



УДК 579.835.12:616-074:541.64:612.017

Е.А. Березняк¹, Л.М. Веркина¹, Ю.Л. Березняк², И.Р. Симонова¹

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АНТИГЕННОГО ПОЛИМЕРНОГО ХЕЛИКОБАКТЕРНОГО ДИАГНОСТИКУМА

¹Ростовский-на-Дону противочумный институт

Россия, 344002, г. Ростов-на-Дону, ул.М.Горького 117/40. E-mail: labbiobez@mail.ru

²Ростовский государственный медицинский университет

Россия, 344002, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29

Цель: изучение операционных диагностических характеристик нового разработанного хеликобактерного диагностикума, предназначенного для определения суммарных антител в сыворотке крови в реакции объемной агломерации.

Материалы и методы: с помощью сконструированного антигенного полимерного хеликобактерного диагностикума исследованы сыворотки крови 224 пациентов с жалобами на заболевания органов пищеварения. В качестве референтных применяли коммерческие тест-системы: «ХеликоБест-антитела» производства ЗАО «Вектор-Бест» и тест-системы «ЭКОлаб-Хеликобактер JgA» и «ЭКОлаб-Хеликобактер JgG».

Результаты: определены операционные диагностические характеристики сконструированного антигенного латексного хеликобактерного диагностикума, полученные с помощью референтных ИФА-тест систем. Для точки разделения 1:160 чувствительность, специфичность и диагностическая эффективность диагностикума составляют соответственно 94,9%, 79,3% и 88,2%.

Заключение: показано, что точка разделения 1:160 может быть использована в качестве диагностического порога.

Ключевые слова: полимерный антигенный хеликобактерный диагностикум, диагностические характеристики.

E.A. Bereznyak¹, L.M. Verkina¹, Y.L. Bereznyak², I.R. Simonova¹

DIAGNOSTIC CHARACTERISTICS OF A LATEX ANTIGEN HELICOBACTER TEST-SYSTEM

¹Rostov-on Don Institute for Plague Control of the Federal Agency on Consumer Rights Protection and Human Welfare Supervision

117/40 Gorky st., Rostov-on-Don, 344002, Russia. E-mail: labbiobez@mail.ru

²Rostov State Medical University

29 Nakhichevansky st., Rostov-on-Don, 344022, Russia

Purpose: The study of operation diagnostic characteristics of a newly constructed helicobacter test-system which is designed to determine the total antibodies in the blood serum in volumetric agglomeration reaction.

Materials and methods: Blood sera of 224 gastroenterological patients were studied with the help of diagnostic system constructed. Commercial immune-enzyme blood assay systems were used to be the referent method.

Results: Diagnostic operation characteristics of a latex antigen helicobacter test-system were determined with the help of referent serological diagnostic methods. At the cut-off point 1:160 the sensitivity, specificity and diagnostic effectiveness are 94,9%, 79,3% и 88,2%, respectively.

Summary: The cut-off point 1:160 is shown to be used as a diagnostic threshold.

Key words: latex antigen helicobacter test-system, diagnostic characteristics.



Введение

Диагностика хеликобактер-ассоциированных заболеваний осуществляется с помощью многих лабораторно-клинических методов исследования, их оптимальное сочетание для достоверного выявления *H. pylori* остается предметом обсуждения [1, 2, 3]. Самым простым, наименее дорогим и наиболее доступным методом диагностики хеликобактериоза является серологический метод. Он также незаменим и наиболее информативен для выяснения инфицированности больших групп людей при проведении эпидемиологических обследований [4].

В настоящее время большое внимание уделяется конструированию диагностических тест-систем на синтетических полимерных носителях, которые, в отличие от биологических носителей, могут быть охарактеризованы по заряду, химическому строению, диаметру, распределению частиц по размеру и могут сохранять стабильные свойства. Такие тест-системы используются для экспресс-диагностики возбудителей инфекционных заболеваний животных и человека [5, 6].

В Ростовском-на-Дону противочумном институте идентификация возбудителей различных инфекций осуществляется с помощью полимерных диагностикумов в реакции агломерации объемной (РАО), которая представляет собой реакцию между суспензионными антигенами (антигенами, адсорбированными на частицах суспензий) и гомологичными антителами [7].

Цель работы - изучение операционных диагностических характеристик нового разработанного хеликобактерного диагностикума, предназначенного для определения суммарных антител в сыворотке крови в реакции объемной агломерации.

Материалы и методы

Сыворотки крови 224 пациентов с жалобами на заболевания органов пищеварения исследовали в РАО. За положительный результат принимали цветной ярко-розовый агломерат, выстилающий дно лунок микропланшета равномерным слоем. В отрицательных случаях и в контроле наблюдали компактное колечко или «точку» в центре лунки.

В качестве референтных применяли коммерческие тест-системы: «ХеликоБест-антитела» производства ЗАО «Вектор-Бест», выявляющую специфические иммуноглобулины классов М, А и G к антигену CagA *H. pylori* (первый этап исследования - 142 сыворотки крови), и тест-системы «ЭКОлаб-Хеликобактер JgA» для выявления антител класса А и «ЭКОлаб-Хеликобактер JgG» для выявления антител класса G (второй этап исследования - 82 сыворотки крови). Работу с указанными тест-системами осуществляли согласно инструкции по применению производителя. Оптическую плотность измеряли на автоматическом фотометре для микропланшетов и стрипов ELx800 (BioTek).

Оценку эффективности сконструированного полимерного диагностикума осуществляли на основе четы-

рехпольных таблиц с использованием общепринятых операционных показателей диагностического теста [8].

Результаты и их обсуждение

При хеликобактериозе циркулирующие антитела обычно представлены иммуноглобулинами класса IgG. Системный IgA-ответ как правило менее выражен, но может указывать на более сильное местное воспаление. В редких случаях у инфицированного человека может наблюдаться только IgA-ответ. Антитела класса IgM выявляются редко, их присутствие может указывать на раннюю инфекцию *Helicobacter pylori* [9].

Сконструированный в Ростовском-на-Дону противочумном институте антигенный полимерный диагностикум предназначен для определения суммарных антител к *H. pylori* в сыворотке крови, поэтому для оценки его диагностической эффективности на первом этапе исследования в качестве референтной была выбрана тест-система для ИФА «ХеликоБест-антитела» (ЗАО «Вектор-Бест»).

С помощью ИФА-тест-системы наличие антител в исследуемых сыворотках крови было обнаружено в 77 пробах (54,2%), антитела отсутствовали в 65 пробах (45,8%).

Поскольку сконструированный диагностикум демонстрировал неспецифическую перекрестную реакцию с кампилобактерными сыворотками в титре 1:40, в качестве первой точки разделения было выбрано значение титра в РАО 1:80, в два раза превышающего верхнюю границу перекрестных реакций. При этой точке разделения в группу истинно положительных (ИП) попадают 73 результата, истинно отрицательными (ИО) являются 20 результатов, всего совпадения в двух методах наблюдались в 93 случаях. Таким образом, точность (диагностическая эффективность) при точке разделения 1:80 составляет 65,5%. Диагностические чувствительность и специфичность полимерного антигенного диагностикума для титра 1:80 составили 94,8% и 30,8%, соответственно.

Распределение числа положительных и отрицательных результатов в двух тестах для точки разделения 1:160 было следующим: ИП - 70 результатов, ИО - 51, всего совпадающие в двух методах результаты наблюдались в 121 случае, таким образом, точность диагностикума для точки разделения 1:160 составила 85,2%. Диагностическая чувствительность составила 90,9%, специфичность диагностикума - 80,5%.

При выборе точки разделения 1:320 ИП были 62 результата, ИО - 55, всего совпадения результатов двух методов наблюдались в 117 случаях, т.е. диагностическая эффективность теста составила 82,4%. Диагностические чувствительность и специфичность диагностикума в этом случае оказались равными 80,5% и 84,6% соответственно.

Для точки разделения 1:640 оказалось, что положительные и отрицательные результаты совпали в 40 и 61 случаях соответственно. Точность при этом составляла 71,1%. Чувствительность диагностикума - 51,9%, специфичность - 93,8%.

Операционные характеристики диагностикума, полученные для указанных четырех точек разделения (серия 1), приведены в таблице 1.



Операционные характеристики антигенного полимерного хеликобактерного диагностикума (серия 1)

| Номер точки разделения | Точка разделения (титр) | Диагностическая чувствительность, % | Диагностическая специфичность, % | Точность, % |
|------------------------|-------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|-------------|
| 1 | 1:80 | 94,8 | 30,8 | 65,5 |
| 2 | 1:160 | 90,9 | 80,5 | 85,2 |
| 3 | 1:320 | 80,5 | 84,6 | 82,4 |
| 4 | 1:640 | 51,9 | 93,8 | 71,1 |

Графики чувствительности, специфичности и точности диагностикума в зависимости от точки разделения представлены на рис. 1.

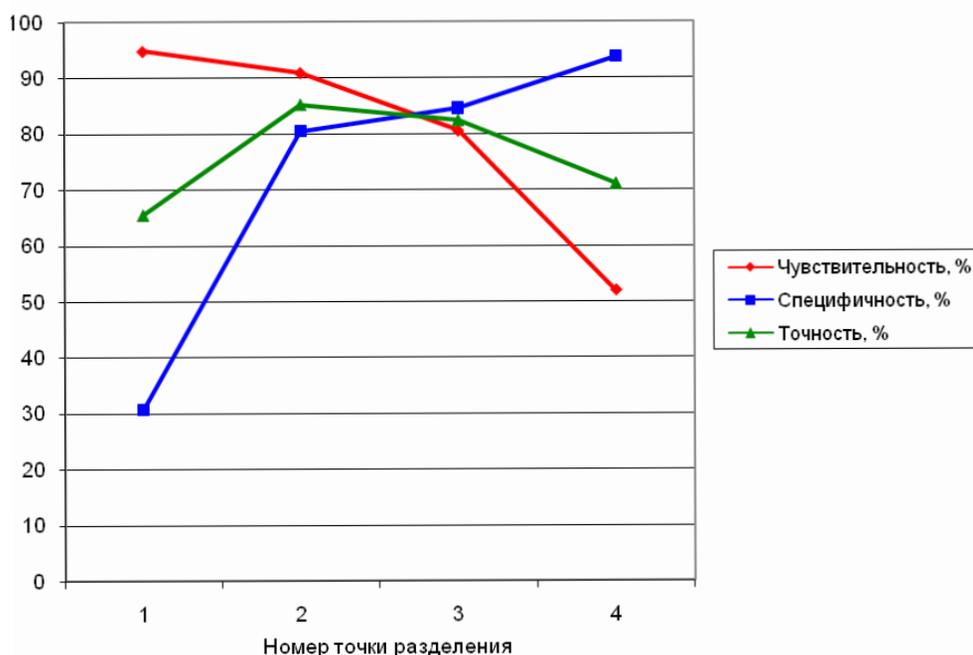


Рисунок 1. Диагностические характеристики полимерного диагностикума.

Как видно из графиков рис. 1, оптимальные соотношения между чувствительностью, специфичностью и точностью диагностикума имеют место при точках разделения 1:160 и 1:320. Точка разделения 1:80 при высокой чувствительности характеризуется незначительной специфичностью, при этом точность полимерного препарата также оказывается невысокой. Для точки разделения 1:640 высокой является специфичность метода, однако чувствительность и точность оказываются явно недостаточными.

Следует отметить, что для точки разделения 1:160 ложноположительный результат в РАО наблюдался в 14 случаях. Все ложноположительные результаты были проверены в реакции торможения специфической активности. В реакции торможения наблюдалось специфическое укорочение ряда в 8 из указанных 14 случаев. Этот факт говорит о том, что в большей своей части результаты, которые методом РАО оцениваются как положительные при отрицательном результате ИФА-метода, и в самом деле являются положительными.

Использовавшаяся в предварительной серии экспериментов тест-система «ХеликоБест-антитела» имеет широкое применение в лабораторной практике, однако она способна выявлять антитела только к *сagA*-положительным штаммам и принципиально не может выявлять антитела к *сagA*-негативным штаммам *H. pylori*. Частичное несовпадение результатов тестирования сывороток крови в первой серии экспериментов этой тест-системой и антигенным полимерным диагностикумом могло быть обусловлено именно этим обстоятельством, особенно, если учесть, что около 18% штаммов, циркулирующих в ростовском регионе, по нашим данным, являются *сagA*-негативными [10].

В связи с этим на втором этапе оценки эффективности сконструированного диагностикума в качестве референтных нами были взяты результаты, полученные при одновременном тестировании образцов сывороток крови с помощью тест систем ИФА: «ЭКОлаб-Хеликобактер-IgA» и «ЭКОлаб-Хеликобактер-IgG», определяющих, со-



ответственно, иммуноглобулины А и G к суммарным антигенам H. pylori, и «ХеликоБест-антитела», способной определять специфические иммуноглобулины к антигену CagA H.pylori. Такой подход позволил включить в группу сравнения и пациентов, инфицированных cagA-негативными штаммами.

Материалом для исследования явились сыворотки крови 82 человек, обратившихся в диагностический центр Ростовского-на-Дону противочумного института.

Так как тест-системы «ЭКОлаб-Хеликобактер-IgA» и «ЭКОлаб-Хеликобактер-IgG» определяют антитела разных классов, результат метода сравнения считался положительным, если положительными были одновременно результаты теста «ХеликоБест-антитела» и, по крайней мере, одного из указанных тестов «ЭКОлаб» (34 случая). Отрицательным результат метода сравнения считался при одновременных отрицательных результатах всех трех референтных тестов (29 случаев).

Поскольку результаты предварительного анализа диагностических возможностей полимерного препарата показали, что точки разделения 1:160 и 1:320 дают оптимальные соотношения между чувствительностью, специфичностью и точностью, в данной серии экспериментов операционные характеристики диагностикума рассчитывались именно для этих двух точек разделения.

Для точки разделения 1:160 ИП были 37 результатов, ложноотрицательными (ЛО) - 2. ИО были 23 результата, ложноположительными (ЛП) - 6. Таким образом, совпадение результатов во всех тестах имело место в 60 случаях (точность 88,2%). Диагностическая чувствительность антигенного полимерного диагностикума для точки разделения 1:160 составила 94,9%, диагностическая специфичность - 79,3%.

Результаты тестирования диагностикума для точки разделения 1:320 были следующими: ИП - 33 результата, ЛО - 6, ИО - 25 результатов, ЛП - 4. Всего совпадения положительных и отрицательных результатов имели место в 58 случаях (точность полимерного диагностикума 85,3%). Чувствительность для точки разделения 1:320 составила 84,6%, специфичность - 86,2%.

В таблице 2 приведены диагностические характеристики сконструированного антигенного полимерного хеликобактерного РАО-диагностикума для двух представляющих интерес точек разделения (серия 2).

Таблица 2

Диагностические характеристики антигенного полимерного хеликобактерного диагностикума (серия 2)

| Операционная характеристика | Точка разделения 1:160 | Точка разделения 1:320 |
|--|------------------------|------------------------|
| Чувствительность (Se) | 94,9% | 84,6% |
| Специфичность (Sp) | 79,3% | 86,2% |
| Диагностическая эффективность (точность, De) | 88,2% | 85,3% |

Представленные в таблице 2 данные подтверждают существование проблемы выбора адекватной точки разделения при использовании диагностического препарата. Если в качестве точки разделения выбрать точку 1:160, то сконструированный диагностикум пропустит только 5% больных хеликобактериозом, но около 21% обследуемых будут встревожены из-за ложноположительного результата тестирования. При повышении диагностического порога до 1:320 пропущенными окажутся 15% больных хеликобактериозом, однако ложноположительный результат будет иметь место у 14% обследуемых.

С учетом того, что для точки разделения 1:160 диагностическая эффективность антигенного полимерного хеликобактерного диагностикума оказывается выше, представляется целесообразным использовать эту точку в качестве диагностического титра.

Выводы

Результаты проведенного исследования показывают, что точка разделения 1:160 может быть предложена в качестве диагностического порога для сконструированного антигенного полимерного хеликобактерного диагностикума.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барышникова, Н. В. Актуальные проблемы диагностики хеликобактериоза / Н. В. Барышникова // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. - 2009. - №2. - С. 50-54.
2. Mégraud, F. Helicobacter pylori Detection and Antimicrobial Susceptibility Testing / F. Mégraud, P. Lehours // Clinical Microbiology Reviews. - 2007. - Vol. 20. - No. 2. - P. 280-322.
3. Жуховицкий, В. Г. «Золотой стандарт» и алгоритм микробиологической диагностики хеликобактериоза / В. Г. Жуховицкий, Л. В. Диденко, Н. Д. Константинова // Клин. лаб. диагн. - 2005. - №9. - С.52-53.
4. Malfertheiner, P. Guidelines for the management of Helicobacter pylori infection. Summary of the Maastricht III 2005 consensus report. Business Briefing / P. Malfertheiner, F. Megraud, C. O'Morain // European Gastroenterology Review. - 2005. - P. 59-63.
5. Basinska, T. Principle of a new immunoassay based on electrophoretic mobility of poly(styrene/alpha-tert-butoxy-omega-vinylbenzyl-polyglycidol) microspheres: application for the determination of Helicobacter pylori IgG in blood serum / T. Basinska, M. Wisniewska, M. Chmiela // Macromol. Biosci. - 2005. - Vol.5 (1). - P. 70-77.
6. Станишевский, Я.М. Создание диагностических тест систем «Полимерная микросфера-биолиганд» медико-биологического применения: автореф. дис...док. хим. наук: 03.01.06: - Москва, 2012.- 47с.
7. Адамов, А. К., Агафонов, В. И. Суспензионные антигены, антитела и иммуносорбенты / - М.: 1969. - 175 с.
8. Флетчер, Р., Флетчер С., Вагнер Э. Клиническая эпидемиология. Основы доказательной медицины. - М.: Медиасфера, 1998. -318с.
9. Graham, D. Y. Challenge model for Helicobacter pylori infection in human volunteers / D. Y. Graham, A. R. Opekun, M. S. Osata et al. // Gut. - 2004. - Vol. 53. - P. 1235-1243.
10. Березняк, Е.А. Генотипирование штаммов Helicobacter pylori, циркулирующих в Ростовской области / Е.А. Березняк, В.М. Сорокин, Е.К. Гончаров, Д.И. Симакова, Л.В. Ларионова, Г.Л. Карбышев, А.Н. Терентьев // Межд. мед.-сан. правила и реализ. глобал. стратегии борьбы с инф. бол. в гос-вах-учас. СНГ. Матер. VIII Межгос. науч.-практ. конф. - Саратов, 2007. - С. 176-177.