

РЕЗЮМЕ

ОСОБЛИВОСТІ СУБПОПУЛЯЦІЙНОГО СКЛАДУ ЛІМФОЦИТІВ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ У ХВОРИХ НА ЦУКРОВИЙ ДІАБЕТ 2 ТИПУ ТА НЕАЛКОГОЛЬНОЇ ЖИРОВОЇ ХВОРОБИ ПЕЧІНКИ

ЛИТВИНЕНКО К.О.¹, БОДНАР П.М.¹, ЛІСЯНИЙ М.І.,²
ПОТАПОВА А.І.²

Національний медичний університет імені О.О.Богомольця¹
ДУ «Інститут нейрохірургії імені академіка А.П.Ромоданова
НАМН України»²

Мета роботи - дослідження рівня основних субпопуляцій лімфоцитів у хворих на цукровий діабет 2 типу (ЦД-2) ЦД -2 і НАЖБП. Обстежено 110 хворих, серед них: 60 пацієнтів з ЦД- 2 типу та НАЖХП (I група), 25 - з ЦД2 (II група) і 25 пацієнтів з НАЖХП (III група). Контрольну групу склали 25 здорових людей. Кількісний склад субпопуляцій лімфоцитів периферичної крові обстежуваних вивчали на проточному цитофлюориметрії «FC- 500» («Beckman Coulter», США) за програмою Cytomics CXP Software з використанням подвійних комбінацій моноклональних антитіл, виробництва «Beckman Coulter», США і антитіл фірми «Сорбент», Росія. У пацієнтів всіх обстежуваних груп виявлено дисбаланс у складі субпопуляцій лімфоцитів, що проявлявся збільшенням концентрації CD20 + клітин, зниженням вмісту CD8 і CD16 клітин при відносному стабільному рівні Т хелперної (CD4) субпопуляції клітин. У хворих на ЦД2 та НАЖБП відзначається підвищена апоптична готовність лімфоцитів, що проявлялась збільшенням вмісту CD95+ клітин в крові. Дисбаланс субпопуляцій лімфоцитів на тлі збільшеного вмісту циркулюючих імунних комплексів у крові, може бути доступним методом оцінки ступеня і тяжкості імунних порушень на цукровий діабет типу 2.

Ключові слова: цукровий діабет типу 2, неалкогольна жирова хвороба печінки, субпопуляції лімфоцитів, циркулюючі імунні комплекси.

SUMMARY

FEATURES OF THE SUBPOPULATIONS OF LYMPHOCYTES IN PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES AND NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE

LYTVYNNENKO K.O.¹, BODNAR P.N.¹, LYSYANYK N. I.²,
POTAPOVA A.I.²

National O.O. Bohomolets Medical University, Kyiv, Ukraine¹
Institute of neurosurgery named after A.P. Romodanov
of NAMS of Ukraine²

Purpose - to study the content of basic lymphocyte subpopulations in patients with type 2 diabetes and NAFLD when combined. We examined 110 patients, including 60 patients with type 2 diabetes (DM2) and NAFLD (I group), 25 - with DM2 (II group) and 25 patients with NAFLD (III group). The control group was 25 healthy people. Quantitative composition of the lymphocyte subpopulations in peripheral blood of the subjects were studied by flow cytometry «FC- 500» («Beckman Coulter», USA) Cytomics CXP Software program using binary combinations of monoclonal antibodies production «Beckman Coulter», and antibodies U.S. company « Sorbent », Russia. Patients of all of the groups revealed the presence of an imbalance in the composition of lymphocyte subpopulations, manifested increasing concentration of CD-20+ cells, decrease in the content CD- 8 and CD- 16 cells at a relatively stable level of T helper (CD- 4) cell subpopulations. In patients with type 2 diabetes and NAFLD have an increased willingness to apoptotic lymphocytes, which manifests an increase in the content of CD- 95+ cells in the blood. Imbalance of lymphocyte subpopulations, with increased content of circulating immune complexes in the blood, may be available method for assessing the extent and severity of immune disorders with type 2 diabetes mellitus.

Key words: type 2 diabetes, nonalcoholic fatty liver disease, lymphocyte subsets, circulating immune complexes.

Удк 616-097.1/.3-076

ОЦЕНКА АНАЛИТИЧЕСКОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ, ВАРИАБЕЛЬНОСТИ И СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИФА ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКОГО IgE

ПРИЛУЦКИЙ А.С., ЛЕСНИЧЕНКО Д.А., КУЗНЕЦОВА Л.В.,
ПРИЛУЦКАЯ И.А., ПУЗИК А.А., НАЗАРЕНКО А.П., МАЦЕГОРА А.С.,
БОРЗЕНКО Б.Г., РЕЗНИЧЕНКО Н.А.

Донецкий национальный медицинский университет им.М.Горького,
Национальная медицинская академия последипломного
образования им. П.Л. Шупика

В последнее время наблюдается повсеместный рост частоты аллергических заболеваний. При исследовании динамики распространенности аллергических заболеваний за последние 30 лет показано, что каждые 10 лет число лиц,

страдающих аллергией, удваивается [1]. Стремительному распространению аллергических заболеваний способствуют следующие факторы: резкое увеличение числа аллергенов в среде обитания, как следствие научно-технического

прогресса (химизация производства, быта и др.); загрязнение окружающей среды. В настоящие дни влиянию аллергенов подвержено большее количество людей, а их вредное воздействие стало массированным, частым, продолжительным. Участились случаи воздействия на организм одновременно нескольких веществ как антигенного, так и раздражающего действия. Учитывая повсеместный ежегодный рост аллергических заболеваний (в среднем каждый третий житель планеты страдает аллергическим ринитом и каждый десятый - бронхиальной астмой), можно говорить о пандемии аллергии, которая с конца прошлого века охватила большинство стран мира [2,3].

Эффективное лечение и профилактика аллергических заболеваний невозможны без достоверной информации о том, на какие конкретно аллергены присутствует сенсibilизация у больного. На сегодняшний день, широко распространенные методы специфической алергодиагностики *in vivo* имеют ряд противопоказаний. Кроме того они не способны выявить сенсibilизацию к ряду аллергенов. Вместе с тем не вызывает сомнений, необходимость достоверной специфической диагностики аллергии с определением причинных аллергенов в каждом конкретном случае.

Доказано, что установление сенсibilизации необходимо проводить с помощью определения уровней специфических IgE антител. В настоящее время на рынке имеется большой выбор тест-систем различного производства для определения алерген-специфических и общего IgE. Но они, как правило, достаточно дороги и не могут выявлять сенсibilизации к алергенам характерным для территории Украины (ряду пищевых продуктов и др.). В Украине подобные тест-системы до недавнего времени не производились. Первые отечественные тест-системы для специфической алергодиагностики разработаны и зарегистрированы в 2013 году ООО «Укрмед-Дон» и основаны на методе ИФА и имеют целый ряд преимуществ, среди которых: малые объемы крови, необходимые для анализа (до 2–3 мл сыворотки при выполнении 20–30 анализов); высокая специфичность и чувствительность анализа; простота и быстрая выполнимость методики (3–4 часа); безопасность для обследуемого, а также более низкая себестоимость диагностики [4,5].

Для получения достоверных результатов диагностических-тестов необходим постоянный контроль качества проводимых исследований. Надежность иммуноферментного метода характеризуется его специфичностью, чувствительностью, а также воспроизводимостью результатов исследования.

Целью исследования было определение чувствительности, сходимости и воспроизводимости первых отечественных иммуноферментных (ИФА) тест-систем для определения в сыворотке концентрации специфического IgE, а также сравнение результатов анализа отечественных тест-систем с результатами тест-систем одного из ведущих мировых производителей.

В процессе выполнения работы ставились следующие задачи:

1. Определение аналитической чувствительности (*sensitivity*) тест-систем, с помощью двух методов:
 - минимальной концентрации определяемых IgE специфических антител, при которых имеется статистически значимое различие фонового сигнала и пробы, содержащей специфические IgE антитела.
 - методом 3σ отклонения нулевого стандарта, т.е. образца заведомо не содержащего определяемого реагента.
2. Определение сходимости (*convergence*) — близость результатов измерений, выполняемых в одинаковых условиях теста.
3. Определение воспроизводимости (*reproducibility*) — степени сходимости результатов измерений, полученных при различных условиях теста.
4. Проведение сравнительного анализа результатов первых отечественных тест-систем ООО «Укрмед-Дон» и наборов одного из ведущих мировых производителей с помощью метода анализа ROC-кривых.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Разработанные тест-системы основаны на методе твердофазного ИФА, с помощью которого проводится количественное определение алергенспецифических IgE в крови и имеют следующие характеристики: общее время анализа - 3 ч 30 мин; диапазон измерений от 0 – 100 МЕ/мл; оптическая плотность диапазона от 0,04 до 3,50. Объем сыворотки необходимый для проведения одного исследования в дублях – 100 микролитров.

Исследование аналитических характеристик тест-систем проводилось следующим образом:

1. Чувствительность разработанных тест-систем оценивалась методом минимальных серийных разведений. Было проведено сравнение среднего значения оптической плотности 10 серий по 10 повторов стандарта «0 МЕ/мл» со средними значениями оптической плотности 10 повторов образцов, содержащих 0,05 МЕ/мл, 0,075 МЕ/мл 0,1 МЕ/мл и 0,2 МЕ/мл, используя критерий Стьюдента (распределение соответствовало нормальному).

2. Для оценки чувствительности тест-системы вторым методом анализировались результаты 10 серий исследований (в каждом по 10 повторов) стандарта «0 МЕ/мл» с помощью метода 3σ отклонения нулевого стандарта. Далее производился расчет среднего арифметического и стандартного отклонения с помощью критерия Стьюдента (распределение соответствовало нормальному).

Величина стандартного отклонения (σ) для нулевого стандарта, рассчитывалась по формуле:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - m)^2}{n-1}}, \text{ где}$$

σ - стандартное отклонение,
 n - число измерений,

x_i - величина сигнала для данного измерения,

m - среднее арифметическое от x_i

Оптическая плотность, характеризующая чувствительность, определялась по формуле:

$$OD = m + 3\sigma, \text{ где}$$

m - среднее арифметическое нулевого стандарта;

σ - стандартное отклонение нулевого стандарта.

После этого рассчитывалось среднее значение концентрации специфического IgE по калибровочной кривой. Отклонения 3σ оптической плотности нулевого стандарта, соответствующие полученному значению характеризовали чувствительность испытуемых иммуноферментных тест-систем ($p < 0,01$).

3. Для определения сходимости анализировали результаты постановки десяти серий по 10 повторов контрольной сыворотки, входящей в состав разработанных тест-систем. Полученные ряды подчинялись нормальному закону распределения. С помощью калибровочной кривой рассчитывалось содержание специфических IgE в каждом повторе, затем для всех 100 повторов рассчитывался коэффициент вариации по формуле:

$$CV(\%) = \frac{\sigma}{m} \times 100, \text{ где}$$

σ - стандартное отклонение;

m - среднее арифметическое.

4. Воспроизводимость результатов оценивалась следующим образом. В плановых постановках в лунки планшета, наряду с исследуемыми пробами, вносилась исполь-

зуемая контрольная сыворотка в двух повторах. Исследования проводились на протяжении 10 дней ежедневно. Далее результаты измерений контрольной сыворотки в каждом дубле статистически обрабатывались. Было вычислено среднее значение (m), среднеквадратическое отклонение (σ) и коэффициент вариации при оценке воспроизводимости (CV). Коэффициент вариации, который характеризует воспроизводимость результатов, рассчитывался по формуле:

$$CV_{cp} = \sum CV_i / 10, \text{ где}$$

CV_i - коэффициент вариации для каждой из 10 серий.

5. Результаты анализа, полученные тест-системами отечественного производства и импортными тест-системами сравнивались следующим образом. Были отобраны больные, у которых исследованы уровни специфического IgE к нескольким аллергенам тест-системами фирм ООО «Укрмед-Дон» (Донецк, Украина) и «Phadia AD» (Швеция). Результаты тест-систем «Phadia AD» изначально были приняты за эталон. Полученные данные сравнили с помощью метода ROC - кривых. Для получения численного значения клинической значимости теста, использовался показатель площади под кривыми AUC (Area Under Curve) [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании чувствительности разработанных тест-систем с помощью метода серийных разведений не было выявлено достоверной разницы между средними значениями оптической плотности нулевого стандарта и образца с концентрацией IgE 0,05 МЕ/мл (рис. 1). Вместе с тем, данные образца, в котором отсутствовали IgE антитела, достоверно ($p < 0,05$) отличались от показателей, характеризующих средние значения оптической плотности образцов с концентрацией IgE 0,075 МЕ/мл, 0,1 МЕ/мл и более.

Расчет чувствительности разработанных тест-систем методом 3σ показал, что среднее значение оптической плотности пробы «0», полученное после постановки 10 серий по 10 повторов, составляет 0,086 при значении среднеквадратического отклонения 0,003 единиц. Следовательно, достоверное различие сигнала оптической плотности исследуемой концентрации от оптической плотности нулевого стандарта составляет 0,009 единиц. Таким образом, минимальная концентрация определяемого реагента имеет оптическую плотность 0,095 единиц (соответствует 0,053 МЕ/мл).

При определении сходимости результатов был получен средний коэффициент вариации из 10 серий по 10 повторов равный $3,81 \pm 0,21\%$, который показывает, высокую сходимость результатов, полученных с помощью разработанных тест-систем.

При определении воспроизводимости результатов установлен средний коэффициент вариации из 10 серий по 10 повторов равный $1,62 \pm 0,42\%$, с колебаниями в течение 10 серий постановок в интервале от 0,24% до 4,16%.

Сравнение результатов первых отечественных тест систем методом ROC – кривых показало следующее. Площадь под кривой (AUC) для тест-системы ООО «Укрмед-Дон», по отношению к шведскому производителю, составила 0,957. Воспользовавшись экспертной шкалой AUC, получили, что данное значение AUC соответствует отличному качеству диагностического теста. Графическое сравнение кривых обеих тест-систем представлено ниже (рис.2)

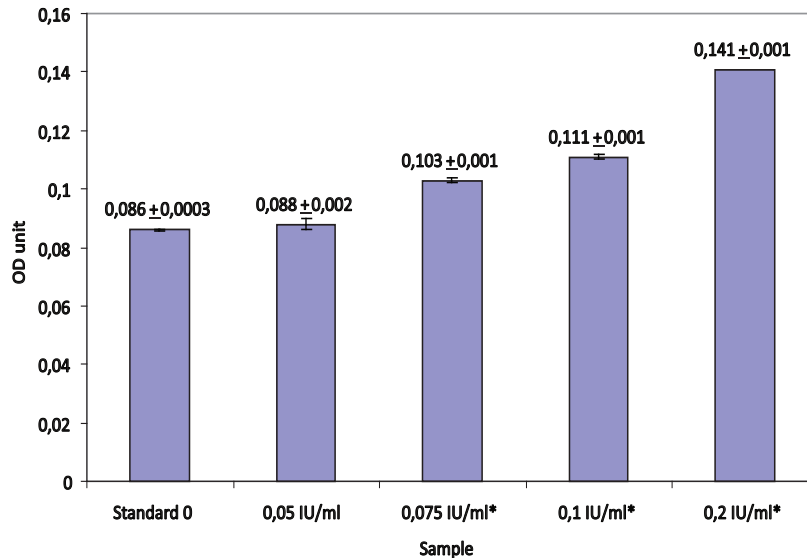


Рис. 1. Средние значения оптической плотности нулевого стандарта и образцов серийных разведений, ед.ОП (примечание: * - $p < 0,001$).

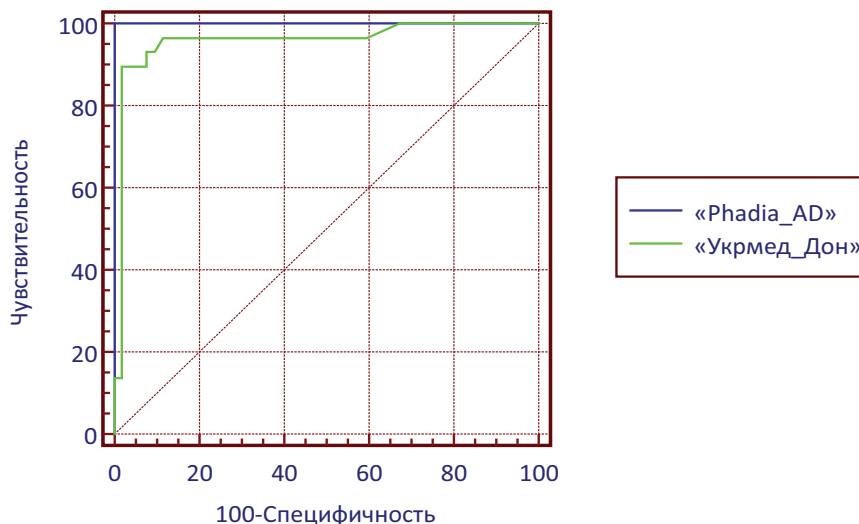


Рис. 2: График ROC – кривых тест-систем производства ООО «Укрмед-Дон» и «Phadia AD».

Таким образом, установлено, что разработанные первые отечественные иммуноферментные тест-системы IV поколения для определения специфических IgE имеют высокую анали-

тическую чувствительность колеблющуюся от 0,05 до 0,075 МЕ/мл, в зависимости от метода определения, и характеризуются высокими показателями сходимости (средний коэффициент

варіації $3,81+0,21\%$) і воспроизводимости (средний коэффициент вариации $1,62+0,42\%$). При сравнении результатов разработанных тест-систем с тест-системами одного из ведущих мировых производителей методом ROC – кривых были получены почти идентичные результаты: площадь под кривой (AUC) составила 0,957.

ВЫВОДЫ

1. Чувствительность разработанных иммуноферментных тест-систем для определения специфических IgE составляет 0,05 МЕ/мл при определении методом 3σ , и 0,075 МЕ/мл при определении методом серийных разведений.
2. Разработанные тест-системы характеризуется высокими показателями сходимости (средний коэффициент вариации $3,81+0,21\%$) и воспроизводимости (средний коэффициент вариации $1,62+0,42\%$).
3. Результаты анализа разработанных тест-систем совпадают с результатами ведущих мировых производителей (AUC составил 0,957).
4. Первые отечественные, зарегистрированные в Украине, тест-системы показали отличные результаты в ходе проведения исследования и сравнительного анализа. Разработанные тест-системы рекомендуются для повсеместного использования в Украине в целях диагностики специфической сенсibilизации и для проведения научных исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лусс Л.В. Этиология, патогенез, проблемы диагностики и лечения аллергического ринита / Л.В. Лусс //Русский медицинский журнал. — 2003. — Т.11, №12. — С.718-729.
2. Allergens in Allergy Diagnosis: A Glimpse at Emerging New Concepts and Methodologies / I. Giangrieco, C. Rafaiani, M. Ciardiello [et al.] // Translational Medicine UniSa. – 2012. – Vol.4. – P.27-33.
3. Analysis of allergens in 5 473 patients with allergic diseases in Harbin, China / M.L. Chang, B. Shao, Y.H. Liu [et al.] // Biomed Environmental Sciences. — 2013. — 26(11). — P.886-893.
4. Нормы специфических IgE у детей различного возраста / А.С. Прилуцкий, Д.А. Лесниченко, В.А. Деев и др. // Лабораторна діагностика. – ТОВ “ДІА”. – 3(65). – 2013. – С.8-11.

5. Прилуцкий А.С. Опыт разработки ИФА тест-систем для определения специфического IgE к различным алергенам / А.С. Прилуцкий, Л.В. Кузнецова, Д.А. Лесниченко // Лабораторна діагностика. – ТОВ “ДІА”. – 2(64). – 2013. – С.32-36.
6. Kottas M. A modified Wald interval for the area under the ROC curve (AUC) in diagnostic case-control studies / M. Kottas, O. Kuss, A. Zapf // BMC Medical Research Methodology. – 2014. – P.14–26.

РЕЗЮМЕ

ОЦІНКА АНАЛІТИЧНОЇ ЧУТЛИВОСТІ, ВАРІАБЕЛЬНОСТІ І ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ІФА ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ СПЕЦИФІЧНОГО IgE.

Прилуцький О.С., Лесніченко Д.А., Кузнецова Л.В., Прилуцька І.О., Пузік А.А., Назаренко О.П., Мацегора А.С., Борзенко Б.Г., Резніченко Н.А.

Дана стаття присвячена визначенню аналітичних характеристик та порівняльному аналізу перших вітчизняних ІФА тест-систем ТОВ «Укрмед-Дон». У ході дослідження було встановлено, що розроблені тест-системи мають високу чутливість, збіжність і відтворюваність результатів. При порівняльному аналізі результатів тест-систем «Укрмед-Дон» і наборів одного з провідних світових виробників методом ROC-кривих були отримані майже ідентичні результати (площа під кривою склала 0,957). При дослідженні розроблені тест-системи показали відмінні результати і рекомендуються для повсюдного використання в Україні в практиці та науковій діяльності.

Ключові слова: алергія, специфічний IgE, ІФА, ROC-крива.

SUMMARY

EVALUATION OF THE ANALYTICAL SENSITIVITY, VARIABILITY AND COMPARATIVE ANALYSIS OF ELISA TEST KITS FOR DETECTION OF SPECIFIC IgE.

Prilutskiy A.S., Lesnichenko D.A., Prilutskaya I.A., Kuznetsova L.V., Puzik A.A., Nazarenko O.P., Matsehora A.S., Borzenko B.H., Reznichenko N.A.

This article is devoted to the definition of analytical characteristics and comparative analysis of the first domestic ELISA test kits LLC “Ukrmed-Don”. Study of developed test kits showed their high sensitivity, reproducibility and convergence. A comparative analysis of the results of test kits «Ukrmed-Don» and sets of one of the leading manufacturers by ROC curve method showed almost identical results (area under the curve was 0.957). Developed test kits showed excellent results and recommended for general use in Ukraine in practice and research.

Key words: allergy, specific IgE, ROC curve.