собраны клинические данные и биологические образцы: 47 образцов пациентов с некардиоэмболическими ишемическими инсультами, 20 — пациентов с рецидивирующими тромбозами глубоких вен нижних конечностей, 51 — пациентов с акушерской патологией, 70 — здоровых доноров, а также 34 биологических образца с высоким титром АФА из серологической коллекции лаборатории диагностики аутоиммунных заболеваний.

Для исследования сопоставимости результатов тестов оценены тест-системы различных производителей. Мы использовали ИФА тест-системы фирмы Euroimmun (Германия), в дальнейшем именуемой Производитель 1 (ПР1); фирмы Orgentec Diagnostica (Германия), Производитель 2 (ПР2), и тест-системы фирмы Medipan, основанные на методе иммуноблоттинга, Производитель 3 (ПР3), в соответствии с инструкцией. В собранных биообразцах измерены аКЛIgG, аКЛIgM, $\alpha\beta_2$ ГП1 антитела. Проведен сравнительный анализ и оценка сходимости результатов.

Определение активности волчаночного антикоагулянта проведено нами в оригинальной модификации: вместо плазмы мы использовали контрольную плазму, смешанную с сывороткой пациентов в соотношении 1:4. Образцы инкубировали при $t = 0^\circ\text{C}$ в течение 30 мин, после чего измеряли активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) на полуавтоматическом коагулометре (Helena Biosciences Europe). Использовали чувствительные к ВАК реактивы APPTSiLPlus (Helena Biosciences Europe). Соотношение сыворотки и плазмы, время и температура инкубации опре-

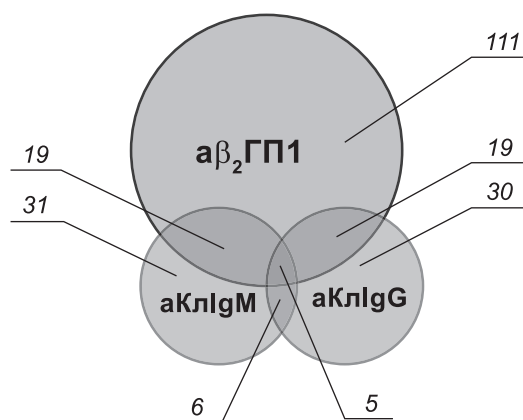


Рис. 1. Сходимость сероположительных результатов тестов для выявления АФА на основе анализа лабораторной базы данных.

Преобладают а-β₂ГП1, при этом три положительных маркера АФС обнаружены только в 5 образцах. Цифрами обозначено количество серопозитивных образцов при сопоставлении сочетанного выявления АФА.

деляли экспериментальным путем. Мы рассчитали границы нормы в биообразцах 70 здоровых доноров методом 95 перцентиль и оценили воспроизводимость данной методики. В качестве референтного значения был принят временной интервал от 24 с до 50 с. Мы измерили ВАК в оригинальной модификации в 34 биообразцах с высоким титром АФА из серологической коллекции специализированной лаборатории.

Для определения роли минорных антител в диагностике АФС в ВАК-положительных образцах измерены антитела к аннексину V IgM, IgG и антитела к протромбину методом ИФА на тест-системах фирмы Orgentec Diagnostica (Германия).

Результаты. Для сопоставления результатов тестов для выявления АФА между собой мы провели анализ базы лабораторных исследований специализированной лаборатории. Комплексный тест, включающий определение аКлIgG, аКлIgM, аβ₂ГП1 на тест-системах ПР1, выполнен 885 пациентам. Лабораторный диагноз антифосфолипидного синдрома выставлен 122 пациентам (рис. 1) Из них аβ₂ГП1 определяли у 90%, аКлIgG — у 27, аКлIgM — у 27% пациентов. Ведущим маркером стал аβ₂ГП1, определяющийся в 55% изоли-

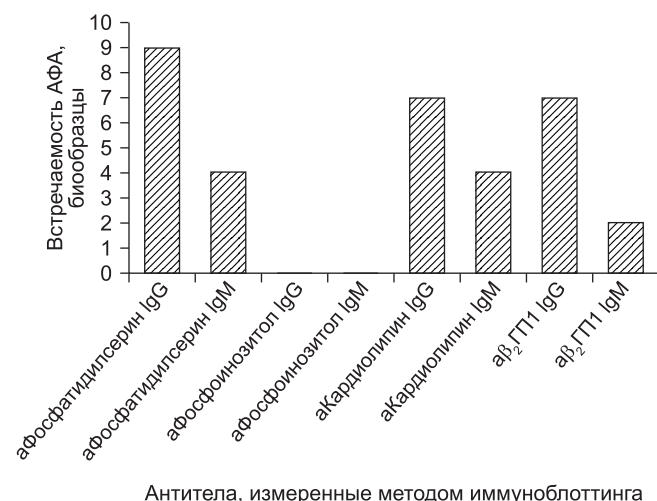


Рис. 2. Встречаемость АФА в ВАК-положительных образцах, измеренных методом иммуноблоттинга, по данным исследования 11 пациентов.

рованно, в 20% — в комплексе с аКлIgG или аКлIgM и только в 0,8% случаев — с аКлIgG и аКлIgM.

Чтобы оценить корреляцию между АФА и ВАК, мы измерили активность ВАК в 34 биологических образцах с наиболее высоким титром антител. Активность ВАК была обнаружена только у 11. Из 11 пациентов 100% положительны по аβ₂ГП1 (ПР1), 63 — по аКлIgG (ПР2), 73 — по аКлIgG (ПР2), 55 — по аКлIgM (ПР1), 73 — по аКлIgM (ПР2), 73 — по аPs-PT (ПР2), 0,09 — по aAnnexinIgG, 18% — по aAnnexinIgM (ПР2).

Также в ВАК-положительных образцах мы измерили АФА методом иммуноблоттинга (ПР3): антитела к фосфатидилсерину IgG обнаружили в 82% образцов, к фосфатидилсерину IgM — в 36, фосфоинозитолу IgG — в 36, фосфоинозитолу IgM — в 9, аКлIgG — в 64, аКлIgM — в 36, аβ₂ГП1 IgG — 64, аβ₂ГП1 IgM — в 18% (рис. 2).

Для определения встречаемости АФА в группах пациентов с разными клиническими проявлениями, а также для оценки сходности ИФА тест-систем аКлIgG, аКлIgM, аβ₂ГП1 измерены в биообразцах пациентов с некардиоэмболическими инсультами, тромбозами глубоких вен, патологией беременности на ИФА тест-системах ПР1 и ПР2 (см. таблицу, рис. 3). У пациенток с патологией беременности АФА выявляла чаще, чем у других групп пациентов.

Чтобы уточнить лабораторный диагноз АФС и сравнить классический и новый методы детекции АФА в сомнительных биообразцах, мы измерили АФА методом иммуноблоттинга (ПР3) (рис. 4). Согласно полученным данным наиболее частым маркером АФС оказался β₂ГП1.

Среди больных с подтвержденным методом иммуноблоттинга (ПР3) лабораторным диагнозом АФС превалирует группа пациентов, положительных по одному маркеру (ПР1) и по двум маркерам (ПР2).

Обсуждение. В зависимости от локализации тромбоза, АФС может поражать несколько систем и органов, а также служить причиной выкидышей и преждевременных родов, что делает проблему АФС актуальной во врачебной практике различных узких специалистов. Клинические проявления АФС неспецифичны, поэтому диагноз может быть верифицирован только посредством измерения АФА. Измерение аКЛ, аβ₂ГП1, ВАК, являющихся основными лабораторными критериями АФС, затруднено в связи с методологическими сложностями, а также недостаточной стандартизацией тестов. Выбор источника антигена, типа сорбционной поверхности, состава дилуирующих, моющих, блокирующих буферных растворов, использования сыворотки или плазмы в качестве биоматериала, а также температуры и времени инкубации тест-систем представляют собой сложную задачу и отличаются у разных производителей. Эти методологические

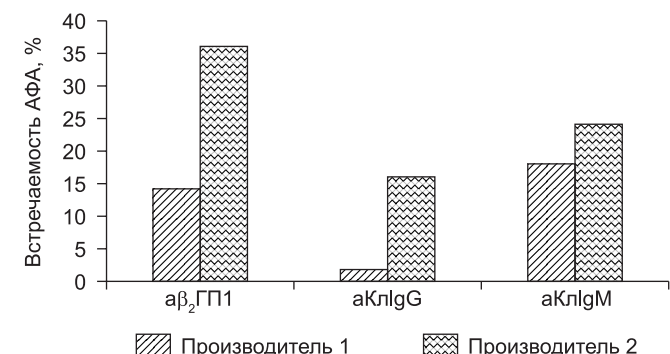


Рис. 3. Сравнение встречаемости АФА, измеренных ИФА тест-системами ПР1 и ПР2 в 128 биообразцах пациентов с предполагаемым АФС.

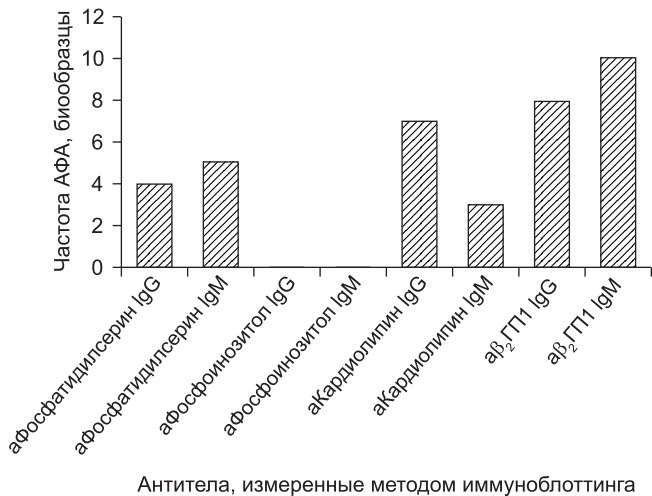


Рис. 4. Частота АФА в сомнительных биообразцах, измеренных методом иммуноблоттинга.

особенности, а также отсутствие международных стандартов ведут к значительным вариациям результатов [2, 4, 5]. Для преодоления этих проблем научным и стандартизационным комитетом Международного общества по изучению тромбоза и гемостаза разработаны рекомендации по детекции антифосфолипидных антител для твердофазных тест-систем [11—15]. Авторы предлагают алгоритмы для улучшения преаналитического этапа, проведение исследования на АФА в течение 2—3 дней после забора крови, постановки проб в дублях, расчет внутрилабораторного пограничного значения и референтного интервала, но не упоминают о недостаточной стандартизации тест-систем. Несмотря на рекомендации для лабораторной диагностики АФС методом ИФА, результаты тестов, выполненных на различных коммерческих тест-системах, плохо сопоставимы между собой [2, 17].

В нашей работе мы проанализировали базу лабораторных исследований специализированной лаборатории, сравнили ИФА тест-системы разных производителей между собой, а также оценили новый метод иммуноблоттинга для детекции антифосфолипидных антител, использовали его в качестве подтверждающего метода в ВАК-положительных и сомнительных биологических образцах.

Анализ базы лабораторных серологических исследований за 2013—2014 гг. показал, что преобладающим маркером АФС оказались антитела к β_2 ГТТ1, в то время как аКЛ, IgM, так и IgG встречаются крайне редко и практически никогда — изолированно. Изолированная положительность как по аКЛ, так и по $\alpha\beta_2$ ГТТ1 не ассоциирована с тромбозами. Наиболее вероятно, что лишь $\alpha\beta_2$ ГТТ1 с ВАК-активностью патогенетически связаны с клиническими проявлениями.

Заключение. Из проведенного нами сравнительного анализа и оценки сходимости ИФА тест-систем ПР1 и ПР2 можно сделать вывод, что сходимость тест-систем разных производителей вариабельна, в некоторых тестах — крайне низка (от 20 до 88%).

Один из первых сравнительных анализов тест-систем ИФА проведен в 1987 г. Авторы сравнивали чувствительность первых коммерческих и внутрилабораторных тест-систем и пришли к выводу, что чувствительность внутрилабораторных тест-систем выше чувствительности коммерческих тестов и что ИФА-методика для детекции АФА нуждается в стандартизации [5]. В 2009 г. вышла обзорная статья, название которой очень хорошо характеризует возникшую 20 лет назад проблему, до сих пор не имеющую решения [17]. Редкие статьи о сравнении коммерческих тест-систем между собой говорят о том, что анализ воспроизводимости показывает небольшие различия между ИФА тест-систем от разных производителей [16, 18].

Частота положительных результатов при использовании реактивов разных производителей в исследованных нами группах пациентов крайне вариабельна. По результатам тестов наибольшее значение приобретает аКЛ IgM и $\alpha\beta_2$ ГТТ1. Тест-системы ПР1 чаще выявляют $\alpha\beta_2$ ГТТ1, наборы реактивов ПР2 — КЛ IgM. Из некритериальных маркеров (Ps-Pt и An-pexin) a-PS-PT тест обладает чувствительностью, сравнимой с чувствительностью аКЛ IgM и аКЛ IgG [19—21].

В качестве подтверждающего теста мы использовали метод иммуноблоттинга (ПР3) в сомнительных биологических образцах, которые были положительными при использовании ИФА тест-систем хотя бы одного из производителей. Помимо использования PVDF — мембраны в качестве твердой фазы, преимуществом данной методики стало еще и определение минорных классов АФА, а именно антител к фосфатидилсерину и фосфатидилинозитолу. Антитела к фосфатидилсерину определялись в 32—80% биологических образцов, а антитела к фосфатидилинозитолу практически не идентифицировались. В отличие от ИФА тест-систем, при использовании методики иммуноблоттинга преобладающим маркером после $\alpha\beta_2$ ГТТ1 оказывается аКЛ IgG.

В целом полученные нами данные о детекции антикардиолипиновых антител и антител к β_2 -гликопротеину и сравнение их с ИФА тест-системами свидетельствуют о том, что сходимость детекции антифосфолипидных антител методом иммуноблоттинга с тестами ИФА ПР2 значимо превышает сходимость с тестами ИФА фирмы ПР1. Метод иммуноблоттинга представляется нам довольно перспективным для использования в качестве подтверждающего теста в диагностике АФС, но вопрос об отсутствии стандартизации тест-систем ИФА различных производителей остается открытым.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Встречаемость АФА в группах пациентов с разными клиническими проявлениями

Группы пациентов	Антитела к β_2 гликопротеину1 (ПР1)	Антитела к β_2 гликопротеину1 (ПР2)	Антитела к кардиолипину IgG (ПР1)	Антитела к кардиолипину IgG (ПР2)	Антитела к кардиолипину IgM (ПР1)	Антитела к кардиолипину IgM (ПР2)
Пациенты с некардиоэмболическим острым инсультом (n = 47)	4 (8%)	11 (25%)	—	2 (6%)	—	15 (34%)
Пациентки с патологией беременности (n = 51)	9 (18%)	19 (39%)	1 (2%)	12 (24%)	12 (24%)	5 (11%)
Пациенты с тромбозом глубоких вен (n = 20)	1 (5%)	5 (10%)	—	—	13 (26%)	5 (10%)
Здоровые доноры (n = 10)	2 (20%)	—	—	1 (10%)	—	—

Примечание. ПР1 — Euroimmun; ПР2 — Orgentec Diagnostica.

Финансирование. Исследование было поддержано грантом РНФ Соглашение № 16-15-00118.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 2—20 см. REFERENCES)

1. Насонов Е.Л. Антифосфолипидный синдром. М.: Литтерра; 2004.
21. Созина А.В., Неустроева Ю.А., Тихомирова Т.А., Лапин С.В. Сочетанная встречаемость аутоантител у больных с диффузными болезнями соединительной ткани. Медицинская иммунология. 2007; 9(1): 69—76.

REFERENCES

1. Nasonov E.L. Antiphospholipid Syndrome [Antifosfolipidnyy sindrom]. Moscow: Litterra; 2004. (in Russian)
2. Miyakis S., Lockshin M.D., Atsumi T., Branch D.W., Cervera R. et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). J. Thromb. Haemost. 2006; 4(2): 295—488.
3. Barbhayya M., Erkan D. Top 10 clinical research developments in antiphospholipid syndrome. Curr. Rheumatol. Rep. 2013; 15(10): 367.
4. Devreese K.M. Standardization of antiphospholipid antibody assays. Where do we stand? Lupus. 2012; 21(7): 718—2.
5. Urbanus R.T., de Groot P.G. Antiphospholipid antibodies—we are not quite there yet. Blood Rev. 2011; 25(2): 97—106.
6. De Groot P.G., Derksen R.H., de Laat B. Twenty-two years of failure to set up undisputed assays to detect patients with the antiphospholipid syndrome. Semin. Thromb. Hemost. 2008; 34(4): 347—55.
7. Pierangeli S.S., Favaloro E.J., Lakos G., Meroni P.L., Tincani A., Wong R.C. et al. Standards and reference materials for the anticardiolipin and anti-beta2 glycoprotein I assays: a report of recommendations from the APL Task Force at the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies. Clin. Chim. Acta. 2012; 413(1-2): 358—60.
8. Ichikawa K., Khamashta M.A., Koike T., Matsuura E., Hughes G.R. Beta 2-Glycoprotein I reactivity of monoclonal anticardiolipin antibodies from patients with the antiphospholipid syndrome. Arthritis Rheum. 1994; 37(10): 1453—61.
9. Ichikawa K., Tsutsumi A., Atsumi T., Matsuura E., Kobayashi S., Hughes G.R. et al. A chimeric antibody with the human gamma1 constant region as a putative standard for assays to detect IgG beta2-glycoprotein I-dependent anticardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I antibodies. Arthritis Rheum. 1999; 42(11): 2461—70.
10. Egerer K., Roggenbuck D., Buttner T., Lehmann B., Kohn A., Von L.P. et al. Single-step autoantibody profiling in antiphospholipid syndrome

- using a multi-line dot assay. Arthritis Res. Ther. 2011; 13(4): R118.
11. Tincani A., Filippini M., Scarsi M., Galli M., Meroni P.L. European attempts for the standardisation of the antiphospholipid antibodies. Lupus. 2009; 18(10): 913—9.
 12. Tincani A., Allegrì F., Balestrieri G., Reber G., Sanmarco M., Meroni P. et al. Minimal requirements for antiphospholipid antibodies ELISAs proposed by the European Forum on antiphospholipid antibodies. Thromb. Res. 2004; 114(5-6): 553—8.
 13. Reber G., Tincani A., Sanmarco M., de Moerloose P., Boffa M.C. Proposals for the measurement of anti-beta2-glycoprotein I antibodies. Standardization group of the European Forum on Antiphospholipid Antibodies. J. Thromb. Haemost. 2004; 2(10): 1860—2.
 14. Wong R.C., Australasian aCL Working Party. Consensus guidelines for anticardiolipin antibody testing. Thromb. Res. 2004; 114(5-6): 559—71.
 15. Devreese K.M., Pierangeli S.S., de Laat B., Tripodi A., Atsumi T., Ortel T.L. et al. Testing for antiphospholipid antibodies with solid phase assays: guidance from the SSC of the ISTH. J. Thromb. Haemost. 2014; 12(5): 792—5.
 16. Covelli M., Lapadula G., Numo R. Immunoenzymatic test for the study of anti-cardiolipin antibodies. Evaluation of a commercial kit. Quad. Sclavo. Diagn. 1987; 23(4): 447—53.
 17. Reber G., Boehlen F., de Moerloose P. Technical aspects in laboratory testing for antiphospholipid antibodies: is standardization an impossible dream? Semin. Thromb. Hemost. 2008; 34(4): 340—6.
 18. Decavele A.S., Schouwers S., Devreese K.M. Evaluation of three commercial ELISA kits for anticardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I antibodies in the laboratory diagnosis of the antiphospholipid syndrome. Int. J. Lab. Hematol. 2011; 33(1): 97—108.
 19. Ieko M., Nakabayashi T., Tarumi T., Yoshida M., Naito S., Atsumi T. et al. Phosphatidylserine-dependent anti-prothrombin antibody as a new marker for the diagnosis of antiphospholipid syndrome. Rinsho Byori. 2006; 54(3): 256—62.
 20. Atsumi T., Ieko M., Bertolaccini M.L., Ichikawa K., Tsutsumi A., Matsuura E. et al. Association of autoantibodies against the phosphatidylserine-prothrombin complex with manifestations of the antiphospholipid syndrome and with the presence of lupus anticoagulant. Arthritis Rheum. 2000; 43(9): 1982—93.
 21. Sozina A.V., Neustroeva Yu.A., Tikhomirova T.A., Lapin S.V. Coincidence of autoantibodies among patients with diffuse connective tissue disorders. Meditsinskaya immunologiya. 2007; 9(1): 69—76. (in Russian)

Поступила 27.06.16

Принята к печати 01.08.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616.24-007.272-092:612.6.02.017.1].613.6

Карзакова Л.М.¹, Мучукова О.М.¹, Борисова Л.В.², Кудряшов С.И.¹

ИССЛЕДОВАНИЕ HLA-АССОЦИАЦИЙ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ В УСЛОВИЯХ КРЕМНИЙОРГАНИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА

¹ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова» Минобрнауки России, 428015, г. Чебоксары;

²БУ «Республиканский эндокринологический диспансер» Минздрава Чувашии, 428009, г. Чебоксары

Цель работы — изучить ассоциации полиморфных аллельных генов HLA класса II — DRB1, DQA1 и DQB1 и их гаплотипических сочетаний с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) у работников кремнийорганического производства в чувашской популяции. Проведено HLA-генотипирование 50 больных ХОБЛ и 38 здоровых работников кремнийорганического производства, принадлежащих к чувашской этнической популяции. Генотипирование проводили по трем генам HLA: DRB1 (14 аллелей), DQA1 (8 аллелей) и DQB1 (11 аллелей) методом мультипраймерной полимеразной цепной реакции. Для типирования использовали наборы фирмы «ДНК-Технология» (Россия). Степень ассоциации HLA-аллелей и гаплотипов с развитием ХОБЛ в условиях кремнийорганического производства определяли по значению относительного риска (ОР). Обнаружены отрицательные ассоциации ХОБЛ с аллелями HLA-DRB1*01 (ОР = 0,021; $p < 0,001$); DQA1*0101 (ОР = 0,013; $p < 0,001$); DQB1*0501 (ОР = 0,021; $p < 0,001$) и гаплотипами DRB1*01-DQA1*0101 (ОР = 0,031; $p < 0,01$); DRB1*07-DQA1*0201 (ОР = 0,076; $p < 0,01$); DRB1*13-DQA1*0102 (ОР = 0,11; $p < 0,05$). Установлены HLA-маркеры устойчивости к развитию ХОБЛ в условиях кремнийорганического производства в чувашской популяции.

Для корреспонденции: Карзакова Луиза Михайловна, д-р мед.наук, зав.каф. госпитальной терапии с курсом клин. иммунологии, e-mail: luizak58@mail.ru