

(19) **KG** (11) **1246** (13) **C1** (46) **31.03.2010**(51) **G01N 33/68** (2010.01)

ГОСУДАРСТВЕННАЯ СЛУЖБА
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

к патенту Кыргызской Республики под ответственность заявителя (владельца)

(19) **KG** (11) **1246** (13) **C1** (46) **30.01.2010**

(21) 20080133.1

(22) 30.12.2008

(46) 31.03.2010, Бюл. №3

(76) Мамасаидов А.Т., Абдурашитова Д.И. (KG)

(56) Насонова В.А., Астапенко М.Г.. Клиническая ревматология. – М.: Медицина, 1984. С. 280

(54) Способ лабораторной диагностики ревматоидного артрита

(57) Изобретение относится к медицине, а именно к ревматологии. Задачей изобретения является разработка нового лабораторного метода диагностики на основе изучения антигенспецифического синтеза внутриклеточных иммуноглобулинов В-лимфоцитами периферической крови больных ревматоидным артритом (РА). *AlIgGIGBL* отражает изменение В-клеточного звена иммунитета, имеющего гораздо большее значение в иммунопатогенезе РА и отражает более ранние иммунологические изменения, что является основой более высокой чувствительности предлагаемого способа лабораторной диагностики РА. Определение *AlIgGIGBL* позволяет выявить специфический В-клеточный иммунный ответ на *AlIgG*. Последний играет ключевую роль в иммунопатологическом процессе при РА, характерной чертой которого является аутоиммунизация к собственному *AlIgG*, сопровождающаяся уже затем образованием РФ. Данный способ основан на применении высокочувствительного метода КЦФ, отличающегося высокой точностью, воспроизводимостью и использованием полностью автоматического режима. 1 н. п. ф-лы, 2 пр., 4 табл.

(21) 20080133.1

(22) 30.12.2008

(46) 31.03.2010, Bull. №3

(76) Mamasaidov A.T., Abdurashitova D.I. (KG)

(56) Nasonova V.A., Astapenko M.G. Clinical Rheumatology. - M.: Medicine, 1984. 280 pages

(54) Method of laboratory diagnostics of rheumatoid arthritis

(57) Invention relates to medicine, namely to rheumatology. Problem of the invention is to develop the new laboratory diagnostic method, based on the study of antigen-specific synthesis of intracellular immunoglobulin with B-lymphocytes (IGBL) in peripheral blood of rheumatoid arthritis (RA) sick patients. *AlIgGIGBL* reflects the change in B-cell component of immune system, which has much greater significance in the immunopathogenesis of RA and reflects the earlier immunological changes, what is the background of a higher sensitivity of the proposed method of laboratory RA diagnostics. Definition of *AlIgGIGBL* reveals the specific B-cell immune response to *AlIgG*. The last one plays a key role in the immunopathological process at the RA, characterized by autoimmunization to inherent (self) *AlIgG*, which is accompanied, after that, by the formation of the rheumatoid factors (RF). This approach is based on the

application of highly-sensitive method of quantitative cytofluorometry (QCF), characterized by high accuracy, reproducibility and use of fully-automated mode. 1 independ. claim, 2 examples, 4 tables.

Изобретение относится к медицине, а именно к ревматологии.

Способ лабораторной диагностики ревматоидного артрита (РА) может быть использован в качестве лабораторного метода диагностики ревматоидного артрита.

Известен способ лабораторной диагностики ревматоидного артрита, заключающийся в обнаружении в сыворотке крови ревматоидных факторов (РФ) – антител, реагирующих с Fc-фрагментом IgG (Насонова В.А., Астапенко М.Г. Клиническая ревматология. – М., Медицина, 1984. С. 86). Наличие РФ чаще определяется с помощью реакции Ваалера-Роузе, основанной на способности сыворотки больного РА вызывать агглютинацию сенсибилизированных бараньих эритроцитов. Реакция Ваалера-Роузе считается положительной с титра 1:32 (Сорока Н.Ф., Ягур В.Е. Ревматоидный артрит. – Минск: «Беларусь», 2000. С. 25). РФ определяется у 70-80 % больных РА (Насонова В. А., Астапенко М. Г. Клиническая ревматология. – М.: Медицина, 1989. С. 87) (1 способ).

Также известен такой способ лабораторной диагностики РА, как тест ревматоидной розетки, основанный на определении РФ на клеточном уровне. Этот тест заключается в выявлении лимфоцитами больного сенсибилизированных иммуноглобулином эритроцитов. При наличии РФ выявляется лимфоцит, окруженный розеткой из эритроцитов. Тест ревматоидной розетки оказывается положительным у 60-70 % больных РА (Насонова В.А., Астапенко М.Г. Клиническая ревматология. – М., Медицина, 1984. С. 280) (прототип).

Нами предложен способ лабораторной диагностики РА, основанный на определении синтеза внутриклеточных иммуноглобулинов В-лимфоцитами периферической крови (ИГВЛ) в присутствии aIgG.

Задачей изобретения является разработка нового лабораторного метода диагностики на основе изучения антигенспецифического синтеза внутриклеточных иммуноглобулинов В-лимфоцитами периферической крови больных ревматоидным артритом.

Способ иммунологической диагностики РА (ИГВЛ-способ) осуществляют следующим образом.

Лимфоциты выделяют из периферической венозной крови человека путем седиментации (осаждения) эритроцитов и тромбоцитов раствором верографин-фиколлы плотности 1,077 г/см³. С помощью пастеровской пипетки аккуратно настилают цельную стабилизированную антикоагулянтном кровь в объеме 4 мл на раствор верографин-фиколлы, избегая смешивания крови с раствором верографин-фиколлы. Затем центрифугируют при 1500 об/мин в течение 30 минут. При этом эритроциты и гранулоциты оседают на дно пробирки, а на границе раздела градиента и крови находятся мононуклеарные клетки. По всей площади сечения пробирки на границе раздела фаз отсасывают пастеровской пипеткой слой мононуклеаров (плотное облачко над смесью). Клетки, прилипшие к стенке пробирки, собирают кончиком пипетки. Лимфоциты переносят в чистую центрифужную пробирку. Выделенные клетки дважды отмывают от плазмы питательной средой № 199 центрифугированием при 1000 об/мин в течение 5 минут. Надосадок отбрасывают, а лимфоциты ресуспендируют 1,0 мл среды № 199. По 0,5 мл суспензии лимфоцитов вносят в две центрифужные пробирки (контроль и опыт) со средами следующего состава:

- Опыт – полная питательная среда с добавлением антигена. В качестве антигена использовали 0,1 мл aIgG в разведении 1:50.

- Контроль – полная питательная среда с добавлением 0,1 мл физиологического раствора. Обе пробы (контроль и опыт) немедленно помещают в термостат при t 37 °С с влажной камерой. Пробу инкубируют 2 часа в герметически закупоренных центрифужных пробирках.

После инкубации пробу центрифугируют при 1000 об/мин в течение 5 минут, надосадок отбрасывают, а лимфоциты ресуспендируют 2 каплями среды № 199. После чего получают монослой лимфоцитов по методу Красюка А.Н. и соавт. (Красюк А.Н., Панченко Н.А., Дедорович В.И. а.с. СССР 1174033. Способ определения клеточного иммунитета // Открытия и изобретения. – 1985. – Бюлл. № 31). При этом каплю густой свежewedенной суспензии лимфоцитов наносят на 2 чистых обезжиренных предметных стекла (контроль и опыт), инкубируют во влажной камере при комнатной температуре 3-5 мин, после чего неприлипшие клетки смывают питательной средой № 199. В результате на стекле оставалось четко сформированное пятно клеточного монослоя жизнеспособных клеток. Сразу после получения монослоя его фиксируют 70 % раствором этано-

ла в течение 10 минут. После фиксации препарат промывают физиологическим раствором, подсушивают и окрашивают люминесцирующей сывороткой против глобулинов человека, конъюгированной с флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ-сыворотка). После окрашивания и тщательного отмывания от несвязавшихся белков и ФИТЦ стекла подсушивают и проводят количественную цитофлуориметрию (КЦФ) оригинальным методом (Бененсон Е.В., Цай Е.Г. АС СССР №1328757 // Открытия и изобретения. – 1987. – Бюлл. 29) на базе микроскопа ЛЮАМИЗ, используя фотометрическую приставку ФМЭЛ-1.

Измерение иммуноглобулинсинтезирующей функции лимфоцитов проводят в области 530 нм с площади участка препарата.

Затем, сравнивая уровни флуоресценции (Ф) лимфоидных клеток в опыте и контроле ($\Phi_{\text{опыт}}$ и $\Phi_{\text{контроль}}$) выводили коэффициент аIgG-зависимого синтеза внутриклеточных иммуноглобулинов В-лимфоцитами по формуле: $\text{aIgGIGВЛ} = \Phi_{\text{опыт}} : \Phi_{\text{контроль}} \times 100$ усл. ед. и при значении коэффициента равном 200 усл. ед. и более диагностируют ревматоидный артрит.

Основные сравнительные исследования известных и заявляемого способов проводили у 30 здоровых лиц и 42 больных РА во время их стационарного лечения на фоне выраженных клинико-лабораторных признаков болезни.

Показатели способа представлены в таблице 1

Таблица 1

Показатели аIgGIGВЛ в обследованных группах

Обследованные группы больных	n	M±m в усл. ед.
Здоровые	30	149,7±8,76 (101,7-197,7)
Больные РА	42	214,1±9,08***

Примечания: *** – достоверно по сравнению со здоровыми ($p < 0,001$);
– в скобках доверительный интервал, вычисленный у здоровых по формуле $M \pm \sigma$ (объяснение в тексте).

Как видно из таблицы, уровень показателя аIgGIGВЛ у больных РА превышает ($T = 5,1$; $p < 0,001$) таковой у здоровых лиц. При этом доверительный интервал, вычисленный у здоровых лиц по формуле $M \pm \sigma$ (где σ – среднее квадратичное отклонение), равнялся от 101,7-197,7 усл. ед. Поэтому за положительный результат данного метода считали округленное значение аIgGIGВЛ, превышающее максимальное значение доверительного интервала у здоровых лиц, т.е. значение коэффициента аIgGIGВЛ равное 200 усл. ед. и более.

В таблице 2 представлены частота обнаружения положительных результатов известных и заявляемого способов у здоровых лиц и больных РА.

Таблица 2

Частота обнаружения положительных результатов известных и заявляемого способов у обследованных

Обследованные группы	n	Способ обследования					
		1 способ		2 способ прототип		Заявляемый	
		Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Здоровые	30	2	6,7	1	3,3	0	0
Больные РА	42	32	76,2	27	64,3	35	83,3

Из данных таблицы 3 видно, что у больных РА частота обнаружения положительного результата заявляемого способа равна 83,3 %, 1 способа – 76,2 % и прототипа – 64,3 %, т.е. РА

диагностируется 1 способом 76,2 %, прототипом – в 64,3 %, а заявляемым способом – в 83,3 % случаев. При этом у здоровых лиц частота обнаружения положительного результата заявляемого способа равна 0, что меньше 1 способа (6,6 %) и 2 способа (3,3 %).

В группе больных РА было проведено сравнение чувствительности и специфичности известных и заявляемого способов. Как известно, чувствительность метода – это частота положительных результатов данного способа у больных, а специфичность – частота отсутствия положительного результата у здоровых (Власов В. В. Эффективность диагностических исследований. – М, 1988. – С. 33-34). Результаты сравнения чувствительности и специфичности 3-х методов лабораторной диагностики РА отражены в табл.3.

Таблица 3

Чувствительность и специфичность известных и заявляемого способов

Метод определения	Чувствительность, %	Специфичность, %
1 способ	76,2	93,3
2 способ	64,3	96,7
Заявляемый способ	83,3	100

Из данных, представленных в таблице 3, видно, что наибольшей чувствительностью (83,3 %) и максимальной специфичностью (100%) обладает заявляемый способ.

Также для доказательства специфичности заявляемого способа лабораторной диагностики РА мы провели сравнительное исследование определения уровня aIgГИГВЛ у больных РА, остеоартрозом (ОА) и реактивным артритом (РеА).

Результаты отражены в таблице 4.

Таблица 4

Показатели aIgГИГВЛ у больных РА, ОА и РеА

Обследуемые группы больных	n	M±m, усл. ед.	Положит. результ.	
			Абс.	%
Больные РА	42	214,1±9,08	35	83,3
Больные ОА	26	170,6± 10,97***	5	19,2
Больные РеА	18	176,4±11,24**	4	22,2

Примечание: * – достоверно по сравнению с РА (*-p<0,05, **p<0,01, ***-p<0,001)

Как видно из данных таблицы 4, показатели aIgГИГВЛ у больных РА достоверно превышали уровни этого показателя у больных ОА и РеА. Кроме того, у больных с РА положительные результаты обнаружения aIgГИГВЛ были в 83,3 %, а у больных ОА и РеА – лишь в 19,2 % и в 22,2 % случаев соответственно.

Пример 1. Больная К., 35 лет. Диагноз: Ревматоидный артрит, полиартрит, медленно прогрессирующее течение, активность II степени, III рентгенологическая стадия, ФНС II.

Жалобы на боли и резкое ограничение движений в суставах кистей рук, их деформацию и незначительную припухлость, общую слабость, снижение аппетита, похудание.

Больная в течение 5 лет, свое заболевание связывает с вирусной инфекцией. Неоднократно по месту жительства получала противовоспалительную терапию, от которой отмечала кратковременное улучшение состояния. Последнее обострение отмечает после переохлаждения.

Объективно: пониженное питание, кожные покровы бледные, периферические лимфатические узлы не увеличены. Перкуторно над легкими – легочной звук, аускультативно- везикулярное дыхание, хрипов нет.

ЧД – 18 в минуту. Тоны сердца ясные, ритмичные. ЧСС – 80 уд. в мин. АД-110/70 мм.рт.ст. Живот мягкий, безболезненный. Печень не увеличена. Симптом поколачивания по XII ребру отрицательный с обеих сторон. Физиологические отправления в норме.

Костно-суставной аппарат: резкая деформация лучезапястных, пястно-фаланговых и межфаланговых суставов кистей рук, атрофия прилежащих мышц, подвывихи. Ульнарная девиация пальцев рук кисти, напоминающая форму «ласт моржа». Движения в пораженных суставах ограничены, самообслуживание затруднено. Пальпаторно-незначительная болезненность.

Общий анализ крови (ОАК): Нб – 90 г/л, Эр – $3,5 \times 10^{12}/л$, Цв.п. – 0,8, л. – $6 \times 10^9/л$, СОЭ – 35 мм/ч.

Биохимический анализ крови (БАК): общ. белок – 80 г/л, альбумины – 56 %, глобулины – 44 %: α_1 – 5 %, α_2 – 14 %, β – 3 %, γ – 22 %. Фибриноген – 5,5 г/л, серомукоид – 0,25 ед., сиаловые кислоты – 26 ед., гаптоглобин – 3 г/л, С-РБ ++.

Рентгенография суставов: сужение межфаланговых, пястно-фаланговых и лучезапястных суставных щелей, субхондральный остеопороз, значительно выраженные костные узур, подвывихи, костные кисты.

Для определения иммунологического состояния у данной больной были проведены определение РФ, тест ревматоидной розетки и aIgГИГВЛ. Результаты были следующими: РФ – 1:16 (результат отрицательный), не обнаружены лимфоциты, окруженные розеткой из эритроцитов (результат отрицательный), aIgГИГВЛ – 210,6 усл. ед. (результат положительный).

Этот пример показывает, что у больной с явными клиническими и рентгенологическими признаками РА данные определения РФ и теста ревматоидной розетки не подтвердили этот диагноз. Только определение уровня aIgГИГВЛ, оказавшись более чувствительным, смогло подтвердить наличие РА.

Пример 2. Больная Ш., 52 лет. Жалобы на боли в коленных суставах при ходьбе, поднятии или спускании по лестнице, а также при первых шагах после состояния покоя; хруст при активных движениях в коленных суставах и их припухлость, утреннюю скованность в пределах 30 минут.

Больной себя считает в течение 5 лет, свое заболевание связывает с резким увеличением массы тела после III родов. Неоднократно получала противовоспалительную терапию по месту жительства, занималась лечебной физкультурой, получала массаж, отмечала хороший эффект. Последнее ухудшение состояния связывает с коммерческими поездками и поднятиями тяжестей.

Объективно: повышенное питание, кожные покровы обычной окраски, периферические лимфатические узлы не увеличены. В легких – дыхание везикулярное, хрипов нет. Тоны сердца ритмичные, приглушенные. ЧСС – 90 ударов в минуту, АД – 150/90 мм рт.ст. Язык обложен белым налетом, с отпечатками зубов по краям. Живот мягкий, болезненный в области сигмовидной кишки. Стул нерегулярный. Симптом Пастернацкого отрицательный с обеих сторон, дизурии нет.

Костно-суставная система: вальгусная деформация коленных суставов, их деформация и припухлость, покраснение и гиперемия кожи над суставами. Пальпаторно коленные суставы болезненные, определяется легкая крепитация, ограничение объема активных и пассивных движений.

ОАК: Нб – 130 г/л, Эр. – $4 \times 10^{12}/л$, Цв.п. – 1, л. – $6 \times 10^9/л$, СОЭ – 20 мм/ч.

БАК: общ.белок – 80 г/л, альбумины – 60 %, глобулины – 40 %: α_1 – 4 %, α_2 – 8 %, β – 12 %, γ – 16 %. Фибриноген – 4 г/л, серомукоид – 0,22 ед., сиаловые кислоты – 250 усл.ед., гаптоглобин – 1,8 г/л, С-РБ-.

Рентгенография коленных суставов: кистовидная перестройка костной структуры, выраженный остеосклероз, сужение суставной щели.

Диагноз: Остеоартроз коленных суставов с реактивным синовитом, медленно прогрессирующий, II рентгенологическая стадия, ФНС I ст.

Также были проведены определения РФ, теста ревматоидной розетки и aIgГИГВЛ. Выявлены следующие результаты: РФ – 1:64 (реакция положительная), тест ревматоидной розетки – результат положительный, aIgГИГВЛ – 161,2 усл.ед. (результат отрицательный). Это говорит о высокой специфичности заявляемого способа в отличие от известных.

Таким образом, заявляемый способ отличается от 1 способа (определение РФ) следующими моментами:

1. Определение aIgГИГВЛ, позволяет выявить специфический В-клеточный иммунный ответ на aIgG. Последний играет ключевую роль в иммунопатологическом процессе при РА, ха-

рактерной чертой которого является аутоиммунизация к собственному aIgG, сопровождающаяся уже затем образованием РФ. То есть образование РФ (на определении которого основан 1 способ) является более поздним этапом в иммунопатогенезе РА. Так же известно, что РФ не является патогномичным признаком РА, так как РФ может встречаться у больных различными заболеваниями (чаще ревматическими), а также у здоровых лиц (Насонова В.А., Астапенко М.Г. Клиническая ревматология. – М., Медицина, 1989. С. 278). Следовательно, предлагаемый способ имеет большую специфичность в диагностике РА.

2. Определение aIgГИГВЛ – результат регистрации высокой активности В-лимфоцитов, сенсibilизированных к aIgG, т.е. отражает изменения клеточного антигензависимого клеточного иммунного ответа. В то же время РФ выявляет наличие высокого уровня сывороточных антител к aIgG, отражающего гуморальное звено патологических реакций при РА. Таким образом, aIgГИГВЛ отражает более ранние иммунологические изменения, что является основой более высокой чувствительности предлагаемого способа лабораторной диагностики РА.

3. Чувствительность предлагаемого способа выше на 7,1 %, а специфичность выше на 6,7 %.

Способ отличается от теста ревматоидной розетки тем, что:

1. Тест ревматоидной розетки отражает Т-клеточное звено иммунного ответа. В это же время aIgГИГВЛ отражает изменение В-клеточного звена иммунитета, имеющего гораздо большее значение в иммунопатогенезе РА. Это определяет более высокую специфичность заявляемого способа.

2. Тест ревматоидной розетки отличается невысокой точностью измерения, связанной с недостаточностью воспроизводимости и большим объемом ручных измерений. В то же время определение aIgГИГВЛ основано на применении высокочувствительного метода КЦФ, отличающегося высокой точностью, воспроизводимостью и использованием полностью автоматического режима. Это дает основание утверждать о более высокой чувствительности способа.

3. Чувствительность заявляемого способа выше на 19 %, а специфичность – на 3,3 %.

На основании вышеизложенного можно заключить, что заявляемый способ лабораторной диагностики РА обладает высокой чувствительностью и специфичностью. Он может быть применен, наряду с традиционными методами, в медицине, а именно в ревматологии, в частности, в диагностике РА.

Формула изобретения

Способ лабораторной диагностики ревматоидного артрита, включающий выделение лимфоцитов из исследуемой венозной крови, отличающийся тем, что лимфоциты инкубируют с антигеном – агрегированным иммуноглобулином G, вносят люминесцирующую сыворотку против иммуноглобулинов человека, конъюгированную с флюоресцеинизотиоцианатом, регистрируют уровень флюоресценции и рассчитывают коэффициент антигенспецифического синтеза иммуноглобулинов.

Выпущено отделом подготовки материалов