

Выявление антинуклеарных антител: международные рекомендации и собственный опыт

С. В. Лапин¹, А. В. Мазинг¹, Т. В. Булгакова¹, О. С. Напалкова¹, М. Ю. Первакова¹,
И. С. Холопова¹, А. Л. Маслянский², А. А. Тотолян³

¹ГБОУ ВПО ПСПбГМУ им. И. П. Павлова Минздрава России, Научно-методический центр по молекулярной медицине Минздрава РФ, Санкт-Петербург

²Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург

³НИИ Эпидемиологии и Микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург

Сокращенное название статьи: Диагностический алгоритм СЗСТ

Detection of antinuclear antibodies: international recommendations and own experience

S. V. Lapin, A. V. Mazing, T. V. Bulgakova, O. S. Napalkova, M. Yu Pervakova, I. S. Kholopova, A. L. Maslyansky, A. A. Totolyan

Резюме

Термином антинуклеарные антитела (АНА) называют семейство аутоантител к компонентам клетки, которые реагируют с нуклеиновыми кислотами ядра клетки и ассоциированными с ними белками. Для исследования АНА в клинической лаборатории может быть использовано множество диагностических тестов, основанных на разных принципах. Несмотря на важность выявления АНА, до недавнего времени не существовало международных рекомендаций, регламентирующих методы выявления АНА в клинической лабораторной диагностике. Международные рекомендации по выявлению АНА были опубликованы недавно (*Ann Rheum Dis.* 2014;73:17–23). Статье обсуждаются рекомендации и анализируется собственный опыт разработки лабораторных алгоритмов по выявлению АНА.

Ключевые слова: системные заболевания соединительной ткани, антинуклеарный фактор, антитела к экстрагируемому нуклеарному антигену, антитела к двуспиральной ДНК, диагностический алгоритм.

Summary

The term antinuclear antibodies (ANA) is a family of autoantibodies to components of cells that react with nucleic acids of the cell nucleus and their associated proteins. For the study ANA in a clinical laboratory can be used a plurality of diagnostic tests based on different principles. Despite the importance of identifying the ANA, until recently, there was no international guidelines governing the methods for detection of ANA in clinical laboratory diagnostics. International recommendations on the identification of ANA were published recently (*Ann Rheum Dis.* 2014, 73: 17, 23). Recommendations are discussed and analyzed by their own experience in the development of laboratory algorithms to detect ANA.

Key words: systemic connective tissue disease, antinuclear factor, antibodies to extractable nuclear antigen, antibodies to double-stranded DNA, the diagnostic algorithm.

Иммунологическим признаком системных заболеваний соединительной ткани (СЗСТ) является возникновение клеточных и гуморальных реакций, направленных против антигенов собственных клеток и тканей организма, которое сопровождается появлением антинуклеарных антител (АНА) [2, 5, 23, 24]. Выявление АНА имеет большое значение в диагностике и дифференциальной диагностике системной красной волчанки (СКВ), системного склероза (СС), синдрома Шегрена, других СЗСТ а также аутоиммунных заболеваний печени и артритов. [4, 5, 17, 19]

Термином АНА называют семейство аутоантител к компонентам клетки, которые реагируют с нуклеиновыми кислотами ядра клетки и ассоциированными с ними белками, а также с рядом рибонуклеопротеиновых антигенов нуклеолеммы и цитоплазмы клетки [14]. Поэтому ряд авторов рекомендуют новое название АНА — «антицеллюлярные антитела» [8].

Терминология лабораторных методов выявления АНА до сих пор не устоялась даже в международной литературе [8], поэтому присутствует путаница в названиях, которые описывают антитела, их разновидности, скрининговые и подтверждающие лабораторные тесты для их выявления. Ниже даны определения основным понятиям лабораторного определения АНА, которые мы используем в данной статье.

В семейство АНА входят определенные разновидности или «специфичности» АНА. Под термином специфичность АНА понимают выявление связывания аутоантител с охарактеризованной молекулой антигена, которое может быть выявлено с помощью лабораторного теста. В настоящее время описано около 100 специфичностей АНА (т.е. аутоантигенов с которым антитела реагируют), но в клинических лабораториях обычно выявляют около 20-30 наиболее распространенных из них [20]. В качестве аутоантигенов АНА могут выступать нуклеиновые

кислоты, отдельные белки, рибонуклеопротеиновые комплексы (например нуклеосомы) и органеллы клетки (компоненты рибосом и др.). В то же время, антигены многих АНА до сих пор не охарактеризованы, поскольку могут представлять конформационные, нестабильные или комплексные белковые или рибонуклеопротеиновые структуры. В таком случае АНА выявляются только с помощью тестов, основанных на непрямой иммунофлуоресценции, что позволяет выявлять реакции антител с нестойкими или конформационными антигенами. Такое связывание обычно не выявляется иммунометрическими тестами для выявления конкретных специфичностей [13]. Если в одной сыворотке могут быть обнаружены АНА к нескольким антигенным мишеням, в таком случае принято говорить о спектре АНА, выявляющегося у данного человека. Определение конкретной специфичности АНА, например антител к двуспиральной ДНК (дсДНК) или антигену Scl-70,

Основные лабораторные методы и оборудование для выявления АНА в клинико-диагностических лабораториях

Принцип измерения	Лабораторное оборудование, фирмы-производители
Непрямая иммунофлюоресценция на эпителиоидных клеточных линиях человека HEp-2 и Hep 2000 (HPIФ)	TITERPLANE (Euroimmun AG), AKLIDES (Medipan)
Иммуноферментный метод (ИФА)	ANALYZER (Euroimmun AG), ALEGRIA (Orgentec)
Иммуноблот: лайнблот (LIA), вестерн-блот, дот-блот	EUROBlotOne (Euroimmun AG), BlueDiver (D-TEK)
Хемилюминесценция (CLIA)	LIAISON (DiaSorin)
Проточная цитометрия с иммунореактивными микрочастицами (ALBIA/XMAP)	BIOPLEX 2200 (BioRAD)
Иммуноферментный флюоресцентный метод (FEIA)	PHADIA 250 (Thermo Scientific)

имеет важное клинико-диагностическое значение, поскольку с помощью аутоантител уточняется диагноз СЗСТ, но выявление аутоантител также увеличивает на риск развития характерных клинических проявлений заболевания. Многообразие серологических реакций в дифференциальной диагностике СЗСТ является причиной повышенного внимания к вопросам иммунологического выявления АНА [2, 4, 19].

Методические особенности выявления АНА

Основной задачей лабораторного тестирования АНА является определение всех разновидностей аутоантител, присутствующих в конкретном образце. Методы выявления АНА делят на скрининговые, которые детектируют присутствие или отсутствие АНА в образце, и подтверждающие, результатом которых является определение спектра специфичностей АНА. Скрининговые тесты для выявления АНА используют для ранней диагностики СЗСТ, а также исключения диагноза СЗСТ в случае неопределенной клинической картины [20]. В тестировании АНА особое значение имеет метод непрямой иммунофлюоресценции (антинуклеарный фактор), в котором антитела выявляются за счет связывания с антигенами внутри клеток или тканевого субстрата [23].

Термин антинуклеарный фактор (АНФ) обобщает тесты для скринингового выявления АНА, основанные на методе непрямой иммунофлюоресценции [3]. Антитела выявляются за счет их связывания с клетками клеточных линий (реже криосрезами тканевой лабораторных животных). Исторически использовался ряд клеточных и тканевых субстратов для выявления АНФ, но в настоящее время, повсеместно используется клеточная линия эпителиоидных клеток аденокарциномы гортани человека HEp2 [16]. Распределение антигенов внутри клетки определяет тип свечения ядра, который позволяет судить о спектре АНА, присутствующих в данной сыворотке. Не всегда при наличии даже высоких титров АНФ можно установить антигенную специфичность АНА, поскольку многие антигены, выявляющиеся с помощью АНФ, относят к конформационным (т.е. нестойким) и до сих пор плохо охарактеризованным.

На отечественном рынке реактивы для определения АНФ представлены рядом производителей, например Euroimmun AG (Германия), Immco (США), BioSystems, (Испания), Medipan AG (Германия). Преимуществами продукции Euroimmun AG является использование клеточной линии Hep-2000, обладающей повышенным числом клеточных делений, а также возможность совместного иммунофлюоресцентного исследования в одном реакционном поле других субстратов, например печени приматов, что повышает выявляемость ряда специфичностей АНА.

Кроме АНФ применяют скрининговые тесты, основанные на выявлении антител к смеси антигенов ядер, очищенных из клеток или полученных методами генной инженерии [10]. До недавнего времени для описания спектра АНА в иммунологических лабораториях, использовался экстрагируемый ядерный антиген (ЭНА), представляющий водно-солевые экстракты ядер клеток. В состав ЭНА входят растворимые клеточные антигены, прежде всего рибонуклеопротеины, однако водонерастворимые антигены, например нуклеиновые кислоты, в составе ЭНА отсутствуют. В настоящее время, под названием антитела к ЭНА обычно подразумевают выявление антител к смеси рекомбинантных антигенов [21].

Проведение дифференциальной диагностики в рамках СЗСТ требует определения отдельных специфичностей АНА [17]. Для определения специфичностей АНА существует широкий спектр методов и принципов детекции аутоантител, причем этот перечень постоянно расширяется. Современные молекулярно-биологи-

ческие методы позволяют получать большой набор очищенных аутоантител, что значительно облегчает разработку новых тестов. Ведущими мировыми производителями создаются автоматизированные полузакрытые и закрытые системы, основанные на различных принципах: методе ИФА, дот- и лайн-блоты, хемилюминесцентный метод, мультиплексный анализ на микрочастицах и др. (табл. 1).

Несмотря на совершенствование методов, лайн-блоты представляют собой сравнительно дешевую, но достаточную надежную альтернативу автоматизированным технологиям для лабораторий с небольшим потоком исследований [18, 22]. Большинство лайнблотов, представленных на отечественном рынке, позволяет выявлять от 9 до 20 различных аутоантител в одном тесте, что обеспечивает значительное преимущество перед другими технологиями по спектру определяемых показателей. Так для диагностики СЗСТ фирма Euroimmun AG (Германия), выпускает линейку иммуноблотов с возможностью выявления до 30 специфичностей АНА. Разработаны продукты как для дифференциальной диагностики всех СЗСТ, так и для дифференциальной диагностики в рамках СКВ, склеродермии, полимиозита.

Возможность денситометрии с помощью оптических систем ряда офисных сканеров обеспечивает возможность количественной и полуколичественной оценки результатов блотов, а также возможность архивации результатов исследований (программа EUROLIneScan).

Внедрение современных автоматизированных систем ставит вопрос о целесообразности сохранения АНФ

Таблица 2
Международные рекомендации 2014 года по детекции аутоантител к клеточным компонентам (АНА) [8]

1	Диагноз СЗСТ требует нескольких специализированных лабораторных тестов
2	Выявление АНФ, анти-дсДНК и антитела к ЭНА (специфичностей АНА) следует использовать для диагностики СЗСТ и ряда других аутоиммунных заболеваний
3	Выявление АНФ является первым лабораторным тестом в диагностике СЗСТ
4	Выявление АНФ следует использовать для диагностики, а не мониторинга СЗСТ
5	Непрямая иммунофлуоресценция (АНФ) является референтным методом скринингового выявления АНА. Другие методы выявления АНА могут отличаться по уровню ложных результатов. Если существует клиническое подозрение при отрицательном результате другого метода выявления АНА, следует провести выявление АНФ
6	Диагностические лаборатории должны указывать метод выявления АНА
7	Тесты, основанные на смеси нескольких конкретных ядерных антигенов не должны называться АНА-тестом или АНА-скринингом
8	Лаборатории, которые используют внутрилабораторные методы для выявления АНФ, равно как и антитела к дс ДНК и специфическим ЭНА должны стандартизовать эти методы с помощью международных стандартов (ВОЗ или CDC/UIS)
9	Для выявления АНФ следует использовать меченную флуорохромом античеловеческую антисыворотку против IgG
10	Титр АНФ зависит от реактивов, оборудования и других факторов, поэтому разведение для скрининга сыворотки следует определять в лаборатории. Повышенный АНФ следует считать титр выше 95го перцентилля контролей из здоровой популяции. В большинстве случаев разведение сыворотки 1:160 достаточно для выявления АНФ во взрослой популяции
11	В случае положительного результата выявления АНФ в результате лабораторного теста должен быть указан тип свечения клетки и наивысший титр разведения сыворотки
12	Тип АНФ следует указывать в соответствии со стандартной терминологией (см. таб.2)
13	Кроме типов свечения ядра АНФ должны указываться свечения цитоплазмы и делящихся клеток
14	При обнаружении АНФ и клиническом подозрении на СКВ следует рекомендовать выявление антител к дсДНК
15	При выявлении антител к дсДНК наилучшую специфичность имеют радиоиммунный тест (тест Фарр/Фарр) и непрямая иммунофлуоресценция на <i>Crithidia luciliae</i> (CLIFT). Положительные результаты других тестов следует подтверждать этими методами.
16	Метод, используемый для выявления антител к дсДНК, следует указывать в форме результата лабораторного теста
17	Результат выявления антител к дсДНК должен предоставляться в количественном виде
18	При мониторинге СКВ с помощью количественного измерения антител к дсДНК должен использоваться один и тот-же лабораторный метод
19	В случае положительного результата АНФ следует использовать лабораторные тесты для определения специфичности АНА
20	Для выявления антител к ЭНА следует указывать метод выявления. В случае расхождения с результатами АНФ или клинической картиной рекомендуется использование альтернативного метода выявления антител
21	Результаты определения специфичности антител к ЭНА следует указывать отдельно (включая отрицательный результат выявления антител). При интерпретации результатов скрининговых тестов выявления антител достаточно указать какие разновидности ЭНА присутствуют в составе тест-системы.
22	При подозрении на смешанное заболевание соединительной ткани рекомендуется количественное определение антител к RNP
23	В случае подозрения на конкретное СЗСТ следует проводить углубленное исследование конкретной специфичности АНА. Например, антител к Jo-1 при воспалительных миопатиях, антител к рибосомам и SSA антигену при различных формах волчанки и синдроме Шегрена
24	Каждая лаборатория должна верифицировать референтные пределы скрининговых методов выявления АНА с помощью сывороток здоровых лиц известного пола и возраста. Референтные пределы должны быть сопоставлены с 95 перцентилем результатов измерений в сыворотках здоровых лиц.
25	Каждая лаборатория должна верифицировать (подтверждать) референтные значения методов выявления антител к дсДНК и антител к ЭНА. Следует использовать достаточное количество образцов больных с разными аутоиммунными заболеваниями, от заболевших и здоровых доноров. Референтные значения должны устанавливаться с помощью ROC-анализа

Примечания: АНА –антинуклеарные антитела; АНФ — антинуклеарный фактор; дсДНК — двуспиральная ДНК; СЗСТ — системные заболевания соединительной ткани; ЭНА- экстрагируемые нуклеарные антигены; CLIFT — *Crithidia luciliae* immunofluorescence test

в качестве основного метода диагностики АНА. Несмотря на большую аналитическую чувствительность иммунометрических методов по сравнению с непрямой иммунофлюоресценцией на тканевых субстратах, спектр выявляемых АНА с помощью таких методов ограничен. Ограниченный спектр выявляемых специфичностей АНА обуславливает меньшую диагностическую чувствительность иммунометрических мультиплексных тестов по сравнению с АНФ, т.е. при использовании таких методов высока вероятность ложно-отрицательного результата. Наши данные свидетельствуют о том, что при определении АНА, например с помощью лайнблота, теряется до 9% и 50% положительных результатов в высоких и средних титрах АНФ соответственно [1].

Именно поэтому АНФ до сих пор является «золотым стандартом», использование которого обеспечивает наиболее корректные результаты при выявлении АНА [8, 25].

Международные рекомендации 2014 года

Для исследования АНА в клинической лаборатории может быть использовано множество диагностических тестов, основанных на разных принципах. Единой номенклатуры этих тестов не существует, что приводит к определенным затруднениям при назначении и интерпретации обследования [11]. Фирмы-производители реактивов и оборудования для клинической лабораторной диагностики могут предлагать различные методические подходы к скринингу АНА и определения основных специфичностей [15]. При этом выявление АНА постепенно покидает стены высокоспециализированных иммунологических лабораторий, что может привести к снижению качества обследования в угоду большей технологичности и пропускной способности метода.

Несмотря на важность выявления АНА, до недавнего времени не существовало международных рекомендаций, регламентирующих методы выявления АНА в клинической лабораторной диагностике. Международные рекомендации по выявлению АНА были опубликованы недавно [8]. В их подготовке принимали участие две

Таблица 3

Типы свечения ядра и цитоплазмы на клеточной линии Нер-2, аутоантигены и заболевания [8] с изменениями)

Тип свечения	Основной антиген (ы)	Заболевания	
Ядерный	Гомогенный	дсДНК, гистоны, нуклеосомы	СКВ, ЮРА
	Крупногранулярный	RNP, RNP/Sm	СЗ, СКВ, СС
	Мелкогранулярный	SSA, SSB, Торо-1, другие антигены	СКВ, СС, СШ, ВМ, СЗ
	Центромерный	CENT-A, B, C	СС, с-м Рейно
	Ядрышковый	PM/Scl, RNA-Pol	СС, ВМ, с-м Рейно
Цитоплазматический	Диффузный	RibP, Jo-1	СКВ, ВМ
	Гранулярный	Jo-1, PDH/AMA-M2	ПБЦ, ВМ
Редкий ядерный	Периферический/ядерная мембрана Плотный мелкогранулярный Пролиферирующие клетки (PCNA)	Точки в ядре Центросома/центриоли Веретено деления	
Редкий цитоплазматический	Отдельные гранулы Комплекс Гольджи	Цитоскелет клетки	

Примечания: ВМ- воспалительные миопатии, ПБЦ — первичный билиарный цирроз, СЗ — смешанное заболевание соединительной ткани, СКВ — системная красная волчанка, СС- системный склероз, СШ — синдром Шегрена, ЮРА — ювенильный ревматоидный артрит

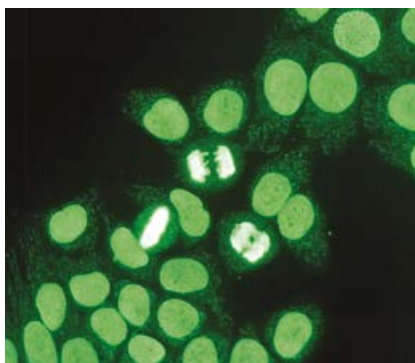


Рисунок 1. АНФ на клеточной линии Нер-2000 (Euroimmun AG, Германия), гомогенный тип свечения, флуоресцентная микроскопия, х400. Отмечается высокая частота клеточных делений.

Лабораторные алгоритмы диагностики СЗСТ

Учитывая разнообразие методов выявления АНА, одновременное назначение всех скрининговых и подтверждающих методов является трудоемким, дорогостоящим и часто неоправданным. Очевидно, что возникает необходимость последовательного тестирования данных АНА, основанном на определенном диагностическом алгоритме [9, 25]. Так как общепринятого алгоритма серологической диагностики АНА у лиц с подозрением на СЗСТ не существует, ряд авторов рекомендуют использовать внутренние алгоритмы, оптимизирующие выявление АНА в рутинной работе [9].

Нами было проведено исследование по разработке и практической оценке алгоритма для диагностики СЗСТ, основанного на результатах

обследования 981 пациента в нашей лаборатории [1]. Для выявления АНФ нами был использован метод непрямой иммунофлюоресценции на клеточной линии Нер-2 и Нер-2000 (Euroimmun AG, Германия). Клеточная линия Нер-2000 обладает повышенной частотой клеточных делений, и клетки делятся в 4–10 раз чаще по сравнению с классической линией Нер-2 (см. рис. 1).

Для определения АНА с помощью лайнблота использовались диагностические наборы фирмы «Euroimmun AG» (Германия). Данная диагностическая система содержит следующие рекомбинантные антигены: Sm, RNP/Sm, SS-A, SS-B, Scl-70, CENP-B, PCNA, дсДНК, нуклеосомы, гистоны, Jo-1, AMA-M2.

Среди исследованных 981 образцов сыворотки крови лиц с подозрением на СЗСТ в 474 образце были выявлены АНА. В данных образцах анализировались результаты выявления АНФ и антител к ЭНА. Хотя оба метода обладают высокой сходимостью, чувствительность определения антител к ЭНА значительно уступает АНФ (20% против 48%). Эта находка подчеркивает необходимость использования АНФ для ранней диагностики СЗСТ.

Антитела к ЭНА у лиц с подозрением на аутоиммунную патологию были обнаружены в 34% образцов совместно с АНФ. Изолированно антитела к ЭНА были обнаружены только у 5,5% (28/507) пациен-

группы экспертов. Наиболее многочисленной действующей группой, которая включала экспертов из 15 Европейских стран, является «Европейская аутоиммунная инициатива по стандартизации» (European Autoimmunity Standardization Initiative — EASI). Под ее эгидой проводится значительное количество конференций и круглых столов по вопросам диагностики аутоиммунных заболеваний (www.easi-network.com). Другой международной организацией является совместный комитет Международного союза иммунологических обществ (IUIS), Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ/WHO), Фонда артрита (AR), Центра по контролю и предотвращению заболеваемости США (CDC) и Американского колледжа ревматологов (ACR). «Совместный комитет по стандартизации аутоантител при ревматических и близких заболеваниях» (IUIS/WHO/AR/CDC) более тридцати лет разрабатывает и внедряет стандарты и референтные сыворотки для выявления аутоантител (www.autoab.org).

Опубликованные международные методические рекомендации охватывают основные методические вопросы организации лабораторного выявления АНА (см. таб.2).

Данные методические рекомендации разделены на 3 блока вопросов. Первые 13 рекомендаций касаются методов выявления АНФ и регламентируют его использование, следующие 5 затрагивают выявление антител к двуспиральной ДНК и, наконец, последние пять пунктов определяют подходы к выявлению антител к ЭНА и специфичности АНА. Рекомендации подчеркивают важность АНФ как референтного теста для скринингового выявления АНА, а также указывают на важность определения типа свечения ядра клетки (см. таб. 3).

Тип свечения клетки позволяет планировать дальнейшее тестирование, например классический гомогенный тип может быть поводом для выявления антител к двуспиральной ДНК, центромерный тип — для исследования АНА характерных для склеродермии, а гранулярный цитоплазматический тип свечения обычно указывает на наличие антимитохондриальных антител, характерных для первичного билиарного цирроза.

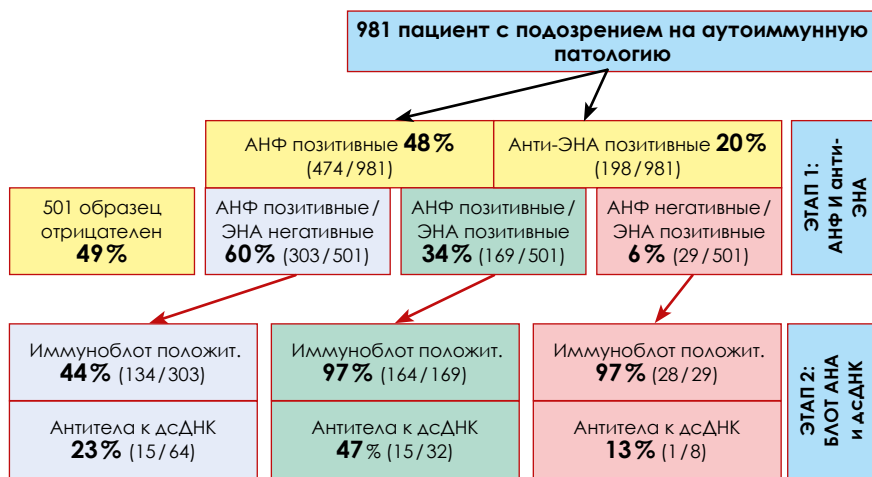


Рисунок 2. Результаты выявления АНА среди у 981 с подозрением на СЗСТ.

Примечания: АНФ- антинуклеарный фактор, ЭНА- экстрагируемые нуклеарный антиген, дсДНК –двуспиральная ДНК.

Таблица 4
Встречаемость положительных результатов лайнблота в зависимости от титров АНФ (n=981) [1]

Титры АНФ	Определены специфичности АНА с помощью лайнблота
Отрицательный (менее 1:80)	6% (28/507)
Низкие титры (1:80–1:160)	37% (55/150)
Средние титры (1:320–1:640)	62% (111/179)
Высокие титры (1:1280–1:5120)	91% (120/132)
Очень высокие титры (>1:10240)	92% (12/13)

тов, что указывает на роль тестов для их выявления в определении тех разновидностей АНА, которые утрачиваются из ядра клетки в ходе фиксации, либо плохо распознаются при микроскопии (см. рис. 2).

Наряду с определением АНФ и антител к ЭНА мы исследовали данные образцы с помощью лайнблота. Частота положительных результатов лайнблота в зависимости от титров АНФ представлена в таблице 4. В образцах, положительных по антителам к ЭНА, но отрицательных по АНФ антителу к растворимым SS-A/SS-B антигенам отмечались в 64% (18/28) случаев, в образцах положительных по АНФ и анти-ЭНА — в 46% (136/298) случаев. Кроме того, в двух образцах, изолированно положительных по антителам к ЭНА были обнаружены антитела к Jo-1 антигену, который располагается в цитоплазме клеток и может быть неразличим при микроскопии. Полученные результаты сопоставимы с данными литературы [12, 18].

Специфичность АНА с помощью метода лайнблота была установлена в 63% образцов, положительных

по АНФ и в 97% образцов, положительных по антителам к ЭНА. Таким образом, специфичность АНА с помощью используемых методов не может быть установлена в 37% АНФ-положительных образцов, что не исключает диагностической ценности выявления АНФ. Лайнблот оказывается отрицательным у большинства пациентов с низкими титрами АНФ, что совпадает с данными, полученными другими авторами. Таким образом, выполнение лайнблота у пациентов с отрицательным или низким результатом АНФ и отсутствием антител к ЭНА нецелесообразно.

Выявление антител к дсДНК обладает высокой сходимостью с результатами определения АНФ и антител к ЭНА. При выявлении АНФ и/или антител к ЭНА вероятность обнаружения антител к дсДНК составляет около 30%, что позволяет рекомендовать антитела к ДНК в качестве теста «второй линии» при обследовании пациентов с системными заболеваниями, после обнаружения АНФ или антител к ЭНА. Чувствительность ИФА тест-систем по определению антител

к дсДНК у различных производителей значительно варьирует, несмотря на то, что для стандартизации данных тестов используется референтная сыворотка Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) Wo80 [4]. По нашим данным, разница в чувствительности тестов составила 56% и 38% в зависимости от производителя. Наряду с методом ИФА в диагностике антител к дсДНК используется метод нРИФ с использованием простейших рода *Crithidia lucilliae*. Несмотря на сравнительно низкую чувствительность данного метода, этот тест по-прежнему рекомендуется в качестве подтверждающего теста, позволяющего объективизировать выявление антител к дсДНК [1, 6].

Полученные нами данные позволяют рекомендовать сочетанное выявление АНФ методом нРИФ и теста для определения антител к смеси ЭНА в качестве серологического лабораторного скрининга системных заболеваний соединительной ткани. Отрицательный результат обоих методов указывает на отсутствие АНА и делает диагноз СЗСТ маловероятным и не требует дальнейшего применения тестов второй линии, к которым может относиться определение АНА методом лайнблота, метод твердофазного ИФА с раздельными антигенами или методами мультиплексного анализа.

При выявлении АНФ или антител к ЭНА рекомендуется использование методов определения специфичности АНА, к которым относится метод лайнблота и определение антител к дсДНК [7].

Проведенный нами финансовый анализ эффективности такого подхода показывает, что использование данного алгоритма сокращает затраты на обследование одного пациента с подозрением на СЗСТ на 33,5%. Кроме того, последовательное назначение тестов повышает диагностическую эффективность, поскольку снижает число ложноположительных результатов обследования (см. рис. 3).

Среди СЗСТ по встречаемости АНА системная склеродермия (ССД) даже опережает СКВ, поскольку АНФ отмечается у 95-100% пациентов с этим заболеванием. К настоящему времени, при ССД описано около 30 антигенных мишеней АНА, причем

выявление ряда специфичностей АНА может определять как особенности поражения внутренних органов, так и прогноз заболевания. В большинстве ИФА и блот-тестов обычно присутствует ограниченный спектр антигенов, представленный Scl-70 и CENT-B антигенами, определяющий предрасположенность к диффузной и лимитированной форме заболевания.

Фирма Euroimmun AG впервые выпустила набор реагентов, основанный на методе лайн-блота для выявления антител к широкому спектру антигенов, характерных для ССД. С помощью него кроме антигенов Scl-70 и CENT-A и B, входят также антигены РНК-полимераз (RP11 и RP155) которые отмечаются при тяжелом течении ССД, антитела к Th/To, встречающимися при мягкой клинической форме ССД. Также в лайнблоте представлены антигены, характеризующие перекрестные синдромы, в частности Ku, антитела против которого отмечаются при СКВ с симптоматикой ССД и антигены РМ-Scl 75кДа и 100 кДа, являющиеся маркером сочетания ССД и полимиозита. Также в состав блота входят ряд антигенов ядрышка (фибрилларин и NOR90), а также антигены PDGFR и Ro-52.

Для выявления АНА нами были обследованы 67 больных ССД проходящих стационарное лечение в условиях специализированного ревматологического отделения. В исследованной группе антинуклеарный фактор (АНФ) был выявлен у 100% (67/67) пациентов, причем преобладали центральный и ядрышковый типы свечения ядра.

Антитела против Scl-70 и/или анти-CENP-B, которые присутствуют в большинстве тест систем для диагностики системных заболеваний, отмечались в 28% (19/67) и 34% (23/67) соответственно, а хотя бы одно из этих антител было обнаружено в 61% случаев. Использование расширенного лайнблота, содержащего 12 аутоантигенов, позволило определить специфичность АНА в 94% (63/67), т.е. позволяет увеличить число положительных серологических находок более чем на треть.

Таким образом, несмотря на тенденции к автоматизации и попыткам упрощения тестов для серологиче-

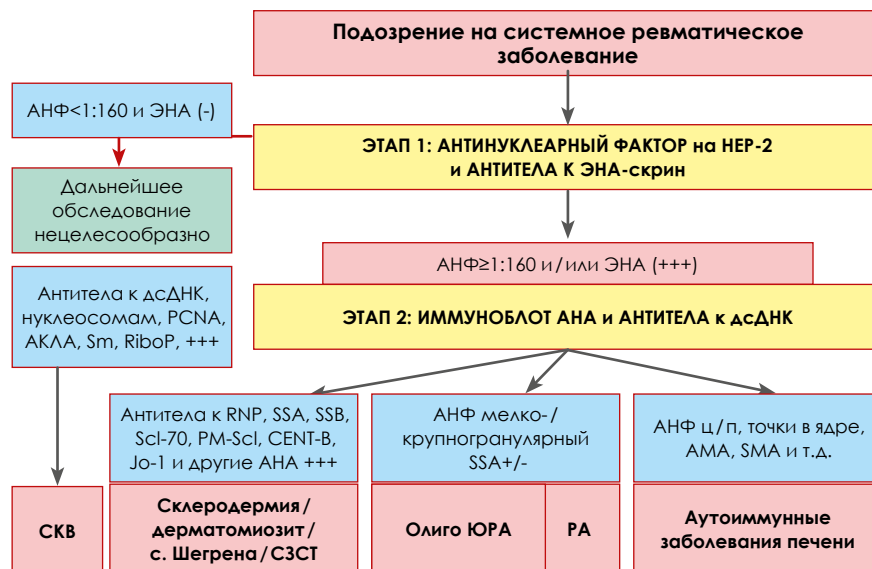


Рисунок 3. Алгоритм диагностики СЗСТ.

Примечания: АНА — антинуклеарные антитела, ЭНА — экстрагируемый ядерный антиген, дсДНК — двуспиральная ДНК, АКЛА — антитела к кардиолипину, СКВ — системная красная волчанка, СЗСТ — смешанное заболевание соединительной ткани, олигоЮРА — олигоартрикулярная форма ювенильного хронического артрита, РА — ревматоидный артрит, АНФ ц/п — цитоплазматический тип антинуклеарного фактора, PCNA, Sm, RiboP, SSA, RNP, SSA, SSB, Scl-70, Pm-Scl, CENT-B, Jo-1, — основные специфичности АНА, АМА — антимитохондриальные антитела, SMA — антитела к гладким мышцам.

ской диагностики СЗСТ на сегодняшний день наилучшей комбинацией лабораторного тестирования для определения АНА является сочетание выявления АНФ и выявления специфичностей АНА с помощью метода лайнблота с максимально широким спектром аутоантигенов.

Список литературы

1. Лазарева Н. М., Лапин С. В., Мазинг А. В., Бугакова Т. В., Ивлиanova Е. П., Маслянский А. Л., Тотолян А. А. // *Клин. лаб. диаг.* — 2011. — Vol.12. — P.12-17.
2. Лапин С. В., Тотолян А. А. // *Мед. иммунология.* — 2001. — Vol.3, N1. — P.35-50.
3. Лапин С. В., Тотолян А. А. *Иммунологическая лабораторная диагностика аутоиммунных заболеваний* / — Санкт-Петербург. — Человек 2010. — 272 p.
4. Лапин С. В., Тотолян А. А. *Иммунологическая лабораторная диагностика ревматических заболеваний* / — Санкт-Петербург. — Человек 2007. — 128 p.
5. Насонов Е. Л., Александрова Е. Н. // *Тер. архив.* — 2010. — Vol.85, N5. — P.5-9.
6. Созина А. В., Ивлиanova Е. П., Шульман А. М., Шульман М. А., Шемеровская Т. Г., Лапин С. В., Тотолян А. А. // *Клин. лаб. диаг.* — 2008. — Vol.5. — P.44-47.
7. Созина А. В., Неустровева Ю. А., Тихомирова Т. А., Лапин С. В. // *Мед. иммунология.* — 2007. — Vol.9, N1. — P.69-76.
8. N. Agmon-Levin, J. Damoiseaux, C. Kallenberg, U. Sack, T. Witte, et al. // *Ann Rheum Dis.* — 2014. — Vol.73, N1. — P.17-23.
9. C. Bonaguri, A. Melegari, P. Dall'Aglio, A. Ballabio, P. Terenzi, et al. // *Ann N Y Acad Sci.* — 2009. — Vol.1173. — P.124-129.

10. X. Bossuyt, A. Hendrickx, J. Frans // *Arthritis Rheum.* — 2005. — Vol.53, N6. — P.987-988.
11. X. Bossuyt, C. Louche, A. Wiik // *Ann Rheum Dis.* — 2008. — Vol.67, N8. — P.1061-1063.
12. X. Bossuyt, A. Luyckx // *Clin Chem.* — 2005. — Vol.51, N12. — P.2426-2427.
13. J. G. Damoiseaux, J. W. Tervaert // *Autoimmun Rev.* — 2006. — Vol.5, N1. — P.10-17.
14. W. Egner // *J Clin Pathol.* — 2000. — Vol.53, N6. — P.424-432.
15. M. Fenger, A. Wiik, M. Hoier-Madsen, J. J. Lykkegaard, T. Rozenfeld, et al. // *Clin Chem.* — 2004. — Vol.50, N11. — P.2141-2147.
16. A. L. Hepburn, P. J. Charles // *Rheumatology (Oxford).* — 2002. — Vol.41, N3. — P.343-345.
17. M. C. Hochberg // *Arthritis Rheum.* — 1997. — Vol.40, N9. — P.1725.
18. I. E. Hoffman, I. Peene, E. M. Veys, F. De Keyser // *Clin Chem.* — 2002. — Vol.48, N12. — P.2171-2176.
19. Y. Kumar, A. Bhatia, R. W. Minz // *Diagn Pathol.* — 2009. — Vol.4. — P.1.
20. P. L. Meroni, P. H. Schur // *Ann Rheum Dis.* — 2010. — Vol.69, N8. — P.1420-1422.
21. S. M. Orton, A. Peace-Brewer, J. L. Schmitz, K. Freeman, W. C. Miller, et al. // *Clin Diagn Lab Immunol.* — 2004. — Vol.11, N2. — P.297-301.
22. I. Peene, L. Meheus, E. M. Veys, F. De Keyser // *Ann Rheum Dis.* — 2001. — Vol.60, N12. — P.1131-1136.
23. U. Sack, K. Conrad, E. Csernok, I. Frank, F. Hiepe, et al. // *Ann N Y Acad Sci.* — 2009. — Vol.1173. — P.166-173.
24. E. M. Tan, A. S. Cohen, J. F. Fries, A. T. Masi, D. J. McShane, et al. // *Arthritis Rheum.* — 1982. — Vol.25, N11. — P.1271-1277.
25. A. Wiik, R. Cervera, M. Haass, C. Kallenberg, M. Khamashta, et al. // *Lupus.* — 2006. — Vol.15, N7. — P.391-396.