

# **Современные стандарты лабораторной диагностики ревматоидного артрита**

**Рытикова Н.С.**

**ЗАО «БиоХимМак»**

# Ревматоидный артрит

- Системное аутоиммунное заболевание, характеризующееся воспалением синовиальной сумки и поражением соединительной ткани.

Как правило повреждаются мелкие суставы.

- Распространенность в мире: от 0,5% до 1% населения,
- *по другим данным - 3% - 5% популяции (США)*
- Почти у 5% у пожилых людей развивается РА
- У женщин встречается в 3 раза чаще, чем у мужчин

# Этиология ревматоидного артрита

- **1. Наследственная склонность к аутоиммунным реакциям.**  
*Повышенный риск ассоциирован HLA DR4 геном (6 пара хромосом, участок MHC II)*
- **2. Инфекционный фактор -**  
**Вирусы - гипотетические триггеры ревматических заболеваний**
  - *парамиксовирусы – вирусы паротита, кори, респираторно-синцитиальной инфекции*
  - *гепатовирусы – вирус гепатита В*
  - *герпесвирусы – вирусы простого герпеса, опоясывающего лишая, ЦМВ, вирус Эпштейна-Барр (значительно выше в синовиальной жидкости \* больных РА)*
  - *ретровирусы – Т-лимфотропный вирус*
- **3. Пусковой фактор (переохлаждение, интоксикации, мутагенные медикаменты, эндокринопатии, стрессы, **курение** и т.д.).**  
Курение увеличивает риск развития РА в 4 раза (работы 2010).

- **Возбудители**
- *Borrelia*
- **Yersinia**
- *Chlamydia*
- *Campylobacter jejuni* (1-2%)
- *Salmonella*
- *Streptococcus*
- *Parvovirus B19*
- и т.д.

## **Среди пациентов с впервые возникшим воспалительным заболеванием суставов выделяют:**

- Очень ранний РА - состояние с длительностью симптоматики 3-6 месяцев (потенциально обратимое состояние)
- Ранний РА, или «ранний установившийся РА» – первые 1-2 года болезни (когда можно определить первые признаки прогрессирования болезни, такие как наличие или отсутствие типичного эрозивного процесса в суставах)

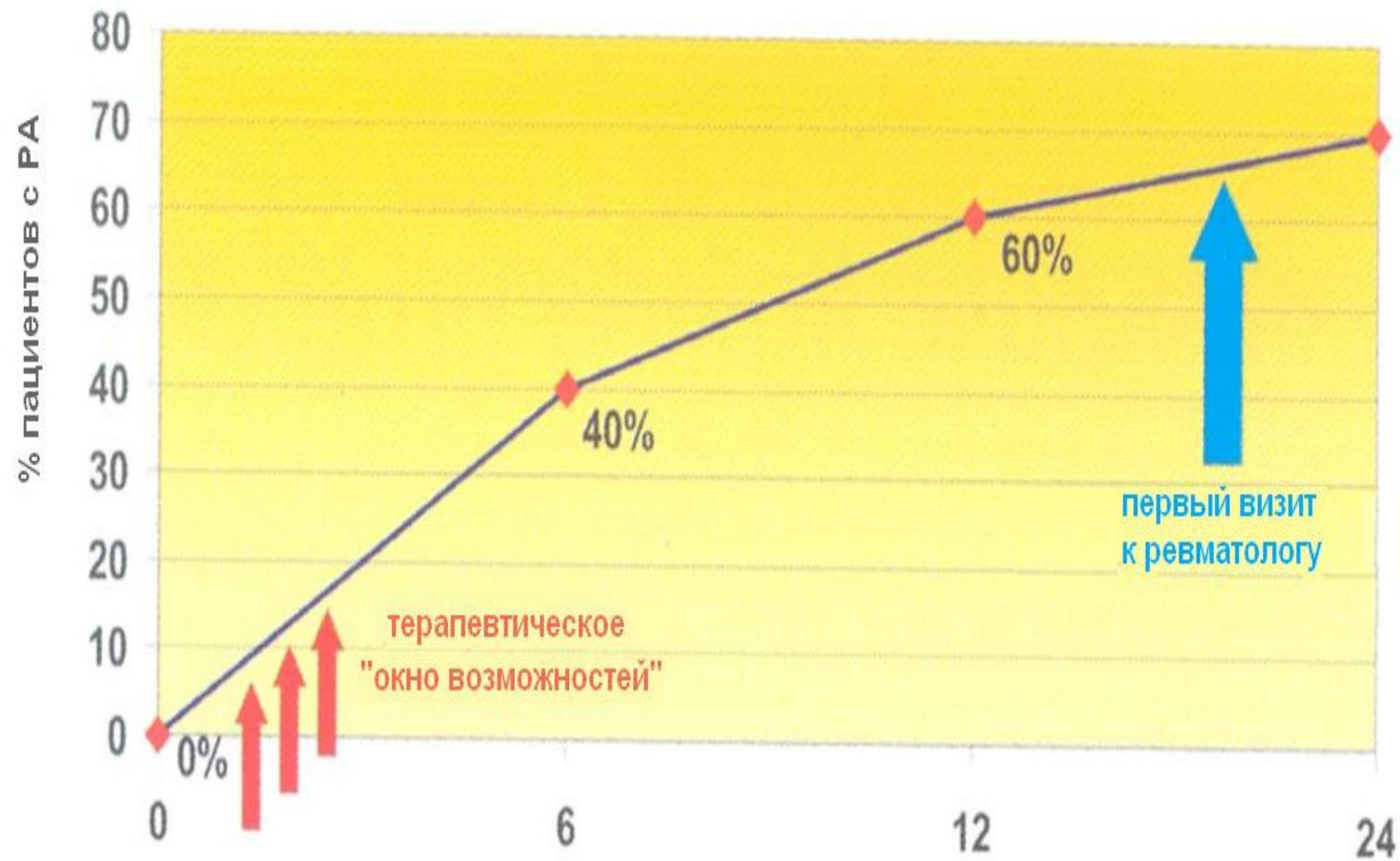
***Ранняя стадия: длительность болезни 6 мес. - 1 год***

***Развернутая стадия: длительность болезни > 1 года при наличии типичной симптоматики РА***

***Поздняя стадия: длительность болезни 2 года и более + выраженная деструкции мелких (III-IV рентгенологическая стадия) и крупных суставов, наличие осложнений***

- Недифференцированный артрит (в настоящее время применяется термин недифференцированный периферический артрит»

# Ревматоидный артрит



## Критерии клинического подозрения на РА EULAR с целью отбора пациентов на консультацию ревматолога (в модификации):

- достоверно определяемая при осмотре припухлость хотя бы одного периферического сустава
- положительный симптом «сжатия» кистей и/или стоп
- утренняя скованность длительностью 30 минут и более.

# Поколения маркеров ревматоидного артрита

- 1. Ревматоидный фактор (IgM)
- 2. Антикератиновые антитела (АКА), антифилаггриновые АТ, анти-перинуклеарный фактор
- 3. Антитела к циклическому цитруллиновому пептиду (Anti-CCP).
- 4. Антитела к модифицированному цитруллинированному виментину (Anti-MCV)

## Ревматоидный фактор (IgM)

- Высокая чувствительность при развитии РА, свыше 90%
- Низкая специфичность, порядка 60%  
(в первые 6 месяцев лишь у 15-43% больных РА)
- Недостаточная чувствительность на доклинической или ранней стадии РА (первый год РА)

## **Частота встречаемости Ревматоидного фактора при различных заболеваниях и у здоровых**

<b>Ревматоидный артрит</b>	<b>80%</b>
<b>Синдром Шегрена</b>	<b>70%</b>
<b>СКВ</b>	<b>30%</b>
<b>Полимиозит</b>	<b>20%</b>
<b>Цирроз печени</b>	<b>25%</b>
<b>Туберкулез</b>	<b>15%</b>
<b>Подострый септический эндокардит</b>	<b>40%</b>
<b>Инфекционный гепатит (Гепатит С)</b>	<b>25%</b>
<b>Здоровые</b>	<b>&lt; 5 - 10%</b>
<b>Пожилые (&gt;70 лет)</b>	<b>15%</b>

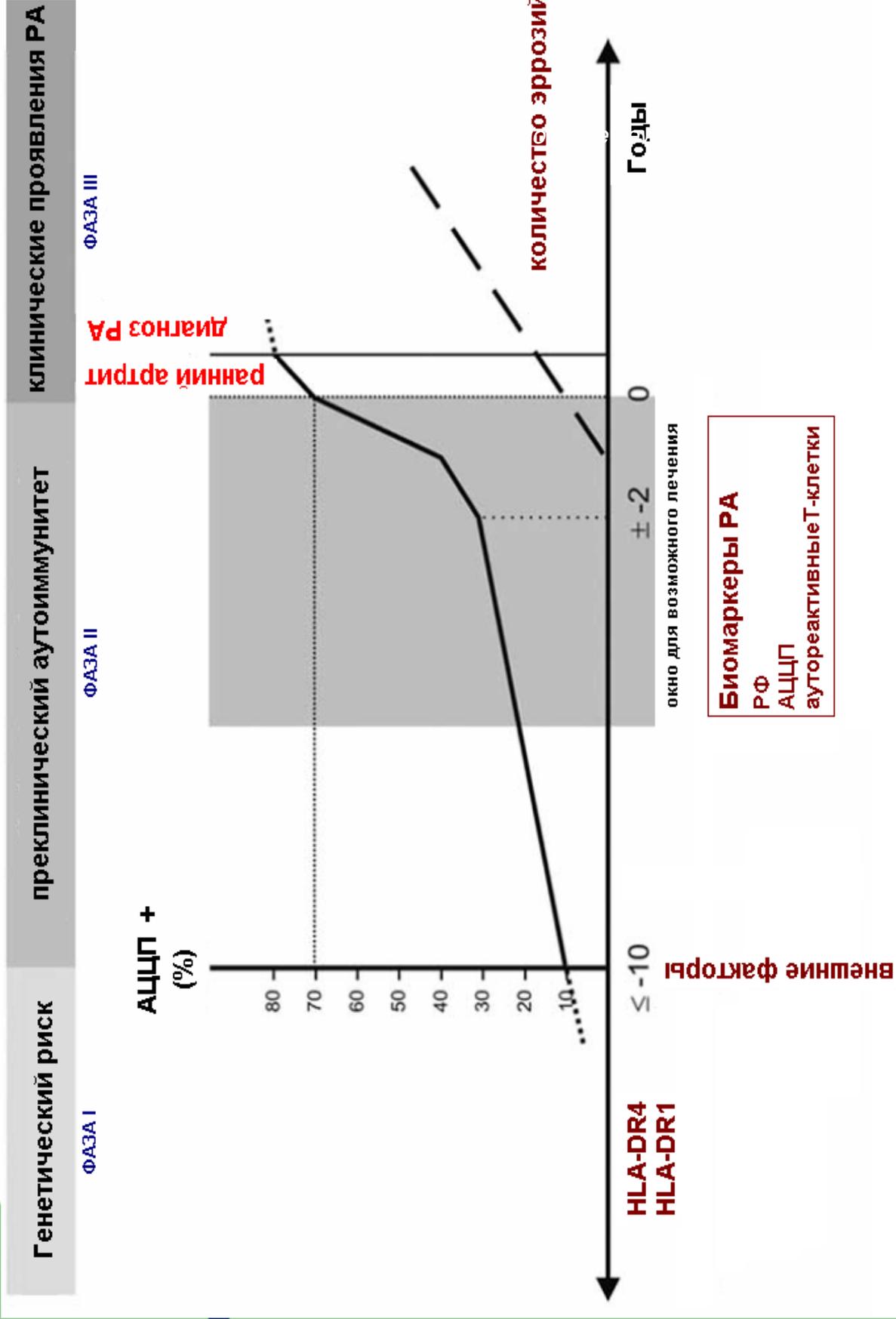
# Ревматоидный фактор (IgM)

- IgM РФ в высокой концентрации является полезным маркером для прогнозирования быстро прогрессирующего деструктивного поражения суставов
- IgM РФ в высокой концентрации является полезным маркером для прогнозирования эффективности терапии ГИБП у больных РА.
- Поддержано рекомендациями Международного консенсуса по применению РТМ у больных РА

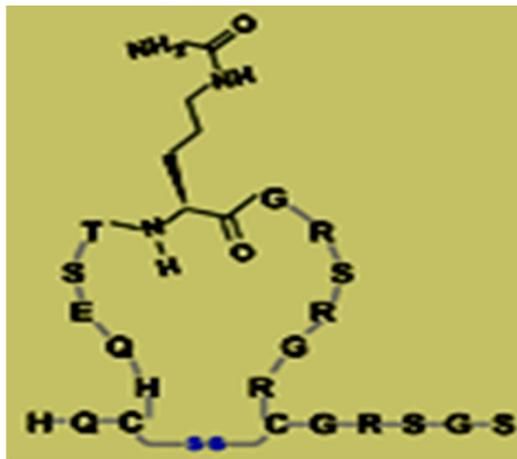
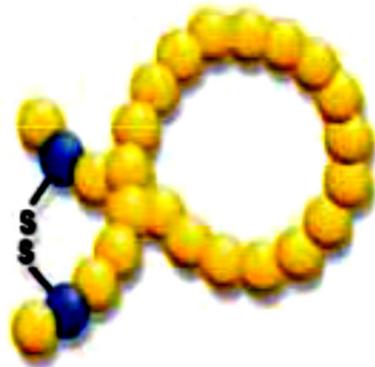
## Оценка кратности определения IgM РФ

- У серонегативных по IgM РФ пациентов на ранней стадии РА рекомендуемая кратность определения данного показателя составляет 1 раз в 3 - 6 месяцев, на развернутой стадии – 1 раз в год
- У низко/высоко позитивных больных по IgM РФ кратность его определения должна составлять на ранней стадии 1 раз в 3 месяца, на развернутой стадии – 1 раз в 3-6 месяцев, на поздней стадии – 1 раз в год
- Поддержано заключением экспертного совета МЗ РФ по ревматологии (сент. 2012)

# СТАДИИ РАЗВИТИЯ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА



# Процесс цитруллинирования – признак воспаления соединительной ткани



Фермент **пептидил-аргинин дезими́наза (PAD)** в синовиальной жидкости при воспалении катализирует превращение аргинина в цитруллин.

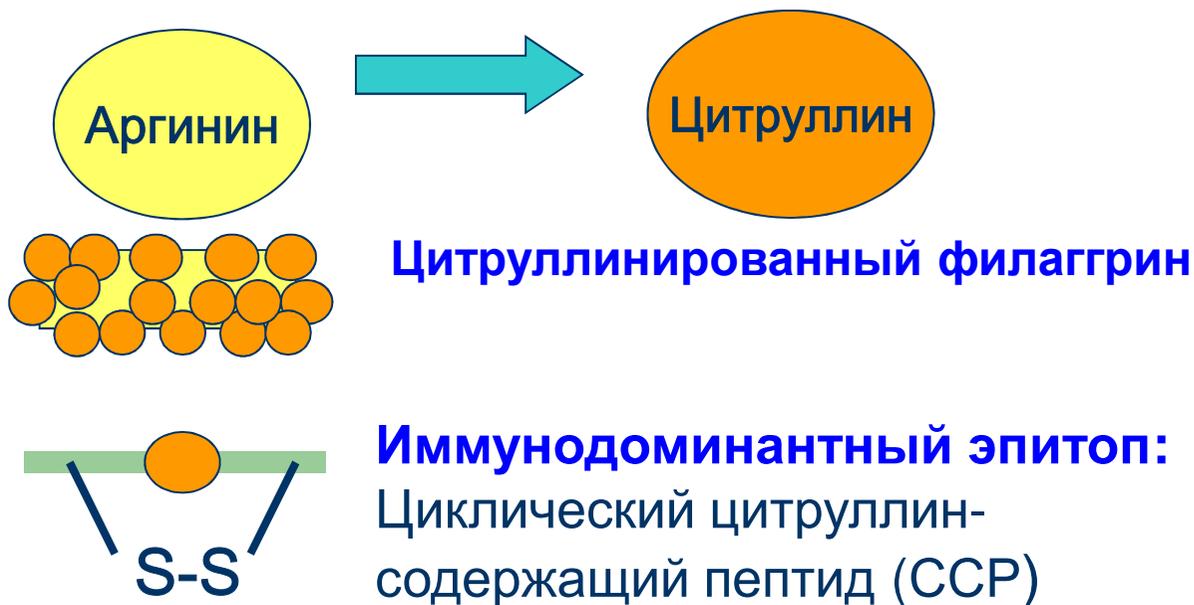
Создание  
синтетического  
антигена –  
подобного  
цитруллинирован  
ному филаггрину

**Профилаггрин:** кислый фосфопротеин, состоит из 10-12 повторов филаггина разделенных линкерами



 **Филаггрин:** белок, участвующий в организации цитокератиновых филаментов, является антигеном, индуцирующим выработку аутоантител к перинуклеарному фактору и кератину.

**Цитруллинирование PAD ферментом**



# Преимущества Anti-CCP

- Появление антител до клинических проявлений заболевания.
- Были исследованы 83 сыворотки человек, здоровых на момент взятия крови, у которых впоследствии развился РА.
- **В 34% случаев были обнаружены Anti-CCP**
- **В 19% случаев был обнаружен РФ IgM**
- Частота обнаружения антител значительно нарастала к моменту, соответствующему **1.5 годам до постановки диагноза**
- Частота обнаружения Anti-CCP и РФ IgM к моменту постановки диагноза **раннего РА** сравнялась и **достигла 70%**

## РФ и Anti-CCP как предикторы развития эрозивного поражения суставов при РА

Базальный уровень

РФ/ Anti-CCP				
СРБ (мг/л)	-/-	+/- или -/+	+/+	Кол/во эрозий
	47	69	78	≥4
≥35	24	44	56	1-4
	19	37	49	0
	22	42	54	≥4
10-35	9	20	29	1-4
	7	16	23	0
	16	32	43	≥4
<10	6	14	21	1-4
	6	11	17	0

Базальный уровень

Риск развития эрозивного поражения суставов (%)



## Anti-CCP

- Положительные результаты обнаружения Anti-CCP в сыворотке крови служат диагностическим критерием РА
- 
- Серопозитивность по Anti-CCP является прогностическим маркером тяжелого эрозивного поражения суставов при РА
  - Обнаружение Anti-CCP в сыворотке крови служит предиктором развития РА у здоровых лиц и у пациентов с ранним недифференцированным артритом
  - Тестирование Anti-CCP позволяет прогнозировать эффективность терапии ГИБП у больных РА.
  - *Данные систематического обзора, метаанализа, классификационных критериев РА ACR 1987 г. и ACR/EULAR 2010*
  - *Поддержано заключением экспертного совета МЗ РФ по ревматологии (сент. 2012)*

## Оценка кратности определения Anti-CCP

- На поздней стадии РА исследование Anti-CCP нецелесообразно. У серонегативных по Anti-CCP пациентов рекомендуемая кратность определения Anti-CCP на ранней стадии РА составляет 1 раз в 6 месяцев, на развернутой стадии – однократно.
- У Anti-CCP - низко позитивных больных исследование Anti-CCP на ранней стадии РА следует проводить 1 раз в 3-6 месяцев, на развернутой стадии – 1 раз в год. При высокой позитивности по Anti-CCP на ранней и развернутой стадиях РА рекомендуется однократное исследование Anti-CCP.
- **Поддержано заключением экспертного совета МЗ РФ по ревматологии (сент. 2012)**

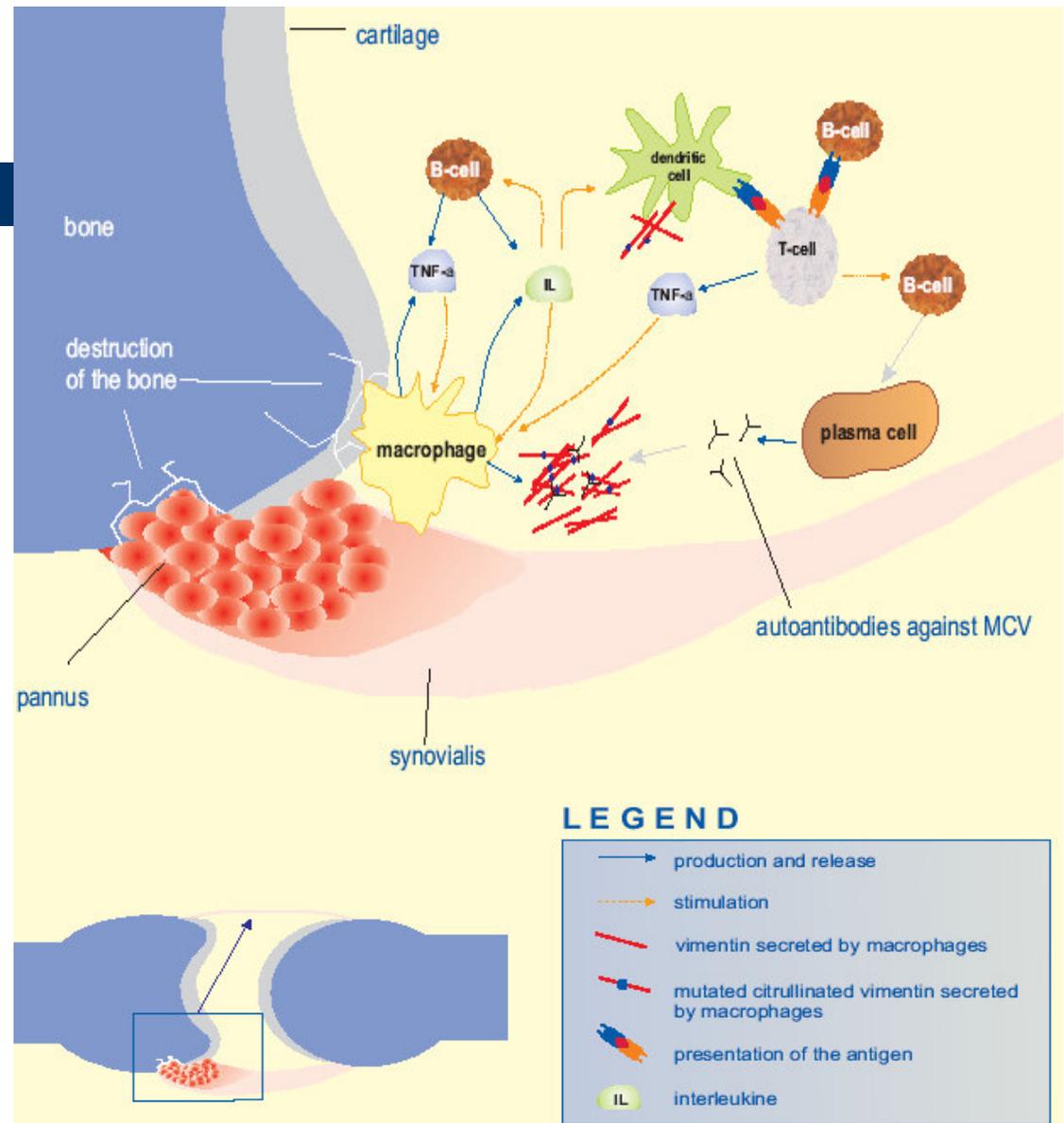
## АТ к модифицированному цитруллинированному виментину (Anti- MCV)

Виментин – белок цитоскелета различных типов клеток, таких как клетки мезенхимы и эндотелия, фибробласты, остециты. Присутствует в синовиальной жидкости

При воспалении виментин цитруллинируется

Высокие конц. MCV находят в моноцитах и активированных макрофагах, однако его внеклеточная концентрация невысока

- Виментин - естественный белок с большим числом эпитопов:
- В то время как ССР имеет только 1 или 2 возможных для детекции эпитопов, виментин имеет до 45 возможных доменов, которые могут цитруллинироваться



	<b>Анти-МСУ</b>	<b>Анти-ССР</b>	<b>IgM РФ</b>
<b>Чувствительность</b>	<b>83%</b>	<b>70%</b>	<b>67%</b>
<b>Специфичность</b>	<b>78%</b>	<b>85%</b>	<b>78%</b>

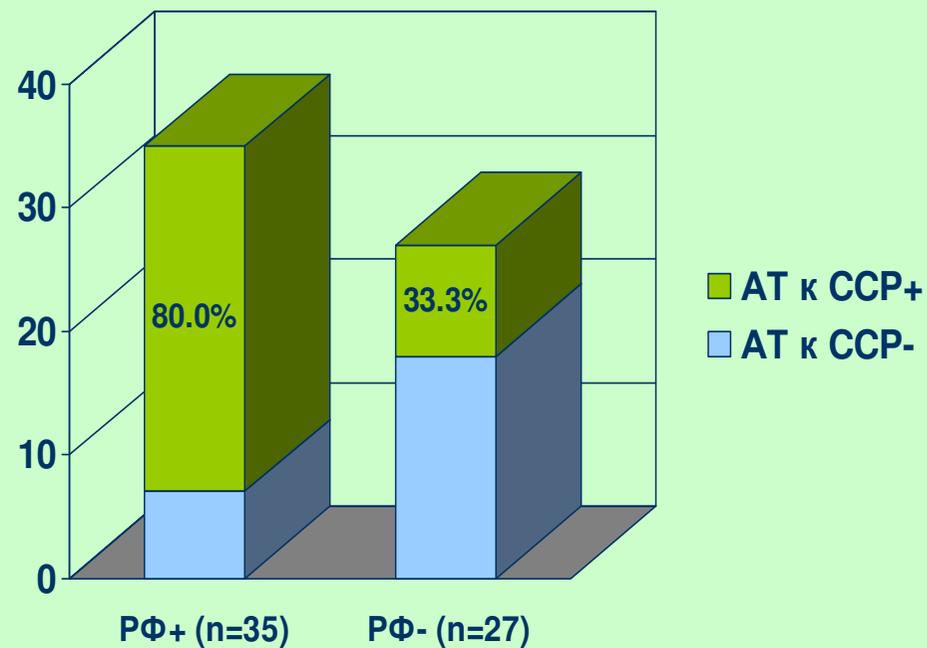
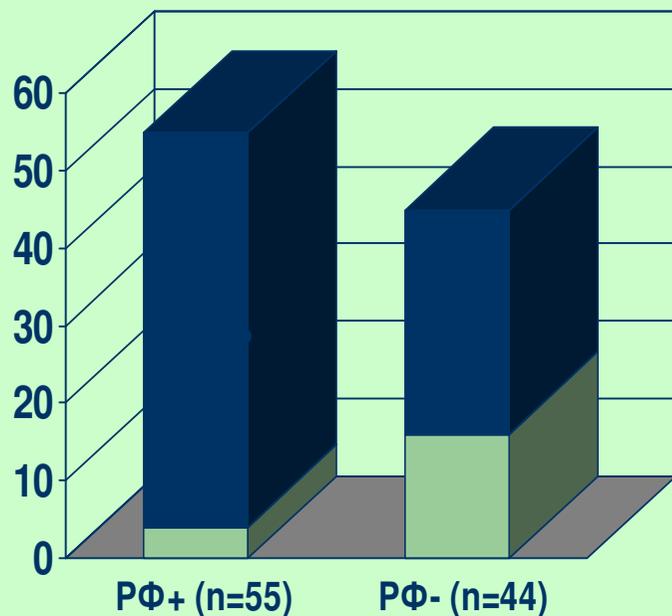
- Обследовано 993 Больных РА, против контрольной группы условно здоровых и пациентов с другими аутоиммунными заболеваниями
- Институт Ревматологии 2012 г.

# Сравнение анти-CCP и анти-MCV

больница Моники: Москалец О.В. к.м.н., ведущий н.сотр.  
Коновалова Н.Н. врач-ревматолог

## Серопозитивный и серонегативный РА\*

■ AT к MCV+  
■ AT к MCV-



\* - Ревматоидный артрит

ГРУППА КОМПАНИЙ

**BCM**

БИОХИММАК

# Преимущества Anti-МСV

- Anti-МСV превосходит по прогностической значимости даже сочетание двух тестов:  
Anti-ССР и Тест на ревматоидный фактор
- По титру Anti-МСV антител можно судить о стадии развития РА (Anti-ССР не позволяет должной мере стратифицировать степень заболевания):
- Anti-МСV:  $327,7 \pm 572,9$  (неострая форма РА),  
 $1184,0 \pm 1177,0$  (острая форма РА),
- Anti-ССР:  $330,7 \pm 571,0$  (неострая форма РА)  
 $507,2 \pm 650,4$  (острая форма)

# Anti-MCV

- Положительные результаты определения Anti-MCV в сыворотке крови служат дополнительным диагностическим маркером РА при отрицательных результатах определения IgM РФ и Анти-ССР в сыворотке
- 
- Anti-MCV являются полезным маркером для прогнозирования тяжелого эрозивного поражения суставов у больных РА
  - Повышение уровня Anti-MCV в большей степени ассоциируется с клинико-лабораторными показателями воспалительной активности РА, чем Анти-ССР
  - *Поддержано заключением экспертного совета МЗ РФ по ревматологии (сент. 2012)*

## Оценка кратности определения Anti-MCV

- На поздней стадии РА исследование Anti-MCV нецелесообразно. У серонегативных по Anti-CCP пациентов рекомендуемая кратность определения Anti-MCV на ранней стадии РА составляет 1 раз в 6 месяцев, на развернутой стадии – однократно.
- У низко/высоко позитивных больных по Anti-MCV исследование Anti-MCV на ранней стадии РА следует проводить 1 раз в 3-6 месяцев, на развернутой стадии – 1 раз в 6 месяцев – 1 год
- *Поддержано заключением экспертного совета МЗ РФ по ревматологии (сент. 2012)*

## Антитела к цитрулинированным белкам/пептидам и ревматоидные факторы – две различные системы аутоантител

Результаты определения уровней Anti-CCP и IgM РФ в 22427 образцах сывороток **18658** пациентов сети ревматологических клиник Института Jan Van Breemen (г.Амстердам, Нидерланды).

Anti-CCP

Показатель	Anti-CCP	IgM РФ
<b>Сероконверсия</b>	-	+
Увеличение частоты серопозитивных результатов с ВОЗРАСТОМ		
РА	-	-
Здоровые лица	-	+
<b>Связь с маркерами воспаления (СОЭ, СРБ)</b>	-	+

Ursum J., Bos W.H., van de Stadt R.J. et al. Different properties of anti-CCP and IgM-RF derived from a large dataset: further evidence of two distinct autoantibody systems. *Arthritis Res. Ther.*, 2009, 11, R75

Valesini G., Alessandri C. Anticitrullinated protein/peptide antibodies and rheumatoid factors: two distinct autoantibody systems. *Arthritis Research & Therapy*, 2009, 11, 125

## РА с наличием антител к цитруллинированным протеинам (АЦП) и РА с отсутствием (АЦП) - два различных класса заболевания с различным молекулярным патогенезом и различными подходами к терапии

признак	РА АЦП +	РА АЦП -
Появление АЦП задолго до первых симптомов РА	+++	+
		+
Развитие тяжелого эрозивного поражения суставов	+++	+
Увеличение общей летальности	++	+
Развитие сердечно-сосудистых осложнений	+++	+
Образование инфильтратов в синовиальной ткани (эктопический лимфонеогенез с образованием зародышевых центров)	+++	+
Ассоциация с генетическими факторами риска (HLA-DRB1, RTPN22, PAD14, TRAF1-C5, STAT4, OLIG3-AIP3)	+++	-
Ассоциация с наличием внешних факторов риска (курение в комбинации с носительством HLADRB1)	++	-
Ответ на инфликсимабом	+	++
Ответ на терапию ритуксимабом	++	+
Ответ на терапию метотрексатом	++	+

## Критерии классификации РА, установленные в 2010 Американской коллегией Ревматизма ACR/EULAR 2010 г.

Для того чтобы поставить диагноз РА по новым критериям, врач должен выполнить три условия.

- определить наличие у больного хотя бы одного припухшего сустава по данным физикального осмотра.
- исключить другие заболевания, которые могут сопровождаться воспалительными изменениями суставов.
- набрать **как минимум 6 баллов** из 10 возможных по 4 позициям, описывающим особенности картины болезни у данного пациента

## Классификационные критерии РА – 2010 (на смену критериев 1987)

<b>РА подтвержден если сумма коэффициентов факторов РА = 6 - 10</b>	<b>Выведенный коэффициент для факторов РА</b>
<b>Поражения суставов</b>	
1 большой	0
2 – 10 больших суставов	1
1 – 3 малых суставов	2
4 – 10 малых суставов	3
> 10, включая как минимум 1 малый	5
<b>Серологические тесты</b>	
Негативные результаты тестов: РФ и АЦПА	0
Слабоположительный результат тестов: РФ или АЦПА	2
Высокоположительный результат тестов: РФ или АЦПА	3
<b>Острофазная реакция</b>	
Результаты тестов: СРБ и СОЭ (норма)	0
Результаты тестов: СРБ или СОЭ (выше нормы)	1
<b>Продолжительность симптомов</b>	
< 6 недель	0
> 6 недель	1

**Критерии РА – 1987 г. имели недостаток – они применялись для клинически выраженного РА, не учитывая ранний РА.**

**В «Критериях-2010» значительный вклад вносят показания серологических тестов 3 + 1.**

**Обследовано 3 115 человек с ранним РА**

# Слабо- и высокоположительные по лабораторным критериям группы

- В «Критерии-2010» внесен показатель АЦПА (АТ к семейству цитруллинированных белков), хотя для данной статистики был использован только Anti-ССР.
- Коэффициенты ориентировочные могут меняться в ходе наработки больших статистических данных, это отмечено в «Критериях-2010».

	<b>Слабоположительный результат тестов: РФ или АЦПА</b>	<b>Превосходят по значению контрольную (отрицательную по РА) группу, но <math>\leq 3</math></b>
<b>Поражения</b>	<b>Высокоположительный результат тестов: РФ или АЦПА</b>	<b>Превосходят по значению контрольную группу (отрицательную по РА) <math>&gt; 3</math></b>
1 боль		
2 – 10		
1 – 3 м		
4 – 10		
<b>Серологич</b>		
Негат		
	Слабоположительный результат тестов: РФ или АЦПА	<b>2</b>
	Высокоположительный результат тестов: РФ или АЦПА	<b>3</b>
<b>Острофазная реакция</b>		
Результаты тестов: СРБ и СОЭ (норма)		<b>0</b>
Результаты тестов: СРБ или СОЭ (выше нормы)		<b>1</b>
<b>Продолжительность симптомов</b>		
< 6 недель		<b>0</b>
> 6 недель		<b>1</b>

Ревматоидный артрит подтвержден, если сумма коэффициентов факторов РА  $\Sigma = 6 - 10$

## Примеры формулировки клинических диагнозов:

- Ревматоидный артрит серопозитивный (M05.8), развернутая стадия, активность II, эрозивный (рентгенологическая стадия II), с системными проявлениями (ревматоидные узелки), АЦЦП (-), ФК II.
- Ревматоидный артрит серонегативный (M06.0), ранняя стадия, активность III, неэрозивный (рентгенологическая стадия I), АЦЦП (+), ФК I.
- Вероятный ревматоидный артрит (M06.9), серонегативный, ранняя стадия, активность II, неэрозивный (рентгенологическая стадия I), АЦЦП (+), ФК I.

## Полуавтоматический анализатор BlueDiver для диагностики аутоиммунных заболеваний методом иммунодота (D-tek s.a.)

- Простая система сканирования тест-стрипов и автоматического расчета результатов
- Работает с картриджами с готовыми для использования реагентами, никаких шлангов, насосов, приготовления реагентов, разведения образцов и пр.
- Возможность одновременного анализа от 1 до 24 тест-стрипов, один протокол для всех анализов
- Время анализа – 90 минут
- Сканер штрих кодов проверяет правильность загрузки и сроки годности тест-стрипов и картриджей, что полностью исключает возможность ошибки



BlueDiver  
Instrument



## Полуавтоматический анализатор BlueDiver для диагностики аутоиммунных заболеваний методом иммунодота (D-tek s.a.)

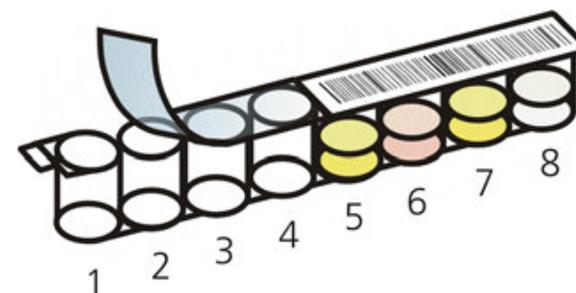
- **BlueDiver Combi** - гибкая система создания своих собственных тест-стрипов
- На сегодняшний день доступно до **50 различных биомаркеров**
- Возможность установки до **6 различных чипов в одном тест-стрипе**



Будет доступно с июня 2014

## Автоматический иммуноферментный анализатор Alegria (Orgentec)

- Принцип работы – 1 стрип на 1 показатель 1 сыворотки
- Полный набор реагентов в каждом стрипе
- Результат каждого теста оценивается по своему собственному контролю.
- Сканер штрих-кодов позволяют избежать технических ошибок регистрации образцов
- Возможность одновременного анализа от 1 до 30 стрипов
- Время анализа - 90 минут
- 120 тест-систем для диагностики аутоиммунных заболеваний и инфекций



# ALEGRIA

Теперь и для диагностики инфекций!

- Антитела к капсидному антигену вируса Эпштейна-Барр
- Антитела к ядерному антигену 1 вируса Эпштейна-Барр
- Антитела к Zebra-антигену вируса Эпштейна-Барр
- Антитела к вирусу паротита
- Антитела к вирусу кори
- Антитела к вирусу простого герпеса I типа
- Антитела к вирусу простого герпеса II типа
- Антитела к вирусу простого герпеса I и II типа

# Спасибо за внимание!

