

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Александрова Е.Н., Дорофеев А.С., Новиков А.А., Сандлер Ю.Г., Салиев К.Г., Винницкая Е.В.

ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ МЕТОДОВ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИМИТОХОНДРИАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ПРИ ПЕРВИЧНОМ БИЛИАРНОМ ХОЛАНГИТЕ

ГБУЗ «Московский клинический научно-практический центр имени А.С. Логинова Департамента здравоохранения города Москвы», 111123, Москва, Россия

Антимитохондриальные антитела (АМА) - гетерогенная группа аутоантител, реагирующих с различными белками мембран митохондрий. При первичном билиарном холангите (ПБХ) АМА вырабатываются преимущественно к антигену внутренней мембраны митохондрий М2. АМА/АМА-М2 служат основными иммунологическими маркерами ПБХ.

Цель исследования - сравнить диагностическое значение методов определения АМА/АМА-М2 у больных ПБХ и ПБХ в сочетании с аутоиммунным гепатитом (АИГ) (ПБХ/АИГ).

Исследованы сыворотки 19 больных ПБХ, 48 - перекрёстным синдромом ПБХ/АИГ, 30 - неалкогольной жировой болезнью печени (НАЖБП) и 30 здоровых доноров (ЗД). Определение АМА/АМА-М2 осуществлялось с помощью непрямой реакции иммунофлюоресценции на тканевом комплексе криосрезов печени/почек/желудка мыши и на HEp-2 клетках (НРИФ-ТК и НРИФ-HEp-2), иммуноферментного анализа (ИФА), иммуноблота (ИБ).

Частота обнаружения и уровни АМА/АМА-М2 в сыворотках больных ПБХ и ПБХ/АИГ, определяемые методами НРИФ-ТК, НРИФ-HEp-2, ИФА и ИБ, не различались при данных патологических состояниях и превышали эти показатели при НАЖБП и у ЗД. Отмечена «умеренная» степень согласованности результатов исследования АМА/АМА-М2 методами НРИФ-ТК, НРИФ-HEp-2, ИФА, ИБ ($\kappa=0,48-0,60$). Методы определения АМА/АМА-М2 на основе НРИФ-ТК и НРИФ-HEp-2 являлись наиболее чувствительными и «полезными» скрининговыми тестами для диагностики ПБХ. При ПБХ/АИГ на этапе скрининга АМА/АМА-М2 наиболее высокие показатели диагностической чувствительности и эффективности демонстрировал ИФА, в то время как метод НРИФ-HEp-2 был менее «полезным», а НРИФ-ТК - недостаточно эффективным тестом. ИФА и ИБ служили «полезными» подтверждающими тестами для диагностики ПБХ и ПБХ/АИГ у лиц с положительными результатами скринингового определения АМА/АМА-М2 в НРИФ-ТК и НРИФ-HEp-2. Для повышения ДЧ и уменьшения количества АМА-негативных результатов при ПБХ и ПБХ/АИГ целесообразно использовать ИФА не только в качестве подтверждающего, но и скринингового теста в комбинации с выявлением АМА/АМА-М2 методами НРИФ-ТК и НРИФ-HEp-2.

Ключевые слова: первичный билиарный холангит; перекрёстный синдром; антимитохондриальные антитела (АМА) / М2 субтип (АМА-М2); непрямая реакция иммунофлюоресценции; иммуноферментный анализ; иммуноблот; диагностическое значение.

Для цитирования: Александрова Е.Н., Дорофеев А.С., Новиков А.А., Сандлер Ю.Г., Салиев К.Г., Винницкая Е.В. Диагностическое значение методов выявления антимитохондриальных антител при первичном билиарном холангите. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (11): 666-671. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-11-666-671>

Для корреспонденции: Александрова Елена Николаевна, д-р мед. наук, зав. лабораторией клинической иммунологии; e-mail: aleksandrovaen2015@yandex.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 02.10.2023

Принята к печати 11.10.2023

Опубликовано 21.11.2023

Aleksandrova E.N., Dorofeev A.S., Novikov A.A., Sandler Yu.G., Saliev K.G., Vinnitskaya E.V.

DIAGNOSTIC VALUE OF ANTI-MITOCHONDRIAL ANTIBODIES DETECTION METHODS IN PRIMARY BILIARY CHOLANGITIS

A.S. Loginov Moscow Clinical Research and Practical Center, Moscow Healthcare Department. Moscow, Russian Federation

Anti-mitochondrial antibodies (AMA) are a heterogeneous group of autoantibodies that react with various mitochondrial membrane proteins. In primary biliary cholangitis (PBC), AMA are produced predominantly to the inner mitochondrial membrane antigen M2. AMA/AMA-M2 are the main immunological marker of PBC.

The aim of the study was to compare the diagnostic value of methods for detecting AMA/AMA-M2 in patients with PBC and PBC-autoimmune hepatitis overlap syndrome (PBC-AIH OS).

The sera of 19 patients with PBC, 48 with PBC-AIH OS, 30 with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and 30 healthy donors (HD) were studied. Detection of AMA/AMA-M2 was carried out using indirect immunofluorescence on a tissue complex of mouse liver/kidney/stomach cryostat sections and on HEp-2 cells (IIF-T and IIF-HEp-2), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), immunoblot (IB).

The frequency of detection and levels of AMA/AMA-M2 in the sera of patients with PBC and PBC-AIH OS, determined using IIF-T,

IIF-HEp-2, ELISA and IB, did not differ in these pathological conditions and significantly exceeded these indicators in NAFLD and in HD. A «moderate» degree of agreement between the results of the AMA/AMA-M2 study using IIF-T, IIF-HEp-2, ELISA and IB methods was noted ($\kappa = 0.48-0.60$). Methods for determining AMA/AMA-M2 using IIF-T and IIF-HEp-2 were the most sensitive and «useful» primary screening tests for the diagnosis of PBC. In PBC-AIH OS at the screening stage of AMA/AMA-M2, the highest rates of sensitivity and diagnostic value were demonstrated by ELISA, while the IIF-HEp-2 method was less «useful», and IIF-T was an ineffective test. ELISA and IB methods served as «useful» confirmatory tests for the diagnosis of PBC and PBC-AIH OS in individuals with positive screening results for AMA/AMA-M2 in IIF-T and IIF-HEp-2. To increase the sensitivity and reduce the number of AMA-negative results in PBC and PBC-AIH OS, it is advisable to use ELISA not only as a confirmatory test, but also as a screening test in combination with the detection of AMA/AMA-M2 using the IIF-T and IIF-HEp-2 methods.

Key words: primary biliary cholangitis; overlap syndrome; anti-mitochondrial antibodies (AMA)/M2 subtype (AMA-M2); indirect immunofluorescence reaction; enzyme-linked immunosorbent assay; immunoblot; diagnostic value.

For citation: Aleksandrova E.N., Dorofeev A.S., Novikov A.A., Sandler Yu.G., Saliev K.G., Vinnitskaya E.V. Diagnostic value of anti-mitochondrial antibodies detection methods in primary biliary cholangitis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; 68(11): 666-671 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-11-666-671>

For correspondence: Aleksandrova Elena Nikolaevna; Dr. Sci. Med., head of the laboratory of clinical immunology; e-mail: aleksandrovaen2015@yandex.ru

Information about authors:

Aleksandrova E.N. <https://orcid.org/0000-0003-4074-5907>;
Dorofeev A.S. <https://orcid.org/0000-0002-8515-6658>;
Novikov A.A. <https://orcid.org/0000-0002-2738-2956>;
Sandler Yu.G. <https://orcid.org/0000-0003-4291-812X>;
Saliev K.G., <https://orcid.org/0000-0002-4581-7052>;
Vinnitskaya E.V., <https://orcid.org/0000-0002-0344-8375>.

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

Financing. *The study had no sponsor support.*

Received 02.10.2023

Accepted 11.10.2023

Published 21.11.2023

Первичный билиарный холангит (ПБХ) - хроническое аутоиммунное воспалительное заболевание печени, характеризующееся иммуноопосредованным повреждением эпителия желчных протоков с развитием холестаза и билиарного цирроза [1-3]. Основными иммунологическими маркерами ПБХ являются антимитохондриальные антитела (АМА), обнаружение которых в сыворотке крови входит в перечень диагностических критериев заболевания и служит предиктором его развития на доклинической стадии [1-4]. АМА - гетерогенная группа аутоантител, реагирующих с различными белками, расположенными на внутренней и наружной мембранах митохондрий (M1-M9), однако для ПБХ характерны субтипы АМА, направленные против белков M2, M4, M8, M9 [5]. При ПБХ АМА вырабатываются преимущественно к антигену внутренней мембраны митохондрий M2, представляющему собой E₂-субъединицу пируватдегидрогеназного комплекса (PDH-E₂/M2), входящего в состав дегидрогеназных комплексов 2-оксикислоты (2-OADC). Прочие разновидности ПБХ-ассоциированных АМА распознают другие компоненты 2-OADC, включая E₂-субъединицу оксоглутаратдегидрогеназного комплекса (OGDC-E₂), E₂-субъединицу дегидрогеназного комплекса 2-оксикислоты с разветвленной цепью (BCOADC-E₂), E₁α-субъединицу и E₃-связывающий белок PDH, но выявляются реже, чем АМА-M2 [3-4, 6]. АМА-M2 - патогномоничный, наиболее специфичный маркер ПБХ [2, 4]. Скрининговое исследование АМА/АМА-M2 в сыворотке крови в европейских странах традиционно включает непрямую реакцию иммунофлюоресценции (НРИФ) с использованием в качестве субстрата тканевого (ТК) комплекса криосрезов печени/почек/желудка крыс (мышей) (НРИФ-ТК) или культуры HEp-2

клеток (эпителиальных клеток рака гортани человека) (НРИФ-HEp-2). Подтверждающее тестирование проводится методами иммуноферментного анализа (ИФА), иммуноблота (ИБ), хемилюминесцентного и мультиплексного иммунного анализа [1, 2, 5, 7-9]. Определение других субтипов АМА, в том числе, антител к OGDC-E₂, BCOADC-E₂, E₁α и E₃-связывающему белку PDH, осуществляется методом ИФА и ИБ в рамках расширенного профиля печеночных антител [3, 5, 6, 10]. Данные литературы, касающиеся сравнительной оценки диагностической ценности скрининговых и подтверждающих методов исследования АМА/АМА-M2 в сыворотках больных ПБХ, противоречивы и варьируют в зависимости от особенностей антигенов и реагентов в применяемых тест-системах, уровней позитивности аутоантител и подбора групп больных [10-11].

Цель исследования - сравнить диагностическое значение методов определения АМА/АМА-M2 в сыворотках больных ПБХ и перекрестным синдромом (ПБХ в сочетании с аутоиммунным гепатитом - АИГ).

Материал и методы. Исследованы сыворотки 19 больных ПБХ (18 женщин и 1 мужчина) в возрасте 51,4 (25-72) лет и 48 больных перекрестным синдромом ПБХ/АИГ (44 женщины и 4 мужчины) в возрасте 53,6 (28-70) лет. Группу сравнения составили 30 больных неалкогольной жировой болезнью печени (НАЖБП), контрольную группу - 30 здоровых доноров (ЗД). Обе группы сопоставимы по полу и возрасту с обследованными больными ПБХ и ПБХ/АИГ. Диагнозы ПБХ и перекрестного синдрома ПБХ/АИГ установлены в соответствии с международными диагностическими критериями [1, 2, 12] и подтверждены результатами морфологического исследования биоптатов печени. Больные наблюдались в ГБУЗ МКНЦ имени А.С. Логинова ДЗМ с 2018 по 2020

год. Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на исследование.

Определение АМА/АМА-М2 в сыворотке крови осуществлялось 4-мя методами: НРИФ на «тройном субстрате» (тканевом комплексе криосрезов печени/почки/желудка мыши) и на НЕР-2 клетках с помощью коммерческих наборов реагентов Mouse Liver/Kidney/Stomach IFA Kit и ImmuGlo COMVI НЕР-2-Cell («Immco Diagnostics», США) путём визуальной оценки образцов флюоресценции под микроскопом АХИОСКОР 40 («Zeiss», Германия); ИФА на анализаторе «Alegria» («АМА-М2», «Orgentec», ФРГ); ИБ при использовании коммерческого набора реагентов «Liver-9-line» («Orgentec», ФРГ) с программным обеспечением «VIZION» для оценки результатов исследования. Позитивные результаты измерения АМА/АМА-М2 соответствовали значениям $\geq 1:40$ (НРИФ-ТК), $\geq 1:160$ (НРИФ-НЕР-2) (тип свечения цитоплазматический митохондриальный АС-21 в соответствии с номенклатурой, разработанной Международным консенсусом по паттернам антиядерных антител «International consensus on ANA patterns» - ICAP), $\geq 10,0$ ЕД/мл (ИФА) и ≥ 1 у.е. (ИБ).

Статистическая обработка результатов проведена с использованием пакета программ «Statistica 8.0» («StatSoft», США). Для измерения степени согласованности результатов определения АМА/АМА-М2 различными методами использован коэффициент каппа (κ) Коэна. Значения коэффициента κ менее 0,2 соответствовали «плохой» степени согласованности результатов исследования АМА/АМА-М2, от 0,21 до 0,4 - «удовлетворительной», от 0,41 до 0,6 - «умеренной», от 0,61 до 0,8 - «хорошей», более 0,81 - «очень хорошей». Результаты представлены в виде медианы (Me) с ин-

терквартильным размахом 25-75 перцентиль. Различия считались значимыми при $p < 0,05$. Оценка диагностической ценности методов выявления АМА/АМА-М2 осуществлялась путём расчёта диагностической чувствительности и специфичности (ДЧ и ДС), отношения правдоподобия положительного и отрицательного результата теста (ОППР и ОПОР). Наиболее «полезными» для диагностики АИЗП считались методы определения АМА/АМА-М2 с ОППР > 5 и ОПОР $> 0,2$; «полезными» - с ОППР > 2 и ≤ 5 , ОПОР $> 0,2$ и $\leq 0,5$; «не имеющими пользы» - с ОППР ≤ 2 и ОПОР $> 0,5$.

Результаты. Данные о частоте обнаружения АМА/АМА-М2 в сыворотках больных ПБХ, ПБХ/АИГ, НАЖБП, ЗД с помощью НРИФ-ТК, НРИФ-НЕР-2, ИФА, ИБ представлены в табл. 1. Как следует из таблицы, всеми указанными методами АМА/АМА-М2 значительно чаще выявлялись при ПБХ (31,6-73,7%) и ПБХ/АИГ (31,3-54,2%), чем у больных НАЖБП (0-23,3%) и ЗД (0%) ($p < 0,05$). Между группами больных ПБХ и перекрестным синдромом ПБХ/АИГ достоверных различий по частоте положительных результатов определения АМА/АМА-М2 на основе технологий НРИФ, ИФА, ИБ не установлено ($p > 0,05$). Среди больных НАЖБП, частота выявления АМА/АМА-М2 данными методами превышала таковую у ЗД ($p < 0,05$). У больных ПБХ АМА/АМА-М2 чаще выявлялись в НРИФ-ТК (73,7%), чем при использовании ИФА (47,4%) и ИБ (31,6%) ($p < 0,05$ во всех случаях), с помощью НРИФ-НЕР-2 (57,9%) - чаще, чем методом ИБ (31,6%) ($p < 0,05$). При ПБХ/АИГ частота обнаружения АМА/АМА-М2 методами НРИФ-ТК (54,2%) и ИФА (62,5%) более высокая по сравнению с НРИФ-НЕР-2 (37,5%) и ИБ (31,3%) ($p < 0,05$ во всех случаях).

Таблица 1

Частота обнаружения АМА/АМА-М2 методами НРИФ-ТК, НРИФ-НЕР-2, ИФА, ИБ в сыворотках больных ПБХ, ПБХ/АИГ, НАЖБП, ЗД

Группы обследованных	НРИФ-ТК n (%)	НРИФ-НЕР-2 n (%)	ИФА n (%)	ИБ n (%)
ПБХ (n=19)	14 (73,7) ^{*,***}	11 (57,9) ^{***}	9 (47,4) ^{#,###}	6 (31,6) ^{1,3}
ПБХ/АИГ (n=48)	26 (54,2) ^{*,***}	18 (37,5) ^{***}	30 (62,5) ^{#,###}	15 (31,3) ^{2,3}
НАЖБП (n=30)	7 (23,3) ^{*,***}	2 (6,7) ^{***}	0 (0) ^{#,###}	2 (6,7) ^{1,2,3}
ЗД (n=30)	0 (0) ^{***}	0 (0) ^{***}	0 (0) ^{###}	0 (0) ³

Примечание. Достоверность различий в частоте обнаружения АМА при использовании НРИФ-ТК: * - $p=0,00005$ между больными ПБХ и НАЖБП; ** - $p=0,001$ между больными ПБХ/АИГ и НАЖБП; *** - $p < 0,05$ между больными ПБХ, ПБХ/АИГ, НАЖБП и ЗД.

Достоверность различий в частоте обнаружения АМА при использовании НРИФ-НЕР-2:

* - $p=0,0005$ между больными ПБХ и НАЖБП; ** - $p=0,0002$ между больными ПБХ/АИГ и НАЖБП; *** - $p < 0,05$ между больными ПБХ, ПБХ/АИГ, НАЖБП и ЗД.

Достоверность различий в частоте обнаружения АМА-М2 при использовании ИФА: # - $p=0,00005$ между больными ПБХ и НАЖБП; ## - $p < 0,05$ между больными ПБХ/АИГ и НАЖБП; ### - $p < 0,05$ между больными ПБХ, ПБХ/АИГ, НАЖБП и ЗД.

Достоверность различий в частоте обнаружения АМА-М2 при использовании ИБ: ¹ - $p=0,004$ между больными ПБХ и НАЖБП; ² - $p=0,0001$ между больными ПБХ/АИГ и НАЖБП; ³ - $p < 0,05$ между больными ПБХ, ПБХ/АИГ, НАЖБП и ЗД.

При определении АМА/АМА-М2 в сыворотках 127 больных ПБХ, ПБХ/АИГ, НАЖБП, ЗД степень согласованности позитивных/негативных результатов, полученных с помощью НРИФ-ТК и НРИФ-НЕР-2 ($\kappa=0,6$), ИФА ($\kappa=0,52$), ИБ ($\kappa=0,53$), ИФА и НРИФ-НЕР-2 ($\kappa=0,48$), ИБ ($\kappa=0,49$) была «умеренной», методами НРИФ-НЕР-2 и ИБ ($\kappa=0,3$) - «слабой».

Распределение АМА-серопозитивных больных ПБХ, ПБХ/АИГ, НАЖБП в зависимости от титров АМА в НРИФ-ТК и НРИФ-НЕР-2 представлены в табл. 2 и 3. При использовании НРИФ-ТК средние/высокие титры АМА ($\geq 1:160$) в сыворотках больных ПБХ встречались в 3,7 раза чаще низких титров (1:40-1:80) (78,6% vs 21,4%), в то время как у пациентов с ПБХ/АИГ и НАЖБП суще-

ственной разницы в частоте обнаружения средних/высоких (57,7% и 57,1%) и низких титров (42,3% и 42,9%) АМА не наблюдалось (табл. 2). Частота выявления средних/высоких титров АМА методом НРИФ-НЕР-2

($\geq 1:640$) при ПБХ (81,8%) и ПБХ/АИГ (94,4%) в 4,5 и 16,9 раз выше, чем низких титров (1:160-1:320) (18,2% и 5,6%, соответственно), а у пациентов с НАЖБП определялись только низкие титры АМА (табл. 3).

Таблица 2

Титры АМА в НРИФ-ТК у АМА-серопозитивных больных ПБХ, ПБХ/АИГ, НАЖБП

Группы обследованных	Титры													
	1/40		1/80		1/160		1/320		1/640		1/1280		1/2560	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
ПБХ (n=14)	3	21,4	0	0	3	21,4	1	7,1	2	14,3	4	28,6	1	7,1
ПБХ / АИГ (n=26)	2	7,7	9	34,6	6	23,1	6	23,1	2	7,7	1	3,8	0	0
НАЖБП (n=7)	0	0	3	42,9	0	0	1	14,3	1	14,3	2	28,6	0	0

Таблица 3

Титры АМА в НРИФ-НЕР-2 у АМА-серопозитивных больных ПБХ, ПБХ/АИГ, НАЖБП

Группы обследованных	Титры									
	1/160		1/320		1/640		1/1280		1/2560	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
ПБХ (n=11)	0	0	2	18,2	3	27,3	5	45,5	1	9,1
ПБХ/АИГ (n=18)	0	0	1	5,6	7	38,9	10	55,6	0	0
НАЖБП (n=2)	0	0	2	100	0	0	0	0	0	0

Таблица 4

Концентрация АМА-М2, выявляемых методами ИФА и ИБ, в сыворотках больных ПБХ, ПБХ/АИГ, НАЖБП и ЗД (Ме, ИР 25-75 процентов)

Группы обследованных	Концентрация АМА-М2	
	ИФА (ЕД/мл)	ИБ (у.е.)
ПБХ (n=19)	76,9 (0,1-200) ^{#,###}	0,7 (0,04-1,9) ^{1,3}
ПБХ/АИГ (n=48)	75,04 (0,1-200) ^{###,###}	0,66 (0,04-2,3) ^{2,3}
НАЖБП (n=30)	1,5 (0,2-6) ^{#,###,###}	0,24 (0,03-2,69) ^{1,2,3}
ЗД (n=30)	1,9 (1,4-2,8) ^{###}	0,09 (0,03-0,19) ³

Примечание. Достоверность различий в концентрации АМА-М2 при использовании ИФА: # - $p=0,0004$ между больными ПБХ и НАЖБП; ## - $p=0,00001$ между больными ПБХ/АИГ и НАЖБП; ### - $p=0,00001$ между больными ПБХ, ПБХ/АИГ, НАЖБП и ЗД.

Достоверность различий в частоте обнаружения АМА-М2 при использовании ИБ: ¹ - $p=0,001$ между больными ПБХ и НАЖБП; ² - $p=0,002$ между больными ПБХ/АИГ и НАЖБП; ³ - $p=0,00004$ между больными ПБХ, ПБХ/АИГ, НАЖБП и ЗД.

При использовании ИФА и ИБ уровни АМА-М2 в сыворотках больных ПБХ и ПБХ/АИГ значительно превышали концентрацию данных аутоантител у пациентов с НАЖБП и ЗД ($p<0,05$) (табл. 4).

Диагностическое значение различных методов иммунного анализа АМА/АМА-М2 при ПБХ и ПБХ/АИГ представлено в табл. 5. У больных ПБХ определение АМА/АМА-М2 в НРИФ-ТК показало более высокую ДЧ по сравнению с ИФА и ИБ (73,7% vs 47,4% и 31,6%, соответственно, $p<0,05$), а методом НРИФ-НЕР-2 - по сравнению с ИБ (57,9% vs 31,6%, $p<0,05$). В группе больных ПБХ/АИГ, максимальные показатели ДЧ отмечались в случае измерения АМА/АМА-М2 с помощью

НРИФ-ТК и ИФА (54,2-62,5%), минимальные значения - при использовании НРИФ-НЕР-2 и ИБ (37,5-31,3%) ($p<0,05$). Наименьшая частота отрицательных результатов определения АМА/АМА-2 регистрировалась при применении НРИФ-ТК (26,3%) (у больных ПБХ) и ИФА (37,5%) (у больных ПБХ/АИГ). Общая ДС исследования АМА/АМА-М2 в НРИФ-ТК (66,7%) ниже, чем у ИФА (100%, $p=0,001$), НРИФ-НЕР-2 (96,7%, $p=0,02$) и ИБ (96,7%, $p=0,02$) за счёт повышенной частоты обнаружения данных антител при НАЖБП. Относительно ЗД показатели ДС определения АМА/АМА-М2 всеми методами составляли 100%. Анализ ОППР показал, что при ПБХ «полезное» диагностическое зна-

чение имеют все методы выявления АМА/АМА-М2, включая НРИФ-ТК, НРИФ-НЕр-2, ИФА, ИБ (ОППР: 2,21; 17,4; >10,0 и 9, 47, соответственно), а при ПБХ/АИГ - НРИФ-НЕр-2, ИФА, ИБ (ОППР: 11,3; >10,0 и

9,38, соответственно). По уровню ОПОР «полезными» тестами для исключения диагноза ПБХ служили методы определения АМА/АМА-М2 с помощью НРИФ-ТК (0,39) и НРИФ-НЕр-2 (0,44), ПБХ/АИГ - ИФА (0,38).

Таблица 5

Диагностическое значение методов определения АМА/АМА-М2 в сыворотках больных ПБХ и ПБХ/АИГ

Показатели диагностической ценности	Группы обследованных	НРИФ-ТК	НРИФ-НЕр-2	ИФА	ИБ
ДЧ (%)*	ПБХ (n=19)	73,7	57,9	47,4	31,6
	ПБХ/АИГ (n=48)	54,2	37,5	62,5	31,3
ДС (%)	НАЖБП (n=30)	33,3	93,3	100	93,3
	ЗД (n=30)	100	100	100	100
	Общая группа (n=60)	66,7	96,7	100	96,7
ОППР**	ПБХ	2,21	17,4	>10,0	9,47
	ПБХ/АИГ	1,62	11,3	>10,0	9,38
ОПОР**	ПБХ	0,39	0,44	0,53	0,71
	ПБХ/АИГ	0,69	0,65	0,38	0,71

Примечание. * - ДЧ определения АМА/АМА-М2 при ПБХ методом НРИФ-ТК по сравнению с ИФА ($p=0,05$), НРИФ-ТК - с ИБ ($p=0,004$), НРИФ-НЕр-2 - с ИБ ($p=0,05$); при ПБХ/АИГ методом НРИФ-ТК по сравнению с НРИФ-НЕр-2 ($p=0,05$), ИФА - с НРИФ-НЕр-2 ($p=0,007$), НРИФ-ТК - с ИБ ($p=0,02$), ИФА - с ИБ ($p=0,006$). ** - расчёт показателей ОП проводился относительно общей ДС.

Обсуждение. В проведённом исследовании установлено, что частота обнаружения и уровни АМА/АМА-М2 в сыворотках больных ПБХ и ПБХ/АИГ, выявляемые методами НРИФ-ТК, НРИФ-НЕр-2, ИФА, ИБ существенно не различаются при данных патологических состояниях и превышают указанные показатели при НАЖБП и у ЗД. W. Zang и соавт. [12] также не наблюдали достоверных различий в частоте положительных результатов определения АМА-М2 между группами больных ПБХ (85,3%) и ПБХ/АИГ (70,8%). В большинстве случаев нами регистрировалась «умеренная» степень согласованности результатов исследования АМА/АМА-М2 всеми указанными методами ($\kappa=0,48-0,60$). В работе F. Gaiani и соавт. [10] представлены сходные данные об «умеренной» степени согласованности результатов выявления АМА/АМА-М2 посредством НРИФ и твёрдофазных методов иммунного анализа (ИФА, ИБ) ($\kappa=0,538-0,465$). Полученные результаты позволяют отнести четыре метода исследования АМА/АМА-М2 (НРИФ-ТК, НРИФ-НЕр-2, ИФА, ИБ) к числу «полезных» тестов для диагностики ПБХ (ДЧ от 31,6% до 73,7%; ДС от 66,7% до 100%; ОППР от 2,21 до >10,0; ОПОР от 0,39 до 0,71). При перекрестном синдроме ПБХ/АИГ «полезное» диагностическое значение имели три метода определения АМА/АМА-М2 (НРИФ-НЕр-2, ИФА и ИБ) (ДЧ от 31,3% до 54,2%; ДС от 96,7% до 100%; ОППР от 9,38 до >10,0; ОПОР от 0,38 до 0,71). По данным метаанализа 24-х исследований у 2992 больных ПБХ, 18 467 пациентов с другими заболеваниями печени и здоровых лиц, обнаружение АМА/АМА-М2 различными методами (НРИФ, ИФА, ИБ) при ПБХ характеризовалось высокими совокупными показателями ДЧ (84,5%; 95% доверительный интервал - ДИ - от 83,3% до 85,6%), ДС (97,8%; 95%

ДИ от 97,6% до 98,0%) и диагностической эффективности (ОППР - 25,201; 95% ДИ от 17,583 до 36,118; ОПОР - 0,162; 95% ДИ от 0,131 до 0,199) [11]. При этом у НРИФ ДЧ составляла 43,8-100%, ДС - 83,3-100%, ОППР - 30,60, ОПОР - 0,166; у ИФА - 72,9-100%, 76,5-100%, 17,75 и 0,17; у ИБ - 85,0-94,9%, 84,8-100%, 24,76 и 0,124, соответственно. В многоцентровом итальянском исследовании показано, что среди больных ПБХ ($n=164$) ДЧ выявления АМА путём НРИФ на тканевых срезах составляла 89,6%, НРИФ-НЕр-2 - 14,6%, ИФА с использованием антигена МТЗ (содержащего иммунодоминантные участки РДН-Е₂, ВСОАД-Е₂, ОGDС-Е₂) - 89,0%, ИБ с применением рекомбинантных и очищенных антигенов РДН-Е₂, ОGDС-Е₂, ВСОАД-Е₂ и Е₃-РДН - 94,5% [10]. В нашей работе отмечена более высокая ДЧ тестирования АМА в НРИФ-ТК (54,2-73,7%) по сравнению с НРИФ-НЕр-2 (37,5-57,9%), однако, в целом, ДЧ методов иммунного анализа АМА/АМА-М2, включая НРИФ, ИФА, ИБ, ниже, чем у зарубежных исследователей, что может быть связано с меньшим количеством обследованных больных ПБХ, субъективным характером оценки паттернов иммуофлюоресценции, различными уровнями позитивности изучаемых антител, а также применением рутинных технологий ИФА и ИБ без использования в тест-системах рекомбинантного антигена МТЗ, позволяющего выявлять другие субтипы АМА помимо АМА-М2. Согласно полученным результатам, при ПБХ методы определения АМА/АМА-М2 на основе НРИФ-ТК и НРИФ-НЕр-2 отличаются большей ДЧ (73,7% и 57,9%, соответственно), чем ИФА (47,4%) и ИБ (31,6%), и меньшими уровнями ОПОР (0,39 и 0,44 vs 0,53 и 0,71), поэтому представляются наиболее «полезными» первичными скрининговыми тестами для диагностики данного заболевания.

В группе больных ПБХ/АИГ методы детекции АМА/АМА-М2 с помощью ИФА и НРИФ-ТК обладали более высокой ДЧ (62,5% и 54,2%, соответственно) по сравнению с НРИФ-НЕР-2 (37,5%) и ИБ (31,3%), однако, исходя из значений ОППР \leq 2 и ОПОР $>$ 0,5, НРИФ-ТК оказался недостаточно эффективным скрининговым тестом, в то время как ИФА, имевший показатели ОППР $>$ 10,0, а ОПОР $>$ 0,2 и \leq 0,5, проявил себя в качестве наиболее полезного скринингового метода определения АМА/АМА-М2 при ПБХ/АИГ. Общая ДС исследования АМА/АМА-М2 методом НРИФ-ТК у больных ПБХ и ПБХ/АИГ ниже, чем при использовании НРИФ-НЕР-2, ИФА и ИБ (66,7% vs 96,7-100%), из-за более высокой частоты обнаружения АМА в НРИФ-ТК среди пациентов с НАЖБП, что может быть обусловлено развитием иммуновоспалительных и метаболических нарушений при данной патологии [13]. В НРИФ сходный с АМА тип свечения могут демонстрировать и другие цитоплазматические аутоантитела, например, антитела к кардиолипину, поэтому при определении АМА рекомендуется выполнять подтверждающие тесты с применением высокоспецифичных твёрдофазных методов иммунного анализа (ИФА или ИБ) [9, 10]. В настоящее время не существует эталонного метода выявления АМА/АМА-М2. Судя по нашим данным и работам других авторов, для повышения ДЧ и уменьшения количества АМА-негативных результатов при ПБХ и ПБХ/АИГ, представляется целесообразным использовать ИФА не только в качестве подтверждающего, но и скринингового теста в комбинации с определением АМА/АМА-М2 методами НРИФ-ТК и НРИФ-НЕР-2 [10, 11]. Метод ИБ, который имеет низкую ДЧ и высокую ДС, рекомендуется применять исключительно для подтверждения положительных результатов исследования АМА/АМА-М2 в скрининговых тестах.

Заключение. Частота обнаружения и уровни АМА/АМА-М2 в сыворотках больных ПБХ и ПБХ/АИГ, определяемые с помощью НРИФ-ТК, НРИФ-НЕР-2, ИФА и ИБ, не различаются при данных патологических состояниях и превышают указанные показатели при НАЖБП и у ЗД. В большинстве случаев отмечается «умеренная» степень согласованности положительных и отрицательных результатов исследования АМА/АМА-М2 методами НРИФ-ТК, НРИФ-НЕР-2, ИФА и ИБ ($\kappa=0,48-0,60$). Методы определения АМА/АМА-М2 с помощью НРИФ-ТК и НРИФ-НЕР-2 служат наиболее чувствительными и «полезными» первичными скрининговыми тестами для диагностики ПБХ. При ПБХ/АИГ наиболее высокую ДЧ и диагностическую эффективность имеет скрининговое исследование АМА/АМА-М2 методом ИФА, в то время как метод НРИФ-НЕР-2 является менее «полезным», а НРИФ-ТК - недостаточно эффективным тестом. Высокоспецифичные методы ИФА и ИБ служат «полезными» подтверждающими тестами для диагностики ПБХ и ПБХ/АИГ у лиц с положительными результатами скринингового определения АМА/АМА-М2 в НРИФ-ТК и НРИФ-НЕР-2. Для повышения ДЧ и уменьшения количества АМА-негативных результатов при ПБХ и ПБХ/АИГ целесообразно использовать ИФА не только в качестве подтверждающего, но и скринингового теста в комби-

нации с выявлением АМА/АМА-М2 методами НРИФ-ТК и НРИФ-НЕР-2.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1-7, 9-13 см.
REFERENCES)

8. Александрова Е.Н., Дорофеев А.С., Новиков А.А., Сандлер Ю.Г. Аутоантитела при аутоиммунных заболеваниях печени (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (8): 464-74. DOI: 10.51620/0869-2084-2023-68-8-464-474.

REFERENCES

1. European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practice guidelines: The diagnosis and management of patients with primary biliary cholangitis. *J. Hepatol.* 2017; 67:145–72. DOI: 10.1016/j.jhep.2017.03.022.
2. Lindor K.D., Bowlus C.L., Boyer J., Levy C., Mayo M. Primary biliary cholangitis: 2021 practice guidance update from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2022; 75(4):1012-3. DOI: 10.1002/hep.32117.
3. Bowlus C.L., Gershwin M.E. The diagnosis of primary biliary cirrhosis. *Autoimmun. Rev.* 2014; 13(4-5):441-4. DOI: 10.1016/j.autrev.2014.01.041
4. Yamagiwa S., Kamimura H., Takamura M., Aoyagi Y. Autoantibodies in primary biliary cirrhosis: recent progress in research on the pathogenetic and clinical significance. *World J. Gastroenterol.* 2014; 20(10):2606-12. DOI: 10.3748/wjg.v20.i10.2606.
5. Muñoz-Sánchez G., Pérez-Isidro A., Ortiz de Landazuri I., López-Gómez A., Bravo-Gallego L. Y., Garcia-Ormaechea M. et al. Working algorithms and detection methods of autoantibodies in autoimmune liver disease: a nationwide study. *Diagnostics (Basel)*. 2022; 12(3):697. DOI: 10.3390/diagnostics12030697.
6. Bogdanos D.P., Invernizzi P., Mackay I.R., Vergani D. Autoimmune liver serology: current diagnostic and clinical challenges. *World J. Gastroenterol.* 2008; 14(21):3374-87. DOI: 10.3748/wjg.14.3374.
7. Damoiseaux J., Andrade L.E.C., Carballo O.G., Conrad K., Francescantonio P.L.C., Fritzler M.J. et al. Clinical relevance of HEp-2 indirect immunofluorescent patterns: the International Consensus on ANA patterns (ICAP) perspective. *Ann. Rheum. Dis.* 2019; 78(7):879-89. DOI: 10.1136/annrheumdis-2018-214436.
8. Aleksandrova E.N., Dorofeev A.S., Novikov A.A., Sandler Yu.G. Autoantibodies in autoimmune liver diseases (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2023; 68(8):464-74. DOI: 10.51620/0869-2084-2023-68-8-464-474. (in Russian)
9. Sebode M., Weiler-Normann C., Liwinski T., Schramm C. Autoantibodies in autoimmune liver disease-clinical and diagnostic relevance. *Front Immunol.* 2018; 9:609. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00609.
10. Gaiani F., Minerba R., Picanza A., Russo A., Melegari A., De Santis E. et al. Optimization of laboratory diagnostics of primary biliary cholangitis: when solid-phase assays and immunofluorescence combine. *J. Clin. Med.* 2022; 11(17):5238. DOI: 10.3390/jcm11175238.
11. Hu S.; Zhao F.; Wang Q.; Chen W.X. The accuracy of the anti-mitochondrial antibody and the M2 subtype test for diagnosis of primary biliary cirrhosis: a meta-analysis. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2014; 52: 1533–42. DOI: 10.1515/cclm-2013-0926.
12. Zhang W., De D., Mohammed K.A., Munigala S., Chen G., Lai J.-P., Bacon B.R. New scoring classification for primary biliary cholangitis-autoimmune hepatitis overlap syndrome. *Hepatol. Commun.* 2018; 2(3):245-53. DOI: 10.1002/hep4.1148.
13. Tsuneyama K., Baba H., Kikuchi K., Nishida T., Nomoto K., Hayashi S. et al. Autoimmune features in metabolic liver disease: a single-center experience and review of the literature. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 2013; 45 (1):143-8. DOI: 10.1007/s12016-013-8383-x.