УДК 616.327.2-006.6-079:616-097.1/.3

ЗНАЧИМОСТЬ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНОГО И ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ТЕСТОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ РАКА НОСОГЛОТКИ

[1]Сенюта Н.Б., [2]Трубченинова Л.П., [2]Трефильева Н.Ф., [1]Максимович Д.М., [1]Душенькина Т.Е., [1]Гурцевич В.Э.

[1]ФГБУ Российский Онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина МЗ России, Казань, e-mail: nat.senyuta@yandex.ru;
[2]ФГБУ ГНЦ институт иммунологии ФМБА России, Москва

Проведен сравнительный анализ способности двух серологических тестов, непрямой реакции иммунофлуоресценции (РИФ) и иммуноферментного анализа (ИФА) диагностировать неороговевающий гистологический вариант рака носоглотки (нРНГ), ассоциированный с вирусом Эпштейна-Барр (ВЭБ). В исследовании были использованы образцы плазмы крови от 37 больных с установленным диагнозом нРНГ и 40 больных другими опухолями головы и шеи (ДОГШ), возникновение которых не ассоциировано с эти вирусом. Образцы плазмы от больных ДОГШ использовали в качестве контроля для установления диагностической специфичности анализируемых тестов. Исследования показали, что в отличие от IgG антител наибольшей диагностической ценностью для нРНГ обладают IgA антитела к ВКА и РА ВЭБ. При использовании антител указанной специфичности анализируемые тесты продемонстрировали примерно одинаковую специфичность (95.0% и 97.5% соответственно), но более высокая чувствительность обнаружена у РИФ (91.9% против 73.0% соответственно). Отмечено также, что показатели ИФА не коррелировали с РИФ: ИФА значения часто были низкими (1.6) при высоких титрах антител (1:160) и высокими (8.1) при низких титрах (1:40) (не показано). В целом, полученные данные свидетельствуют о том, что оба теста при использовании в качестве маркеров IgA антител к ВКА или РА вируса обладают высокой чувствительностью и специфичностью для диагностики нРНГ и могут быть использованы для обнаружения этой опухоли в случае выявленного первичного очага.

Ключевые слова: вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ), реакция иммунофлуоресценции (РИФ), иммуноферментный анализ (ИФА), рак носоглотки, другие опухоли головы и шеи, диагностическая значимость маркеров ВЭБ

SIGNIFICANCE OF IMMUNOFLUORESCENT AND ELISA ASSAYS IN DIAGNOSTICS OF NASOPHARYNGEAL CARCINOMA

[1]Senyuta N.B., [2]Trubcheninova L.P., [2]Trefilieva N.F., [1]Maksimovich D.M., [1]Dushenkina T.E., [1]Gurtsevitch V.E.

[1]N.N. Blokhin Cancer Research Center, Ministry of Health, Russian Federation, Kazan, e-mail: nat.senyuta@yandex.ru;
[2]NRC Institute of Immunology, FMBA, Russian Federation, Moscow

Comparative analysis of the diagnostic value of two serological tests, indirect immunofluorescent assay (IFA) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), for the identification of associated with the Epstein-Barr virus (EBV) not keratinizing histological variant of nasopharyngeal carcinoma (nNPC) has been carried out. Blood plasma samples from 37 patients with an established diagnosis of nNPC and 40 patients with other the head and neck tumors (OHNT), the occurrence of which is not associated with the virus have been involved in this investigation. Plasma samples from OHNT patients were used as control ones to determine specificity of the tests analyzed. Studies have shown that IgA antibody titers to VCA or EA have higher diagnostic value for nNPC diagnostics in comparison with IgG antibody titers to the same antigens. When IgA antibodies have been used as nNPC marker, both tests showed about the same specificity (95.0% and 97.5% respectively), but IFA demonstrated higher sensitivity (91.9% vs. 73.0% respectively). It was also observed that the ELISA figures are not correlated with the levels of antibody titers, and in some cases they have the opposite values: frequently ELISA figures were low (1.6) when antibody titers detected in RIF were high (1: 160) and high (8.1) when antibody titers were low (1:40) (not shown). Overall, the data obtained showed that both tests employing IgA antibodies to VCA or EA of the virus as markers have high sensitivity and specificity for the nNPC detection and can be useful for the nNPC diagnostics in patients with undetected primary tumor location.

Keywords: Epstein-Barr virus (EBV), immunofluorescent assay (IFA), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), nasopharyngeal carcinoma, other the head and neck tumors, diagnostics significance of EBV markers

Выраженная связь между вирусом Эпштейна-Барр (ВЭБ) и раком носоглотки (РНГ), обнаруженная в южных провинциях Китая, позволила впервые высказать предположение о принципиальной возможности использовать серологические маркеры вируса для диагностики этой ВЭБ-ассоциированной формы опухоли (нРНГ) [5]. В исследованиях, проведенных еще в 1978 г. Но и др., было показано, что для диагностики нРНГ могут быть успешно использованы IgA антитела к вирусному

капсидному антигену (ВКА) ВЭБ в титрах 1:10 и выше, причем даже в случаях предшествующих возникновению опухоли [6,7]. Несколько менее выраженной, но достаточной диагностической ценностью, обладали также IgG и IgA антитела к раннему антигену (РА) вируса [7].

Антитела к ВКА, относящиеся к иммуноглобулинам класса А, оказались полезными и для ранней диагностики нРНГ. Их высокая диагностическая ценность была продемонстрирована при массовом обследовании населения в одной из южных провинций Китая (Guangdong) [4]. Дальнейшие исследования показали, что кроме южных провинций Китая, высокие и промежуточные уровни заболеваемости РНГ зарегистрированы в странах Юго-Восточной Азии, Северной Африки, среди населения инуитов Аляски, Гренландии и Северной Канады, а также среди мигрантов китайского и филиппинского происхождения [8]. Вне эндемичных районов это новообразование встречается достаточно редко. Например, среди населения Колумбии, США, Финляндии, Зимбабве, Индии, и Японии показатели заболеваемости РНГ в период 1998-2002 годов были в 30-60 раз ниже, чем среди населения Гонконга, относящегося к региону высокого риска [9]. РНГ является редким заболеванием и среди населения стран бывшего СССР, включая Россию. В частности, в структуре злокачественных новообразований России в 2008 г. опухоли носоглотки у мужчин составляли 0,14, а у женщин 0,06 на 100 т. населения [2].

Согласно классификации Всемирной Организации Здравоохранения 2005 г. среди трех идентифицируемых гистологических вариантов РНГ (неороговевающий, ороговевающий и базалоидный плоскоклеточный рак) лишь неороговевающий рак (нРНГ), в подавляющем большинстве случаев регистрируемый в Южном Китае и странах Юго-Восточной Азии, тесно ассоциирован с ВЭБ [10].

В наших исследованиях, проводимых в не эндемичном регионе, России, диагностика нРНГ базируется на ранее разработанном нами так называемом «решающем правиле», в котором оцениваются значения титров IgG антител к ВКА и РА, а также IgA антител к ВКА вируса [1]. Любая положительная сумма диагностических весов, соответствующих выявленным у больного титрам ВЭБ-специфических антител, с достоверностью ≥ 95 % указывает на наличие нРНГ. Важно отметить, что среди титров антител трех указанных специфичностей, наибольший диагностический вес для диагностики нРНГ, как и в эндемичных регионах, обладают титры IgA антител к ВКА. Этот же класс антител к ВКА выявляют и с помощью иммуноферментных тест-систем различных коммерческих фирм. Значение же уровней IgA антител к ВКА, выявляемых иммуноферментным анализом, для диагностики нРНГ оставалось практически неизученным.

Цель исследования

Исходя из сказанного, цель данной работы состояла в оценке значимости 2-х серологических тестов, непрямой реакции иммунофлуоресценции (РИФ) и иммуноферментного анализа (ИФА), для диагностики нРНГ.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования служили образцы плазмы крови 37 больных с морфологически подтвержденным диагнозом РНГ и 40 больных другими опухолями головы и шеи (ДОГШ), не ассоциированными с ВЭБ. В обеих группах больных наличие IgG и IgA антител к ВКА и РА антигенам были изучены с помощью двух тестов: непрямой реакцией иммунофлуоресценции (РИФ) и иммуноферментным анализом (ИФА). Условия проведения РИФ и учет получаемых результатов нами были описаны ранее [3], при этом титры ВЭБ-специфических антител в изучаемых группах представляли в виде их среднегеометрических значений (СГТ).

ИФА на IgG антитела проводили с помощью тест-системы производства ЗАО «Вектор-Бест» (Россия). Результат анализа считался положительным, если согласно инструкции производителя оптическая плотность образца (ОП обр.) была оптической плотности критического значения (ОП крит.). Результат анализа считался отрицательным, если ОП обр. < 0,8хОП крит. Результат анализа считался неопределенным, если 0,8 х ОП крит. ≤ ОП обр. < ОП крит.

ИФА на IgA антител осуществляли с помощью тест-системы EUROIMMUN (Германия), при этом значения <0.8 относились к негативным, от < 0.8 до < 1.1 – к неопределенным и >1.1 – к позитивным. Образцы плазмы крови от больных ДОГШ, использованные в качестве контрольных, тестировали в РИФ и ИФА с целью выяснения специфичности этих тестов для диагностики нРНГ. Анализ чувствительности и специфичности тестов определяли по следующим формулам: *чувствительность* = число истинно позитивных случаев/(число истинно позитивных случаев + число ложно негативных случаев); *Специфичность* = число истинно негативных случаев /(число истинно негативных случаев + число ложно позитивных случаев).

Результаты исследования и их обсуждение

Проведенные исследования показали (таблиц), что при тестировании в РИФ плазмы крови 37 больных с морфологически подтвержденным диагнозом нРНГ, IgG антитела к ВКА вируса были выявлены в 100,0 % случаев. Но специфичность теста составила всего лишь 10.0 %, т.к. в кон-

трольной группе, состоящей из 40 больных ДОГШ, IgG антитела к ВКА обнаружены в 90% случаев. ИФА при тестировании плазмы тех же больных нРНГ проявил схожую невысокую специфичность (17.5%) при 100% выявлении IgG антител к ВКА.

37 больных нРНГ (83.8%) при их специфичности 97.5%.

РИФ также продемонстрировала высокую для нРНГ диагностическую значимость при тестировании IgA антител к РА. Указанные антитела этим методом были выявлены

Анализ чувствительности и специфичности иммунофлуоресцентного и иммуноферментного тестов для диагностике рака носоглотки

Тест	Группа	Число обследованных	Результат тестирования		Чувствительность (%)	Специфичность (%)
			отриц	полож		
РИФ IgG/ВКА	нРНГ	37	0	37	100.0	10.0
	ДОГШ	40	4	36		
РИФ IgG/РА	нРНГ	37	0	37	100.0	82.5
	ДОГШ	40	33	7		
ИФА IgG/ВКА	нРНГ	37	0	37	100	17.5
	ДОГШ	40	7	33		
ИФА IgA/РА	нРНГ	37	8	29	78.4	95.0
	ДОГШ	40	38	2		
РИФ IgA/ВКА	РНГ	37	2	35	94.6	90.0
	ДОГШ	40	36	4		
РИФ IgA/ РА	нРНГ	37	3	34	91.9	95.0
	ДОГШ	40	38	2		
ИФА IgA/ВКА	нРНГ	37	6	31	83.8	97.5
	ДОГШ	40	39	1		
ИФА IgA/РА	нРНГ	37	10	27	73.0	97.5
	ДОГШ	40	39	1		

Примечание: РИФ –реакция иммунофлуоресценции; ИФА – иммуноферментный анализ; IgG/ВКА – антитела класса G к вирусному капсидному антигену вируса Эпштейна-Барр; IgG/РА – антитела класса G к раннему антигену вируса Эпштейна-Барр; IgA/ВКА – антитела класса G к вирусному капсидному антигену вируса Эпштейна-Барр; IgA/РА – антитела класса G к раннему антигену вируса Эпштейна-Барр.

Более высокую диагностическую значимость РИФ и ИФА продемонстрировали при анализе содержания IgG антител к РА. Чувствительность РИФ при тестировании плазмы крови больных нРНГ на антитела указанной специфичности была равной 100% (37/37), а его специфичность составила 82.5%. При использовании ИФА чувствительность теста была несколько ниже (78.4%), но его специфичность достигла 95.0%. Полученные данные свидетельствуют о достаточно высокой диагностической для нРНГ ценности обоих тестов при тестировании IgG антител к РА и их непригодности при анализе IgG антител к ВКА.

IgA антитела к ВКА, как оказалось, представляют собой еще более специфический маркер для нРНГ, чем IgG антитела к РА. В РИФ эти антитела были выявлены у 35 из 37 больных нРНГ, (чувствительность 94.6%) и их специфичность составила 90%. Использование ИФА позволило обнаружить указанные антитела у 31 из

у 34 из 37 больных нРНГ (91.9%) и специфичность теста составила 95.0%. IgA антитела к тому же антигену с помощью ИФА были обнаружены у 27 из 37 больных нРНГ (73%) при также высокой специфичности иммуноферментного анализа (97.5%).

Заключение

Таким образом, данные, полученные нами в не эндемичной по нРНГ России, находятся в соответствии с выводами зарубежных исследователей, изучавших проблему диагностики нРНГ в эндемичных регионах [6, 7]. В работах этих авторов диагностика нРНГ базировалась, преимущественно на обнаружении титров IgA антител к ВКА. Результаты проведенных нами исследований подтверждают высокую для диагностики нРНГ значимость IgA антител к ВКА, при использовании и РИФ, и ИФА. При этом чувствительность РИФ по сравнению с ИФА оказалась несколько выше (94.6% против 83.8%), в то время как ИФА демонстрировал несколько большую

специфичность (97.5% против 90.0%). Изучение в РИФ и ИФА диагностической значимости IgA антител к РА также показало достаточно высокую диагностическую значимость этих тестов для нРНГ. При примерно одинаковой их специфичности (95.0% и 97.5% соответственно), более высокая чувствительность обнаружена у РИФ (91.9% против 73.0% соответственно). Преимущество РИФ перед ИФА, однако, состоит в отражении титрами антител, определяемыми в РИФ, вирусной нагрузки в организме больного нРНГ, как правило, совпадающей с динамикой опухолевого процесса, что наблюдалось нами в предыдущих исследованиях [1]. Показатели же ИФА не коррелировали с уровнями титров антител, а в ряде случаев имели противоположные значения: они иногда были низкими (1.6) при высоких титрах антител РИФ(1:160) и высокими (8.1) при низких титрах антител (1:40) (не показано). В заключение можно сделать вывод о том, что обе тест-системы обладают для нРНГвысокой чувствительностью и специфичностью при использовании в качестве маркеров нРНГ IgA антител к ВКА либо к РА. Эти тест-системы могут быть использованы и для диагностики нРНГ у больных с подозрением на эту опухоль при невыявленном первичном очаге. Кроме того, РИФ, может оказаться полезным тестом для мониторинга клинического состояния больных нРНГ.

Список литературы

1. Гурцевич В Э, Степина В Н, Сенюта Н Б и др. / 2011. Гуморальный иммунный ответ к вирусу Эпштейна-Барр в диагностике рака носоглотки (обзор литературы и 30-летний опыт собственных исследований) // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. – 2011. – Т. 22, № 2. – С. 20-30.

2. Давыдов М. И., Аксель Е. М. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2012 году. – М.: Издательская группа РОНЦ, 2014.

3. Gurtsevitch V., Ruiz R., Stepina V. et al. Epstein-Barr viral serology in nasopharyngeal carcinoma patients in the USSR and Cuba, and its value for differential diagnosis of the disease // Int.J.Cancer. – 1986. – № 37. – С. 375-381.

4. Ling W., Cao S.M., Huang Q.H. et al. Prognostic implication of pretreatment titer of serum immunoglobulin A against Epstein-Barr virus capsid antigen in nasopharyngeal carcinoma patients in Sihui, Guangdong // Ai.Zheng. – 2009. – № 28. – С. 57-59.

5. Henle G., Henle W. Epstein-Barr virus-specific IgA serum antibodies as an outstanding feature of nasopharyngeal carcinoma // Int.J. Cancer. – 1976. – № 17. – С. 1-7.

6. Ho H.C., Kwan H.C., Wu P. et al. Epstein-Barr antibodies in suspected nasopharyngeal carcinoma // Lancet. – 1978. – № 2. – С. 1094-1095.

7. Ho H.C., Ng M.H., Kwan H.C. et al. Epstein-Barr-virus-specific IgA and IgG serum antibodies in nasopharyngeal carcinoma // Br.J.Cancer. – 1976. – № 34. – С. 655-660.

8. Parkin D.M., Bray F., Ferlay J. et al. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000 // Int.J.Cancer. – 2001. – № 94. – С. 153-156.

9. Parkin D.M., Bray F., Ferlay J. et al. Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J.Clin. // 2005. – № 55. – С. 74-108.

10. Pathology and genetics head and neck tumors. Barnes L., Eveson J.W., Reichart P., Sidransky D/ (ed.) – Lyon: IARC Press, 2005.