

3. Повышение сывороточной концентрации IgG1, IgG2 и IgG3 у пациентов с вирусными гепатитами может свидетельствовать о наличии хронического воспалительного процесса.

4. У пациентов с ингибиторной формой гемофилии и вирусными гепатитами отметили изменение состояния гуморального иммунитета.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баркаган З. С., Момот А. П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. М.: "Ньюдиамед"; 2001. 296 с.
2. Бракманн Х. Антитела к фактору VIII у пациентов с гемофилией А.

В кн.: Сборник статей по результатам XXIV конгресса Всемирной федерации гемофилии. Монреаль; 2000: 26–8.

3. Гарезина О. В. Особенности клинических проявлений и оптимизация терапии у больных с врожденными коагулопатиями, инфицированных вирусами гепатитов С и В: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. СПб.; 2004.
4. Журавлева И. А., Антропова С. В. Поражение гепатобилиарной системы у детей, больных гемофилией. В кн.: Сборник статей по результатам Международной итоговой конференции им. Н. И. Пирогова. М.; 2003: 55–6.
5. Яценко Е. А. Гемофилия у детей и ассоциированный с ней вирусный гепатит С: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М.; 2001.

Поступила 19.06.12

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013

УДК 616.348-002.44-074

А. Г. Харитонов¹, Э. А. Кондрашина¹, А. Ю. Барановский¹, С. В. Лапин², Т. В. Булгакова², А. А. Тотолян³

КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТОВ ТЕЧЕНИЯ ЯЗВЕННОГО КОЛИТА

¹ГБОУ ВПО СЗГМУ им. И. И. Мечникова Минздравсоцразвития России, ²ГБОУ ВПО Санкт-Петербургский государственный университет им. акад. И. П. Павлова, ³НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург

Цель исследования состояла в определении клинических и иммунологических предикторов неблагоприятного варианта течения язвенного колита (ЯК).

Нами были обследованы 89 больных с верифицированным на основании клинических, эндоскопических и морфологических данных ЯК. Из них 48 (53,9%) женщины и 41 (46,1%) мужчина. Возраст пациентов был от 18 до 79 лет, средний возраст составил 42,49±1,61 года. В зависимости от клинического течения ЯК пациенты были разделены на 2 группы: с благоприятным (1-я группа) и неблагоприятным течением болезни (2-я группа). Во 2-ю группу были включены пациенты с часто рецидивирующей формой заболевания, пациенты с гормонозависимой/гормонорезистентной формой и пациенты с тяжелой обострением ЯК на момент обследования. Группы были сопоставимы по полу и возрасту. У всех больных проводился сбор анамнеза, жалоб, общеклиническое обследование, выполнялись клинический и биохимический анализы крови. Тяжесть заболевания устанавливалась путем расчета индекса Trulove–Witts. Антинейтрофильные цитоплазматические антитела (АНЦА) классов IgG и IgA исследовались с помощью непрямой иммунофлуоресценции («Euroimmun AG», Германия).

Диагностический титр АНЦА в крови был выявлен у 58 (66,6%) из 87 обследованных больных, из них АНЦА класса IgG обнаружены у 42, а АНЦА класса IgA – у 27 пациентов. Сочетание АНЦА обоих классов наблюдалось у 11 исследуемых. В группе благоприятного варианта течения заболевания диагностический титр АНЦА был выявлен у 20 (51%) больных. В то же время в подгруппах часто рецидивирующей, гормонозависимой/гормонорезистентной и тяжелой форм эти антитела обнаруживались с частотой 76, 77 и 86,3% соответственно ($p < 0,05$).

Таким образом, представляется возможным применение АНЦА не только для диагностики ЯК, но также и для прогнозирования течения заболевания.

Ключевые слова: антинейтрофильные цитоплазматические антитела, язвенный колит, антитела

A.G. Kharitonov, E.A. Kondrashina, A.Yu. Baranovskiy, S.V. Lapin, T.V. Bulgakova, A.A. Totolijan
THE CLINICAL IMMUNOLOGIC CHARACTERISTICS OF DIFFERENT VARIANTS OF COURSE OF
ULCER COLITIS

The study was carried out to determine clinical and immunologic predictors of unfavorable variant of course of ulcer colitis. The sample included 89 patients (48 females - 53.9% and 41 males - 46.1%) with ulcer colitis established on the basis of clinical, endoscopic and morphologic data. The age of patients was 18-79 years and mean age - 42.49±1.61 years. The patients were divided on two groups depending on clinical course of disease: group 1 with favorable course and group 2 with unfavorable course. The group 2 included patients with frequently relapsing form of disease, patients with hormone-depended/hormone-resistant form of disease and patients with severe exacerbation of ulcer colitis at the moment of examination. The groups were compared by gender and age. All patients underwent medical history and complaints acquisition and total clinical examination. The clinical and biochemical analysis of blood was made too. The severity of disease was established using the calculation of Trulove–Witts indicator. The anti-neutrophil cytoplasmic antibodies of classes IgG and IgA were analyzed using indirect immunofluorescence (Euroimmun AG, Germany).

The diagnostic anti-neutrophil cytoplasmic antibodies titer was established in 58 out of 87 of examined patients (66.6%). The anti-neutrophil cytoplasmic antibodies of class IgG was revealed in 42 patients and anti-neutrophil cytoplasmic antibodies of class IgA in 27 patients. The combination of both classes of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies was established in 11 examined patients. In the group of favorable course of disease the diagnostic titer of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies was revealed in 20 patients (51%). At the same time, in the subgroups with frequently relapsing, hormone-depended/hormone-resistant and severe forms of disease these antibodies were revealed with rate of 76, 77 and 86.3% correspondingly. Hence, the anti-neutrophil cytoplasmic antibodies can be used both in diagnostic of ulcer colitis and in prognosis of course of disease.

Key words: anti-neutrophil cytoplasmic antibodies, ulcer colitis, antibody

Несмотря на успехи в диагностике и лечении язвенного колита (ЯК), это заболевание представляет собой серьезную медико-социальную проблему, поскольку нередко характеризуется неблагоприятным течением с развитием тяжелых осложнений [3] и высоким уровнем инвалидизации пациентов [20]. Термин «неблагоприятный вариант течения ЯК» не входит в большинство существующих классификаций заболевания. Тем не менее некоторые формы ЯК (часторецидивирующая, тяжелая, гормонозависимая и гормонорезистентная) рядом авторов рассматриваются как неблагоприятные, требующие более интенсивного лечения, в том числе хирургического, нередко приводящие к гибели пациента [1, 2].

Согласно определению Европейского консенсуса по диагностике и лечению ЯК, понятие «частый рецидив» включает в себя два рецидива заболевания и более в течение года [5]. Помимо часторецидивирующего, отдельно рассматривается непрерывное течение ЯК [3, 4], характеризующееся персистирующей активностью заболевания в течение 6 мес и более при условии адекватной терапии всеми вариантами базисных препаратов. Часторецидивирующее и непрерывное течение ЯК повышают риск оперативного вмешательства [13], а также увеличивают частоту госпитализаций пациентов [23].

Оценка некоторых клинических и лабораторных показателей ЯК с использованием ряда шкал путем расчета индексов (таких как Truelove–Witts, Meyo и др.) позволяет оценить тяжесть и активность заболевания, выделить категорию пациентов, нуждающихся в госпитализации. Известно, что тяжелый ЯК ассоциирован с повышенным риском оперативного вмешательства (колэктомии) и развития аденокарциномы толстой кишки [14].

Большой интерес для исследователей представляют формы ЯК с недостаточным ответом на препараты базисной терапии (в частности, стероидные гормоны) или его отсутствием. Согласно Европейскому Консенсусу по диагностике и лечению ЯК (2008), стероидозависимый ЯК определяется в случае невозможности уменьшения дозы системных стероидов ниже 10 мг/сут в течение 3 мес с момента начала терапии без активации заболевания, а также в случае возникновения рецидива ЯК в течение 3 мес после отмены стероидных гормонов. В том случае, если симптомы активности заболевания сохраняются, несмотря на применение преднизолона в дозе до 0,75 мг/кг в сутки в течение 4 нед, диагностируется стероидорезистентная форма заболевания.

В свете вышесказанного особую важность приобретает поиск предикторов формирования неблагоприятного течения ЯК, в том числе иммунологических. В настоящее время активно изучается роль антинейтрофильных цитоплазматических антител (АНЦА). Патологическая роль этих антител при ЯК не совсем ясна. J. Mallolas и соавт. [16] предположили, что АНЦА могут связываться с антигенами нейтрофилов, подвергшихся апоптозу. В процессе апоптоза «антигены-мишени» для этих антител, расположенные в цитоплазме нейтрофилов, транслоцируются на наружную поверхность мембраны клеток и могут стимулировать продукцию АНЦА.

Кроме того, было показано, что АНЦА могут активировать нейтрофилы и стимулировать продукцию свободных радикалов и выделение протеолитических ферментов, тем самым усиливая процессы воспаления [9].

Клиническое значение АНЦА также интенсивно исследуется. Была установлена положительная взаимосвязь между наличием АНЦА и степенью тяжести заболевания [15, 29]. Ряд исследователей установили ассоциацию диагностического титра АНЦА с потребностью в иммуносупрессорах (азатиоприне) [24] и более высоким риском колэктомии [28] у пациентов с ЯК.

В ходе данного исследования была предпринята попытка установить клинические и иммунологические особенности неблагоприятного варианта течения ЯК и уточнить прогностическую значимость исследуемых показателей.

Материалы и методы. Нами было обследовано 89 больных с верифицированным на основании клинических, эндоскопических и морфологических данных ЯК. Из них 48 (53,9%) женщин и 41 (46,1%) мужчина. Возраст пациентов был от 18 до 79 лет, средний возраст составил $42,49 \pm 1,61$ года.

В зависимости от варианта течения заболевания пациенты были распределены на две основные группы: с благоприятным (1-я группа) и неблагоприятным (2-я группа) вариантами течения ЯК. Во 2-ю группу были включены пациенты с часто рецидивирующей формой заболевания (подгруппа 2а – 26 человек), пациенты с гормонозависимой/гормонорезистентной формой (подгруппа 2б – 22 человека) и пациенты с тяжелой формой ЯК на момент обследования (подгруппа 2в – 27 человек). Группы были сопоставимы по полу и возрасту.

У всех больных проводился сбор анамнеза, жалоб, общеклиническое обследование, выполнялись клинический и биохимический анализы крови (в фазу активного заболевания и в ремиссию). Тяжесть заболевания устанавливалась путем расчета индекса Truelove–Witts [27].

У всех пациентов в сыворотке крови определялись АНЦА, представленные классами IgG и IgA методом реакции непрямой иммунофлюоресценции с использованием нейтрофилов донора, фиксированных этанолом, и нейтрофилов, фиксированных формалином, с помощью коммерческой тест-системы фирмы «Euroimmun AG», Германия. При этом в качестве диагностического титра АНЦА рассматривалось обнаружение аутоантител при разведении сыворотки 1:40 и более.

Статистическая обработка цифровых результатов осуществлялась с помощью методов параметрической и непараметрической статистики с использованием пакета программ Statistica for Windows (версия 5.5). Проверка на нормальность осуществлялась с помощью теста Колмогорова–Смирнова, после чего нормально распределенные данные попарно анализировались с помощью Т-теста. Для анализа групп данных, не удовлетворяющих нормальному распределению, а также количественных данных, применялись критерии Манна–Уитни, Вальда и медианного χ^2 . Выявленные различия рассматривались как достоверные при значении критерия $p < 0,05$. В случае достоверных различий между сравниваемыми признаками в исследуемых группах также использовали коэффициент соотношения шансов (odds ratio – OR).

Результаты и обсуждение. Сравнительная оценка анамнестических данных не выявила различий между группами благоприятного и неблагоприятного вариантов течения ЯК по возрасту установления диагноза и длительности анамнеза заболевания, статусу курения и аппендэктомии.

Для корреспонденции:

Харитонов Андрей Геннадьевич, ассистент каф. гастроэнтерологии и диетологии

Адрес: 191015, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, 41

Телефон: (812)235-10-93

E-mail: scipion@pochta.ru

Таблица 1

Характеристика основных клинических симптомов у пациентов с ЯК

Признак	Благоприятный вариант ЯК	Неблагоприятный вариант ЯК			p
		часторецидивирующая форма	гормонозависимая/гормонорезистентная форма	тяжелая форма	
	1	2а	2б	2в	
Частота стула (в сутки)	4,17±0,78	6,69±0,85	8,0±0,8	9,73±0,74	< 0,01 ¹ < 0,001 ^{2,3}
Масса тела:					
норма	31 (77,5)	16 (61,5)	8 (36,4)	8 (36,4)	
снижена	9 (22,5)	10 (38,5)	14 (63,6)	14 (63,6)	< 0,05 ^{2,3}
Лихорадка:					
отсутствует	32 (80)	13 (50)	10(45,5)	3(13,6)	< 0,05 ^{1,2,3,4}
выше 37°С	6(15)	11 (42,3)	8 (36,4)	13 (59)	< 0,05 ^{2,3,4,5}
выше 38°С 2 (5)	2 (7,7)	4 (18,1)	6 (27,4)		
Количество крови в стуле:					
отсутствует	3 (7,5)	3(11,5)	0 (0)	0 (0)	<0,05 ¹
небольшое	17 (42,5)	8 (30,8)	5 (22,7)	1 (4,5)	< 0,001 ^{2,3}
умеренное	18 (45)	6 (23)	6 (27,3)	5 (22,7)	
значительное	2 (5)	9 (24,6)	11 (50)	16 (72,8)	

Примечание. В скобках – проценты, достоверные различия между группами: ¹ – 1-й и 2а; ² – 1-й и 2б; ³ – 1-й и 2в; ⁴ – 2а и 2б; ⁵ – 2а и 2в.

Результаты анализа клинических данных, полученные при сопоставлении исследуемых групп и подгрупп, приведены в табл. 1.

В группе неблагоприятного варианта течения ЯК достоверно чаще встречались симптомы, отражающие активность заболевания (учащение стула, количество крови в стуле, лихорадка) по сравнению с группой благоприятного варианта течения заболевания. Кроме того, у пациентов с тяжелой и гормонозависимой/гормонорезистентной формой ЯК чаще, чем в подгруппе часто рецидивирующей формы и группе благоприятного варианта течения, отмечалось снижение массы тела.

При оценке некоторых показателей клинического и биохимического анализов крови, отражающих активность

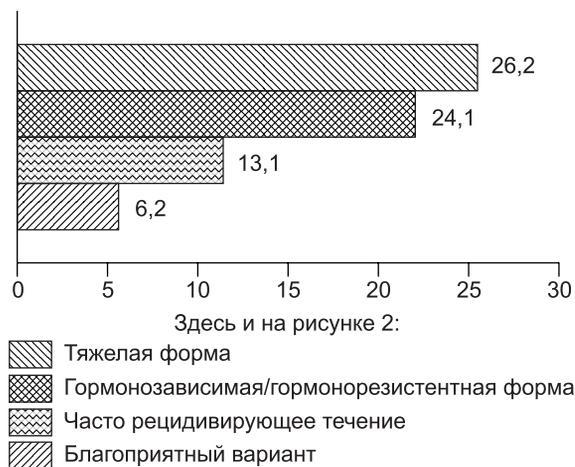


Рис. 1. Среднее значение СРБ (в мг/л) в группах пациентов с различными вариантами течения язвенного колита.

и тяжесть воспалительного процесса, нами было выявлено статистически значимое увеличение содержания лейкоцитов крови в фазу обострения у пациентов с часто рецидивирующей формой заболевания по сравнению с благоприятным вариантом течения ЯК ($8,62 \pm 0,5 \cdot 10^9/\text{л}$ против $27,2 \pm 0,35 \cdot 10^9/\text{л}$; $p < 0,05$). Еще более выраженный лейкоцитоз отмечался в подгруппах тяжелой и гормонозависимой/гормонорезистентной формы ($11,34 \pm 0,63 \cdot 10^9/\text{л}$ и $10,22 \pm 0,79 \cdot 10^9/\text{л}$ соответственно; $p < 0,001$).

Также было обнаружено различие в уровне СОЭ между группами больных всеми формами неблагоприятного варианта течения ЯК и группой благоприятного варианта течения. У больных с часто рецидивирующей формой он составил $20,64 \pm 2,79$ мм/ч, в подгруппах тяжелой и гормонозависимой/гормонорезистентной формой – $22,81 \pm 3,18$ и $24,4 \pm 2,74$ мм/ч соответственно и был достоверно выше, чем у больных с благоприятным вариантом течения заболевания.

Повышение СРБ было характерно для пациентов обеих исследуемых групп. Тем не менее нам

удалось выявить более высокие значения этого маркера системного воспаления у больных со всеми формами неблагоприятного варианта ЯК по сравнению с группой благоприятного варианта течения ($p < 0,01$ для часто рецидивирующей формы; $p < 0,001$ для тяжелой и гормонозависимой/гормонорезистентной формы) (рис. 1).

Диагностически значимый титр АНЦА в крови был выявлен у 58 (66,6%) из 87 обследованных больных, из них АНЦА IgG обнаружены у 42, а АНЦА IgA – у 27 пациентов. Сочетание АНЦА IgG + IgA наблюдалось у 11 исследуемых.

Нами была проведена оценка частоты обнаружения АНЦА среди пациентов с различными вариантами течения ЯК. В группе благоприятного варианта течения заболевания диагностический титр АНЦА был выявлен у 20 (51%) больных. В то же время в подгруппах часторецидивирующей, гормонозависимой/гормонорезистентной и тяжелой форм эти антитела обнаруживались с частотой 76, 77 и 86,3% соответственно ($p < 0,05$) (рис. 2).

Был проведен комплексный анализ клинических,

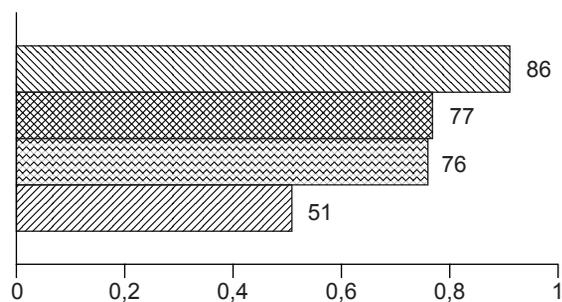


Рис. 2. Частота встречаемости АНЦА (в %) в группах пациентов с различными вариантами течения ЯК.

Таблица 2

Ранжированное отношение факторов рисков развития неблагоприятного варианта течения ЯК

Фактор риска	OR
Значительная примесь крови в кале	16,8
Длительность анамнеза язвенного колита 6 лет и более	13,2
Плохое и очень плохое общее самочувствие	9,4
Температура тела выше 37,2°C	6,3
Боль в животе (умеренная и выраженная)	5,1
Уровень лейкоцитов крови выше 8,0 тыс/мкл в фазу обострения	4,3
Диагностический титр пАНЦА в крови	3,6
Снижение массы тела за последние 6 мес	3,0
Распространенный (тотальный) колит	2,3

лабораторных и иммунологических показателей для выявления взаимосвязи с вариантом течения ЯК. Для каждого исследованного нами признака рассчитывался относительный риск развития неблагоприятного варианта течения заболевания (OR). Наиболее значимые результаты мы привели в табл. 2.

Как видно из таблицы, помимо анамнестических и клинических показателей, отражающих активность и тяжесть ЯК, некоторые лабораторные и иммунологические маркеры также увеличивают риск развития неблагоприятных вариантов течения заболевания. Кроме того, имеет значение и распространенность воспалительного процесса в слизистой оболочке толстой кишки.

Существующие в настоящее время данные о роли клинико-анамнестических, лабораторных и иммунологических факторов в развитии неблагоприятных форм ЯК представляются неполными, зачастую противоречивыми.

Известно, что такие факторы, как курение и аппендэктомия, оказывают влияние на течение ЯК. Активное курение снижает риск развития заболевания, в то время как пациенты с ЯК, бросившие курить, имеют 70 % риск развития распространенного колита и резистентных форм болезни [10]. Существуют данные, что у курящих пациентов рецидивы заболевания наблюдаются реже, чем у некурящих [12]. В нашей работе мы не нашли достоверных различий между фактором курения в анамнезе и вариантом течения заболевания. Похожие данные получены F. Heide и соавт. [11], которые не выявили влияния факта курения на частоту рецидивов ЯК и формирование тяжелых и резистентных форм. Такие расхождения в результатах, вероятно, связаны с неоднородностью и малочисленностью исследуемых групп. Возможно, определенную роль играет различная степень метаболизма никотина, предопределенная генетически [5].

Данные о протективном эффекте аппендэктомии в отношении развития неблагоприятных форм ЯК также неоднозначны. По мнению M. Naganuma и соавт. [17], предшествующая аппендэктомия снижает частоту рецидивов ЯК. В работе J. Cosnes и соавт. [8] было показано, что у пациентов, перенесших аппендэктомию, реже отмечались тяжелые формы заболевания и потребность в колэктомии также была меньше. В то же время некоторым авторам не удалось выявить влияния аппендэктомии в анамнезе на течение ЯК [22]. Нам также не удалось найти различия в частоте аппендэктомии в анамнезе у больных с благоприятным и неблагоприятным вариантами заболевания.

Оценка клинических проявлений ЯК показала, что заболевание у пациентов с неблагоприятным вариантом течения имеет более агрессивный характер, что отражается в первую очередь в более выраженной клинической симптоматике (количество крови в кале и его частота, интенсивность болевого абдоминального синдрома, повышение температуры тела, снижение массы тела). Изменения лабораторных показателей, такие как более низкий уровень гемоглобина, гематокрита и более высокий уровень лейкоцитов, СОЭ и СРБ в группе неблагоприятного варианта течения ЯК, свидетельствуют о большей активности системного воспаления у этих больных. Необходимо отметить, что большинство из рассмотренных нами клинических и лабораторных признаков традиционно используются в расчетах индексов активности и тяжести ЯК [26, 27]. Кроме того, согласно данной литературе, высокий уровень СРБ (выше 45 мг/л), СОЭ, лейкоцитоз и низкий уровень гемоглобина при тяжелом ЯК рассматриваются как предикторы потребности в колэктомии в текущую госпитализацию [6, 7]. Вероятно, эти маркеры целесообразно использовать не только для оценки активности и тяжести заболевания, а также в качестве факторов риска развития неблагоприятного варианта течения ЯК.

При иммунологическом исследовании, заключавшемся в определении уровня АНЦА в крови, мы установили достаточно высокую частоту встречаемости этого вида антител у пациентов с ЯК, которая составила 66,6%. Эти данные согласуются с результатами исследований ряда авторов, в которых частота выявления АНЦА составила 50–70% [18, 19].

По нашим данным, у больных со всеми формами неблагоприятного варианта течения заболевания (часто рецидивирующей, гормонозависимой/гормонорезистентной и тяжелой) чаще выявлялся диагностический титр АНЦА. Похожие результаты были установлены некоторыми исследователями. Была обнаружена ассоциация положительного титра АНЦА с более частым рецидивированием ЯК [28]. Установлена связь между наличием АНЦА и развитием резистентного к стероидным гормонам левостороннего ЯК [21]. Вероятно, наличие этих антител ассоциировано с более высоким интестинальным и системным воспалением при ЯК. Их выявление увеличивает риск развития неблагоприятного варианта течения заболевания в 3,61 раза. Нам представляется возможным применение АНЦА не только для диагностики ЯК, но также и для прогнозирования течения заболевания.

Выводы. Таким образом, в настоящее время термин «неблагоприятный вариант течения ЯК» остается дискутабельным. Не подлежит сомнению, что ряд форм заболевания протекает более агрессивно. Поэтому они требуют ранней диагностики с целью разработки адекватной стратегии лечения и реабилитации. Для выявления факторов риска формирования неблагоприятного варианта течения ЯК необходима комплексная оценка клинических, лабораторных и иммунологических данных, как связанных с активностью заболевания, так и не зависящих от нее.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барановский А. Ю., Пак С. Ф. // Бюл. Санкт-Петербург. ассоц. врачей-терапевтов. – 2005. – Т. 2, № 5. – С. 3–30.
2. Белоусова Е. А. Язвенный колит и болезнь Крона. – М.: Триада, 2002.
3. Румянцев В. Г. Язвенный колит. – М.: МИА, 2009.
4. Халиф И. Л., Лоранская И. Д. Воспалительные заболевания кишечника (неспецифический язвенный колит и болезнь Крона). Клиника, диагностика и лечение. – М.: Миклош, 2004.

5. Altarescu G., Rachmilewitz D., Zevin S. // *Isr. Med. Assoc. J.* – 2011. – Vol. 13, N 2. – P. 87–90.
6. Ananthkrishnan A. N., McGinley E. L., Binion D. G., Saeian K. // *Inflamm. Bowel. Dis.* – 2010. – Vol. 16, N 9. – P. 1532–1540.
7. Benazzato L., D'Inca R., Grigoletto F. et al. // *Dig. Liver Dis.* – 2004. – Vol. 36, N 7. – P. 461–466.
8. Cosnes J., Carbonnel F., Beaugerie L. et al. // *Gut.* – 2002. – Vol. 51, N 6. – P. 803–807.
9. Falk R. J., Terrell R., Charles L. A., Jennette J. C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1990. – Vol. 87. – P. 4115–4119.
10. Fraga X. F., Vergara M., Medina C. et al. // *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* – 1997. – Vol. 9, N 7. – P. 683–687.
11. Heide F., Wassenaar M., Linde K. et al. // *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* – 2011. – Vol. 23, N 3. – P. 255–261.
12. Hoie O., Wolters F., Riis L. et al. // *Am. J. Gastroenterol.* – 2007. – Vol. 102, N 8. – P. 1692–1701.
13. Kaminaga N., Satake Y. // *Nippon, Rinsho.* – 1999. – Vol. 57, N 11. – P. 2437–2442.
14. Karoui S., Serghini M., Chaieb M. et al. // *Tunis Med.* – 2009. – Vol. 87, N 2. – P. 115–119.
15. Liu X., Yu T., Zhao M. et al. // *Zhonghua Nei Ke Za Zhi.* – 1999. – Vol. 38, N 7. – P. 451–454.
16. Mallolas J., Esteve M., Rius E. et al. // *Gut.* – 2000. – Vol. 47, N 1. – P. 74–78.
17. Naganuma M., Iizuka B., Torii A. et al. // *Am. J. Gastroenterol.* – 2001. – Vol. 96, N 4. – P. 1123–1126.
18. Osangthamont C., Manatsathit S., Pongprasopchai S. et al. // *J. Gastroenterol. Hepatol.* – 2001. – Vol. 16, N 8. – P. 866–871.
19. Preda C. M., Vermeire S., Rutgeerts P. et al. // *Rom. J. Gastroenterol.* – 2005. – Vol. 14, N 4. – P. 357–360.
20. Reinisch W., Sandborn W. J., Bala M. et al. // *Inflamm. Bowel Dis.* – 2007. – Vol. 13, N 9. – P. 1135–1140.
21. Sandborn W. J. // *Inflamm. Bowel Dis.* – 2005. – Vol. 11, N 8. – P. 707–712.
22. Selby W. S., Griffin S., Abraham N., Solomon M. J. // *Am. J. Gastroenterol.* – 2002. – Vol. 97, N 11. – P. 2834–2838.
23. Sicilia B., Vicente R., Arroyo M. T. et al. // *Gastroenterol. Hepatol.* – 2005. – Vol. 28, N 2. – P. 55–59.
24. Solberg I. C., Lygren I., Cvancarova M. et al. // *Inflamm. Bowel Dis.* – 2009. – Vol. 15, N 3. – P. 406–414.
25. Stange E. F., Travis S. P. L., Vermeire S., Reinisch W. // *J. Crohn's Colitis.* – 2008. – Vol. 2, N 1. – P. 1–23.
26. Sutherland L. R., Martin F., Greer S. et al. // *Gastroenterology.* – 1987. – Vol. 92, N 6. – P. 1894–1898.
27. Truelove S. C., Witts L. J. // *Br. Med. J.* – 1959. – Vol. 14, N 5119. – P. 387–394.
28. Vergara T., Cofre P., Cifuentes S. et al. // *Rev. Med. Chil.* – 2006. – Vol. 134, N 8. – P. 960–964.
29. Zhou F., Xia B., Wang F. et al. // *Clin. Chim. Acta.* – 2010. – Vol. 411, N 19–20. – P. 1461–1465.

Поступила 16.03.12

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013

УДК 616.932-078.33

Л. П. Алексеева, Г. А. Козлова, О. В. Маркина, О. Ф. Кретенчук, М. Э. Яговкин, О. С. Бурша

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ ПЕРОКСИДАЗНЫХ КОНЬЮГАТОВ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ СЕРОГРУПП О1, О139 В РЕАКЦИИ ДОТ-ИММУНОАНАЛИЗА

ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора

Источником моноклональных антител (МКА) служила культуральная жидкость (КЖ) гибридом-продуцентов, депонированных в специализированной коллекции клеточных культур позвоночных (Санкт-Петербург) под номерами РККК(П) 386Д и РККК(П) 674Д. Специфические иммуноглобулины (Ig) из КЖ концентрировали путем осаждения их насыщенным раствором сульфата аммония. Схема получения МКА-пероксидазных конъюгатов включала активацию пероксидазы (ПХ), конъюгацию активированной ПХ с Ig, удаление несвязавшихся белков, хранение и контроль. Сохранность активности конъюгатов обеспечивали с помощью БСА (10%) или глицерина (50%), причем использование последнего для этих целей предпочтительнее. Испытание МКА-О1 и МКА-О139 пероксидазных конъюгатов на наборе штаммов холерных вибрионов О1 и О139 показало их строгую специфичность, так как они взаимодействовали только с соответствующими им серогруппами при отсутствии перекрестных реакций с представителями гетерологичных микроорганизмов. Постановка прямого дот-иммуноанализа осуществляется в течение 1,5 ч, чувствительность его находится в пределах 10⁵–10⁶. Применение диагностических моноклональных пероксидазных конъюгатов О1, О139 в лабораторной практике будет способствовать повышению специфичности серологического анализа на холеру и сокращению сроков его выполнения.

Ключевые слова: моноклональные антитела, пероксидазные конъюгаты, дот-иммуноанализ, холерный вибрион, диагностика

L.P. Alekseyeva, G.A. Kozlova, O.S. Bursha, O.V. Markina, O.F. Kretentchuk, M.E. Yagovkin

THE APPLICATION OF MONOCLONAL PEROXIDASE CONJUGATES TO IDENTIFY COMMA BACILLUS OF SERUM GROUPS O1 AND O139 IN THE REACTION OF DOT-IMMUNE ANALYSIS.

The source of monoclonal antibodies was chosen the cultural fluid of hybridoma-producers deposited in the specialized collection of cell cultures of vertebrates (St. Petersburg) with numbers RKKK(P) 386D and RKKK(P) 674D. The specific immunoglobulin (Ig) from cultural fluid was concentrated by precipitation with saturated solution of ammonium sulfate. The scheme of obtaining monoclonal antibodies included activation of peroxidase, conjugation of activated peroxidase with Ig, removal of unbound proteins, storage and control. The preservation of activity of conjugates was supported with BSA (10%) or glycerin (50%). The last one is preferable to be applied for this purpose. The test of monoclonal antibody-01 and monoclonal antibody-0139 of peroxidase conjugates with kit of strains of comma bacillus O1 and O139 demonstrated their strict specificity because they interacted only with corresponding serum groups under absence of crossed reactions with representatives of heterologic microorganisms. The direct dot-immune analysis is carried out during 1.5 hour and its sensitivity is within the limits 10⁵-10⁶. The application of diagnostic monoclonal peroxidase conjugates O1, O139 in laboratory practice can promote the increase of specificity of serologic analysis of cholera and saving time-frame of its application.

Key words: monoclonal antibody, peroxidase conjugate, dot-immune analysis, comma bacillus, diagnostic