

Тезисы X Российской научно-практической конференции с международным участием «Вирусные гепатиты — эпидемиология, диагностика, лечение и профилактика»

1. Особенности экспрессии хемокиновых рецепторов CXCR3, CCR5 и CCR6 на Т-лимфоцитах периферической крови больных хроническим гепатитом С

Н.А. Арсентьева¹, Д.С. Елезов¹, И.В. Кудрявцев², В.В. Басина³

¹ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург;

²ГБУ НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург;

³ГБОУ ВПО Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет МЗ РФ

Введение. При хроническом гепатите С (ХГС) печень усиленно продуцирует провоспалительные хемокины, вызывая миграцию лейкоцитов, несущих соответствующие хемокиновые рецепторы, с периферии в печеночную паренхиму. Естественное избавление от вируса гепатита С (ВГС) связывают с адекватным, интенсивным и специфическим Т-клеточным ответом против антигенов ВГС. Определение уровня экспрессии хемокиновых рецепторов CXCR3, CCR5 и CCR6 на популяциях Т-лимфоцитов может помочь в понимании иммунопатогенеза ХГС.

Цель. Количественное определение CXCR3⁺, CCR5⁺ и CCR6⁺ Т-хелперов (Th) и цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL) у больных ХГС.

Материалы и методы. Материалом исследования служила венозная кровь больных ХГС (n=27) и условно-здоровых доноров (n=32). Содержание Т-лимфоцитов, несущих хемокиновые рецепторы CXCR3, CCR5 и CCR6 определяли методом проточной цитофлюориметрии с использованием различных комбинаций моноклональных антител: для оценки Th (CD4/CXCR3/CCR5/CCR6) и CTL (CD3/CD8/CXCR3/CCR5/CCR6). Статистический анализ проводили с применением пакета прикладных программ GraphPad Prizm 6. Для сравнения групп использовали непараметрический критерий Манна-Уитни, различия считали достоверными при уровне значимости p<0,05.

Результаты. В крови больных ХГС значительно увеличивалось количество Th, несущих хемокиновый рецептор CXCR3 (CXCR3+CD3+CD4+CD8+) по сравнению с условно здоровыми донорами, медиана для больных ХГС составила 43,3%, для контрольной группы — 35,98% (p=0,004). Содержание CXCR3-положительных CTL (CXCR3+CD3+CD8+CD4+) достоверно снижалось у пациентов с ХГС, медиана для больных ХГС составила 61,19%, для контрольной группы — 70,44% (p=0,007). Исследование содержания Th и CTL, несущих рецепторы CCR5 и CCR6, не выявило различий между опытной и контрольной группами. Количественное содержание Th и CTL не отличалось между группой больных ХГС и условно здоровых доноров.

Выводы. Увеличение количества CXCR3-положительных клеток среди CD4⁺ Т-лимфоцитов, может косвенно свидетельствовать об активации этих клеток в периферической крови больных ХГС. Среди CD8⁺ Т-лимфоцитов снижение содержания клеток, несущих хемокиновый рецептор CXCR3, вероятно, может отражать функциональную анергию цитотоксических Т-клеток в периферической крови пациентов с ХГС.

2. Результаты программы внешней оценки качества исследований ЗАО «Вектор-Бест»

Л.В. Безуглова, С.В. Рак, И.В. Шумаков, О.А. Ярославцева, И.А. Костюкова,
О.Н. Ястребова, И.Г. Нетесова

ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск

В ЗАО «Вектор-Бест» более 10 лет существует Программа «Внешней оценки качества» (ПВОК) результатов выявления серологических маркеров ряда инфекций методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Целью ПВОК является оказание помощи клинико-диагностическим лабораториям в обеспечении качества выполняемых исследований. В состав ПВОК входят: обращение к участнику Программы;

бланки протоколов для внесения данных; схема проведения ПВОК с учетом задач внутрилабораторного контроля качества (ВКК); тестовое задание; шифрованная панель сывороток крови, содержащих и не содержащих серологический маркер; контрольный набор реагентов, позволяющий сравнить полученные результаты разных лабораторий-участниц.

В 2011–2012 гг. по данным протокола №1 (контрольный набор) были получены следующие результаты: правильно выявили образцы панели сывороток ПВОК 44/56 (79%) ЛПУ в разделе HBsAg, 93/114 (82%) — в разделе анти-ВГС и 31/33 (94%) — в разделе анти-ВИЧ-1,2, р24. От 6% до 21% лабораторий-участниц ПВОК совершали ошибки. Ряд ошибок (многократное использование одноразовых емкостей (ванночек) и одноразовых наконечников для реагентов набора) были выявлены ранее (Нетесова и др., 2005).

На основе полученных данных был разработан алгоритм проведения ПВОК, позволяющий выявить ошибки при проведении анализа, а также решить ряд вопросов ВКК в лаборатории. При анализе результатов из 134 лабораторий-участниц 10 цикла ПВОК-HBsAg (2008-2010 гг.) из 5 регионов России в 77/134 лабораториях (57%) были выявлены ошибки при проведении ИФА. Мы проанализировали 292 протокола с ошибками, вычислив число ошибок на протокол. Число ошибок/протокол варьировало от 0,6 до 0,9 при использовании контрольного набора (невскрытый), работе другого оператора, использовании другой процедуры анализа, дистиллированной воды из аптеки и другой отмывки (ручная). При работе на вскрытом наборе и использовании наконечников многократно было выявлено 1,2 и 1,3 ошибок/протокол соответственно. При проведении подтверждающего теста было установлено 1,5 ошибок на протокол. Наибольшее число ошибок/протокол - 2,3 выявлено при использовании ванночек многократно.

Таким образом, наиболее негативное влияние на результаты ИФА оказало многократное использование ванночек. Другие ошибки лабораторий были связаны с неверным вычислением ОП крит (16% лабораторий), каллиграфическими ошибками при внесении полученных результатов (10% лабораторий). Несоответствие между выданными и полученными результатами отмечено в протоколах из 13% лабораторий, тест не валиден по данным из 5% лабораторий.

С 2008 г. ПВОК предлагается в виде Заочного практикума (ЗП) «Источники ошибок при ИФА HBsAg» в рамках Федеральной системы внешней оценки качества клинических лабораторных исследований (ФСВОК). По результатам исследования лабораторией контрольных панелей сывороток крови с использованием собственного и присланного набора и предоставленным ею сведениям об используемой методике определяются возможные причины ошибок лаборатории в выполнении ИФА. В 2008 г. в ЗП ФСВОК (HBsAg) приняло участие 34 лаборатории, только 6(18%) из них справились с заданием полностью по всем протоколам. В 2009 г. в ЗП ФСВОК приняло участие 27 лабораторий, из них 17(63%) справились с заданием полностью, что достоверно выше ($p=0,014$) в сравнении с предыдущим годом. 10 из этих 17 лабораторий участвовали повторно, причем ранее во всех 10 лабораториях были ошибки при выявлении образцов контрольной панели сывороток крови.

Заключение. Таким образом, отмечен положительный эффект участия в ЗП ФСВОК. Участие лабораторий в ПВОК и ЗП ФСВОК позволяет оценить работу лаборатории в целом, определить причины получения неправильных результатов, устранить их, обучить участников алгоритму поиска ошибок.

3. Разные сценарии проведения внутрилабораторного контроля качества неколичественных методов иммуноферментного анализа

Л.В. Безуглова, О.А. Ярославцева, И.Г. Нетесова

ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск

Внутрилабораторный контроль качества (ВКК) — система процедур с применением контрольных материалов или на основе статистического анализа результатов исследований проб пациентов для оценки характеристик аналитического качества используемых методик исследования с целью удовлетворения требований по качеству и повседневного мониторинга стабильности результатов (ГОСТ Р 531333.3-2008 Контроль качества клинических лабораторных исследований). Появление контрольных материалов, содержащих серологические маркеры инфекций ВГВ (ВЛК-HBsAg), ВГС (ВЛК-анти-ВГС), ВИЧ (ВЛК-анти-ВИЧ-1), сифилиса (ВЛК-антипаллидум), значения оптической плотности (ОП) которых после исследования в иммуноферментном анализе (ИФА) находятся в области прямой пропорциональной зависимости ОП результатов от концентрации маркера, привело к внедрению ВКК