

Васюкович С.А., Гончар О.А.
Лаборатория «Синлаб», Минск, Беларусь

Vasiukovich S.A., Hanchar V.A.
Laboratory «Synlab», Minsk, Belarus

Опыт использования метода непрямой иммунофлюоресценции для определения антинуклеарных антител в лаборатории «Синлаб»

Experience of the use of the indirect immunofluorescence method for the determination of antinuclear antibodies in the laboratory «Sinlab»

Резюме

Современная диагностическая лаборатория предоставляет широкие возможности по выявлению антинуклеарных антител (АНА) различными методами. Золотым стандартом определения АНА по рекомендации Американской ассоциации ревматологов является проведение исследования на человеческих эпителиальных клетках методом непрямой иммунофлюоресценции (НИФ). В данной статье представлен опыт определения АНА методом НИФ в лаборатории «Синлаб» (Беларусь) с 2011 г. по настоящее время.

Ключевые слова: антинуклеарные антитела, непрямая иммунофлюоресценция, аутоиммунные заболевания.

Resume

Modern diagnostic laboratory gives grate opportunities for the determination of antinuclear antibodies with different methods. According to American College of Rheumatology the immunofluorescence antinuclear antibody (ANA) assay is the gold standard for ANA testing. This article presents information about the experience of ANA detecting with indirect immunofluorescence assay in laboratory «Synlab» (Belarus) starting from 2011 till now.

Key words: antinuclear antibodies, indirect immunofluorescence, autoimmune diseases.

Антинуклеарные антитела (АНА) относятся к группе аутоантител против антигенов, находящихся в ядре клетки. В норме данные антигены являются недоступными для иммунной системы человека. При развитии аутоиммунных заболеваний по неизвестным пока причинам структуры клетки становятся мишенями для собственной иммунной системы. При этом в сыворотке крови пациента могут выявляться

Часто при определении антинуклеарных антител обнаруживаются антитела к цитоплазматическим структурам клетки, однако эти антитела не относятся к антинуклеарным.

аутоантитела, которые часто играют важную патогенетическую роль в течении заболевания, но в практике врача лабораторной диагностики и врачей-лечебников являются маркерами аутоиммунных процессов, облегчающих постановку диагноза.

Целевыми структурами для выявления АНА являются хроматин ядра либо хроматинассоциированные белки (ДНК, нуклеосомы, гистоны), белки нуклеоплазмы или нуклеолярный матрикс (Sm, U1-nRNP, SS-A/Ro, SS-B/La или Sp100), нуклеолы (Sc170), центромеры (CENP-A, -B, -C) [1].

Золотым стандартом определения АНА является проведение исследования на человеческих эпителиальных клетках (Нер-2 клетки) методом непрямой иммунофлюоресценции (НИФ) [2]. Нер-2 клетки, идентичные по антигенному составу клеткам организма, в виде субстрата нанесены на предметное стекло. Стекло инкубируется с сывороткой пациента, и при наличии в ней аутоантител последние связываются с субстратом. Преимуществом метода является возможность выявления аутоиммунных антител ко всему разнообразию антигенов, имеющихся в клетке (более 100). На заключительном этапе теста комплексы антиген-антитело видны в виде светящихся структур во флюоресцентном микроскопе. Результат теста качественный: «+» – антинуклеарные антитела присутствуют у данного пациента, «-» – антинуклеарные антитела не выявлены [3]. В случае положительного результата дается описание флюоресцентного паттерна и при возможности указываются ассоциированные с этим паттерном антигены.

В табл. 1 описаны основные структуры ядра, антигены и ассоциированные с ними заболевания.

Таблица 1
Основные структуры ядра, антигены и ассоциированные с ними заболевания

| Флюоресцентные паттерны на Нер-2 клетках, антигены и ассоциированные заболевания | | |
|--|------------------------------|--|
| Флюоресцентный паттерн | Антиген | Ассоциируемые заболевания |
| Флюоресцентные паттерны ядра | | |
| Гомогенное свечение ядра | Двуспиральная ДНК/dsDNA | Системная красная волчанка (СКВ), редко другие аутоиммунные заболевания – аутоиммунный гепатит, первичный синдром Шегрена |
| | Односпиральная ДНК/ssDNA | Лекарственная СКВ (в высоких титрах), СКВ |
| | Нуклеосомы | СКВ (высокоспецифичны) |
| | Гистоны/H1, H2A, H2B, H3, H4 | Лекарственная СКВ (в высоких титрах), СКВ и др. |
| Мелкогранулярное свечение ядра | SS-A/Ro | Первичный синдром Шегрена, СКВ, ревматоидный артрит (РА), смешанные заболевания соединительной ткани (СЗСТ), неонатальная волчанка и др. |
| | SS-B/La | Первичный синдром Шегрена, СКВ, редко другие заболевания (например, аутоиммунный гепатит) |
| Гранулярное свечение ядра | Mi-2 | Дерматомиозит |
| | Ku | Перекрестный синдром (склеродермия/дерматомиозит), СКВ, синдром Шегрена |

Окончание табл. 1.

| Флюоресцентные паттерны на Нер-2 клетках, антигены и ассоциированные заболевания | | |
|--|--|---|
| Флюоресцентный паттерн | Антиген | Ассоциируемые заболевания |
| Крупногранулярное свечение ядра | U1-RNP | СЗСТ, редко СКВ, системная склеродермия |
| | Sm | СКВ (высокоспецифичны) |
| Гомогенное свечение ядра, нуклеолы акцентуированы | Scl-70 (DNA-Topoisomerase I) | Склеродермия |
| Нуклеолы гомогенные | Комплексы нуклеопротеинов PM-Scl, To/Th | Перекрестный синдром (склеродермия/ дерматомиозит), склеродермия, полимиозит, дерматомиозит |
| Нуклеолы мелкогранулярные | Фибриллярин (U3-RNP-ассоциируемый белок) | Склеродермия (диффузная форма) |
| Нуклеолы крупногранулярные | РНК-полимераза –I, –II, –III | Склеродермия (диффузная форма) |
| Нуклеолы гранулярные, единичные доты в митотических клетках | NOR-90 | Склеродермия |
| Гетерогенное окрашивание ядер в разных фазах деления | PCNA (proliferating cell nuclei antigen) | СКВ (высокоспецифичны) |
| | PCNA подобное свечение (антиген неизвестен) | Описаны при злокачественных опухолях |
| Несколько точек в ядре (2–6) | P80-Coilin | Первичный билиарный цирроз (ПБЦ), редко склеродермия, СКВ |
| Точки в ядре | SP100-protein | ПБЦ, редко склеродермия |
| Центромеры | CENP-A, -B, -C | CREST-синдром, ПБЦ |
| | CENP-F (Mitosin) | Описаны при злокачественных опухолях |
| Ядерная оболочка | Laminin-B-Rezeptor, gp210 | ПБЦ (высокоспецифичны) |
| Митотические клетки позитивные | Хромосомассоциированные антигены, волокна митотического веретена, клеточная пластинка, центриоли | Клинические ассоциации неизвестны |
| Цитоплазматические паттерны | | |
| Мелкогранулярное свечение цитоплазмы | Aminoacyl-tRNA-синтазы (Jo1, PL-7, PL12) | Полимиозит, Jo-1-синдром |
| Крупногранулярное свечение цитоплазмы | Митохондрии | ПБЦ |
| Гомогенное свечение цитоплазмы | Рибосомальный Р-протеин | СКВ |
| Перинуклеарное свечение | Аппарат Гольджи | СКВ, ревматоидный артрит, синдром Шегрена |
| Филаментный паттерн | Цитоскелет (кератин, виментин, десмин, нейрофиламенты) | Клинические ассоциации неизвестны |
| | Актин (F-actin) | Аутоиммунный гепатит |

Показаниями к выявлению АНА на Нер-2 клетках являются:

- подозрение на коллагенозы, СКВ, синдром Шегрена, склеродермию (включая CREST синдром), СЗСТ (синдром Шарпа), дермато/полимиозит;

- лекарственная СКВ;
- подозрение на аутоиммунный гепатит;
- подозрение на ювенильный идиопатический артрит.

Отрицательный результат теста в 95% случаев позволяет исключить СКВ, лекарственную волчанку, синдром Шегрена, СЗСТ, склеродермию, дермато/полимиозит. Положительный результат теста всегда должен рассматриваться в соответствии с клинической картиной заболевания.

Стратегия диагностики АНА представлена на рис.

В лаборатории «Синлаб» (Беларусь) выявление АНА методом НИФ проводится с 2008 г. Результаты выполнения исследований с 2011 г. представлены в табл. 2.

Наиболее частые паттерны, выявляемые в рутинной лабораторной практике, – гомогенный и гранулярный. Также достаточно часто выявляется нуклеолярный паттерн.

Для подтверждения и дифференцировки результатов НИФ используются:

- метод ИФА: антитела IgG к двуспиральной ДНК, антитела IgG к нуклеосомам, антитела IgG к SS-A (Ro), антитела IgG к SS-B (La)
- метод иммуноблоттинга:
 - 1) определение антинуклеарных антител (15 антигенов – nRNP/Sm, Sm, SS-A, SS-B, Ro-52, Scl-70, PM-Scl, Jo-1, PCNA, dsDNA, нуклео-

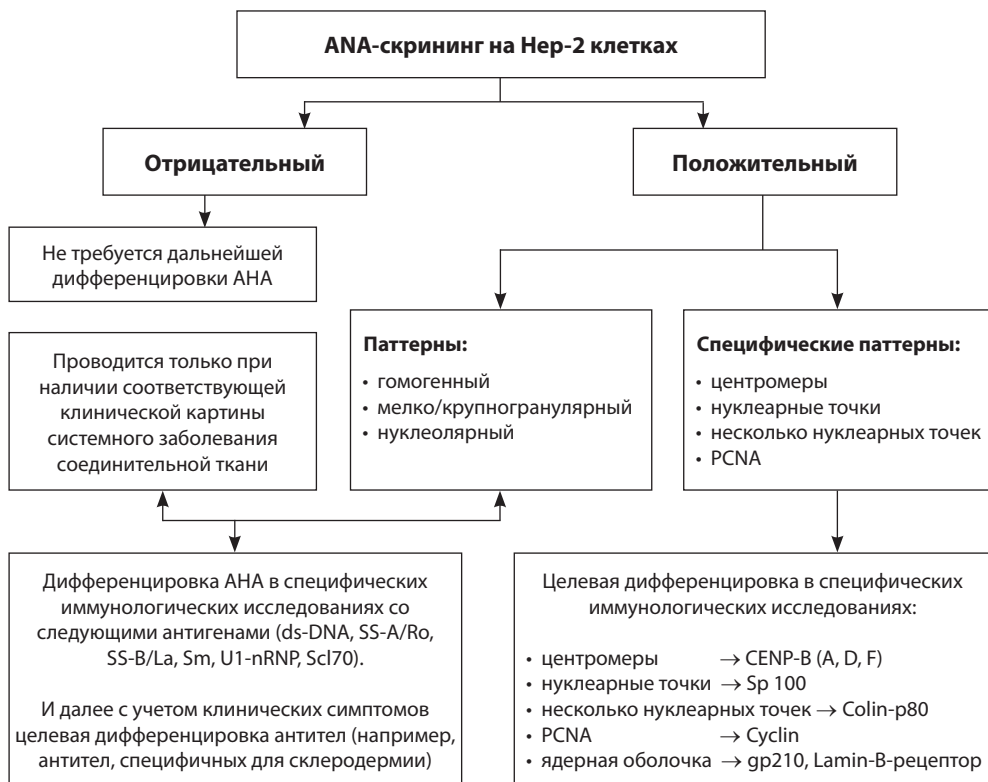


Рис. Стратегия выполнения исследований по выявлению АНА

Таблица 2

Сведения о внедрении метода определения антинуклеарных антител с использованием технологии непрямой иммунофлюоресценции в практику обследования населения Республики Беларусь

| Период | АНА тест, общее количество | Отрицательный | | Сомнительный | | Слабоположительный, + | | Положительный, ++ | | Сильноположительный, +++ | |
|---------------|----------------------------|---------------------|----|---------------------|----|-----------------------|----|---------------------|----|--------------------------|---|
| | | абсолютное значение | % | абсолютное значение | % | абсолютное значение | % | абсолютное значение | % | абсолютное значение | % |
| 2011 | 403 | 230 | 57 | 14 | 3 | 42 | 10 | 109 | 27 | 8 | 2 |
| 2012 | 608 | 322 | 53 | 20 | 3 | 112 | 18 | 105 | 17 | 49 | 8 |
| 2013 (6 мес.) | 390 | 192 | 49 | 47 | 12 | 24 | 6 | 70 | 18 | 28 | 7 |

сомы, гистоны, рибосомальный Р-протеин, АМА-M2, центромерный протеин В);

- 2) определение антител к миелопероксидазе, протеиназе 3 и гломерулярному белку мембраны – Anti-MPO, PR3, GBM IgG;
- 3) печеночный профиль (Anti-AMA-M2, LKM-1, LC-1, SLA/LP);
- 4) определение аутоиммунных антител (Mi-2, Ku, PM-Scl, Jo-1, PL-7, PL-12, Ro-52).

■ ЛИТЕРАТУРА

1. Rudolf Gruber, Lothar Thomas. Antinukleare Antikörper (ANA). – 2013. – P. 18–28.
2. American College of Rheumatology Position Statement, 2009.
3. Инструкция к тесту Mosaic Hep-2/Liver (Monkey). Производитель Euroimmun Medizinische Labordiagnostika AG, Германия.

Поступила в редакцию 04.07.2013

Контакты

e-mail: lab.info@synlab-eml.by

Васюкович Сергей Анатольевич, врач лабораторной диагностики

Гончар Ольга Александровна, врач лабораторной диагностики