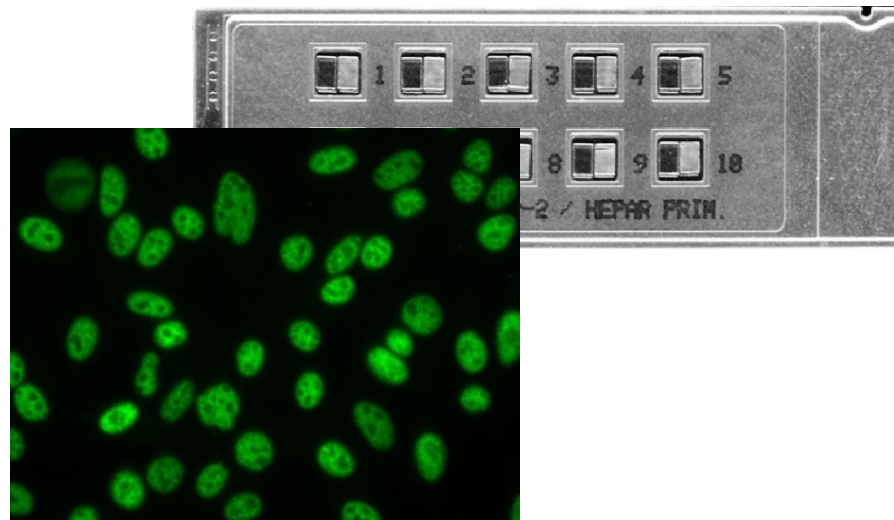


Серологические маркеры аутоиммунных заболеваний: методы детекции, клиническая значимость, экономические аспекты



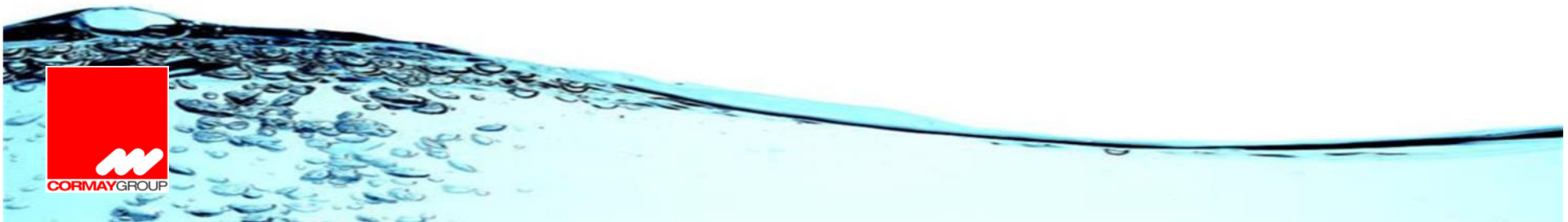
Скрипник Виктор Викторович

Самара, 2017



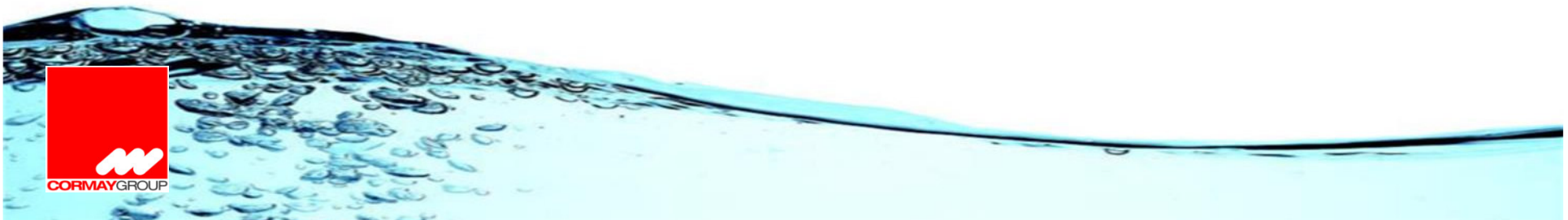
Аутоиммунные заболевания (АИЗ)

АИЗ – разнородная по клиническим проявлениям группа заболеваний, характеризующаяся самоподдерживающимся иммунным ответом на собственные антигены организма за счет образования аутоантител и/или пролиферацией аутоагрессивных клонов Т-клеток



Серологические маркеры АИЗ

Аутоантитела – основная группа серологических маркеров АИЗ, которые являются отражением пролиферации и функциональной активности аутоагрессивных клонов В-клеток (плазматических клеток)



Актуальность проблемы АИЗ

Частота встречаемости в популяции составляет до 2%

Преимущественно поражают население трудоспособного возраста, чаще женщин

Характеризуются тяжелым, прогрессирующим течением; приводят к ранней инвалидизации и гибели больных



(Насонов Е.Л., 2003)

Причины развития АИЗ

Попадание в кровотоки секвестрированных («забарьерных») антигенов

Экспрессия новых детерминант

Отдельные гаплотипы генов кластера HLA

Молекулярная мимикрия

Поликлональная активация В-клеток

Основные характеристики аутоантител

- 1. Относятся к классам IgA, IgM, IgG. Клиническая значимость антител разных классов неодинакова при различных нозологиях**
- 2. Количество аутоантител не всегда коррелирует с тяжестью заболевания и/или его прогнозом**
- 3. В низких концентрациях присутствуют у здоровых лиц**



(Лапин С.В. с соавт., 2010)

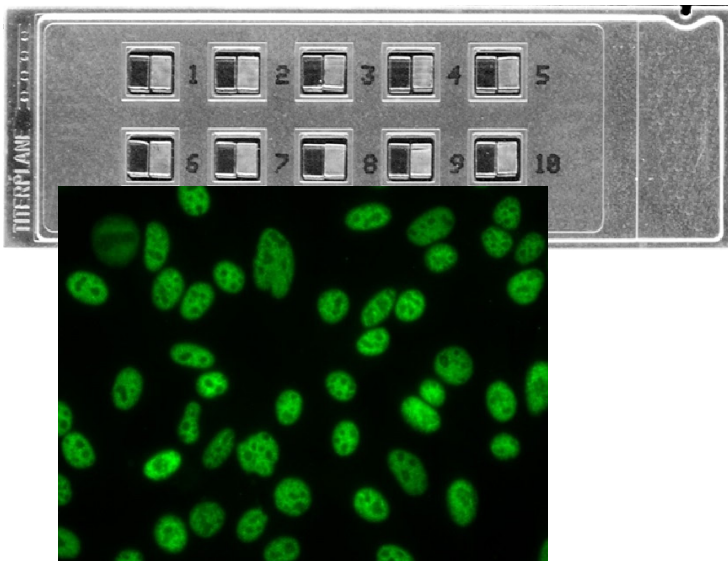
Задачи определения аутоантител

- 1. Скриннинговые исследования**
- 2. Дифференциальная диагностика**
- 3. Динамическое наблюдение**
- 4. Оценка эффективности лечения**



Методы детекции аутоантител

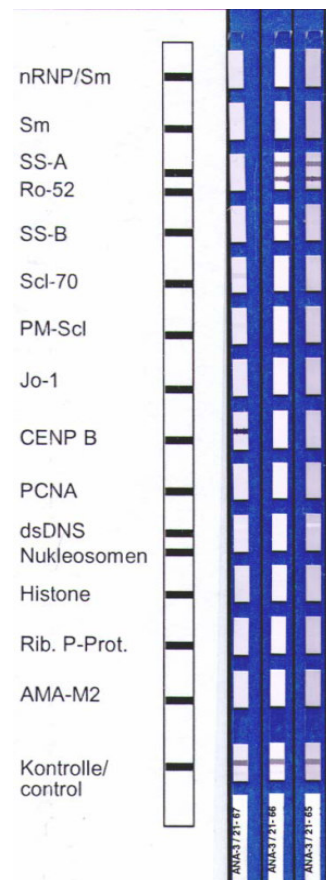
Непрямая
иммунофлуоресценция (ИРИФ)



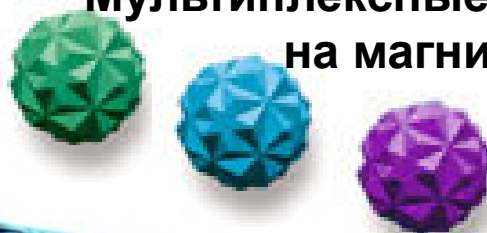
Иммуноферментный
Анализ (ИФА)



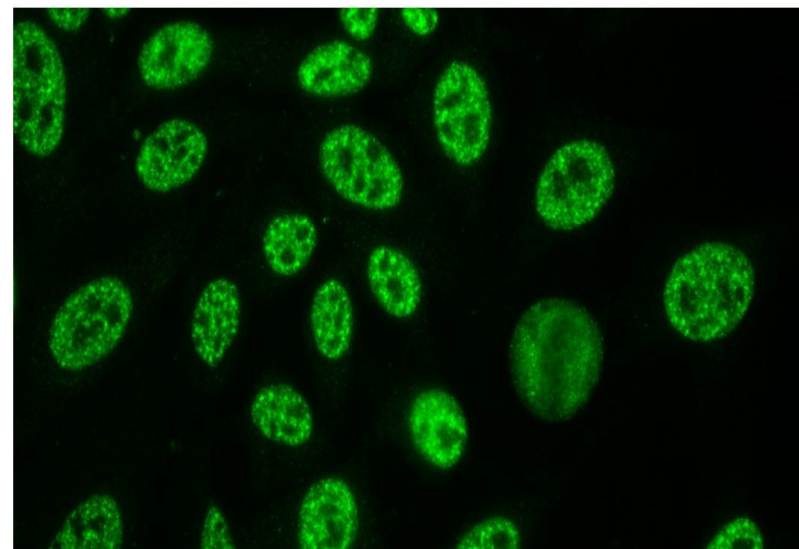
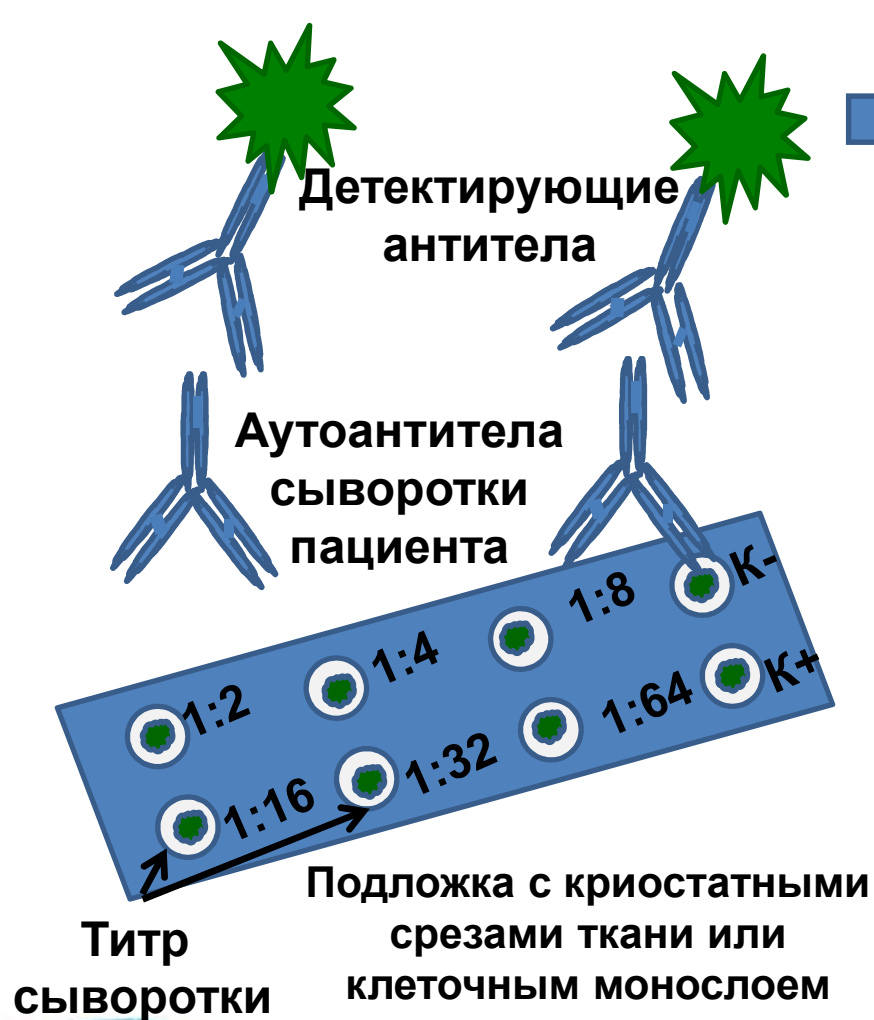
Лайн-блот



Мультиплексные тест-системы
на магнитных частицах

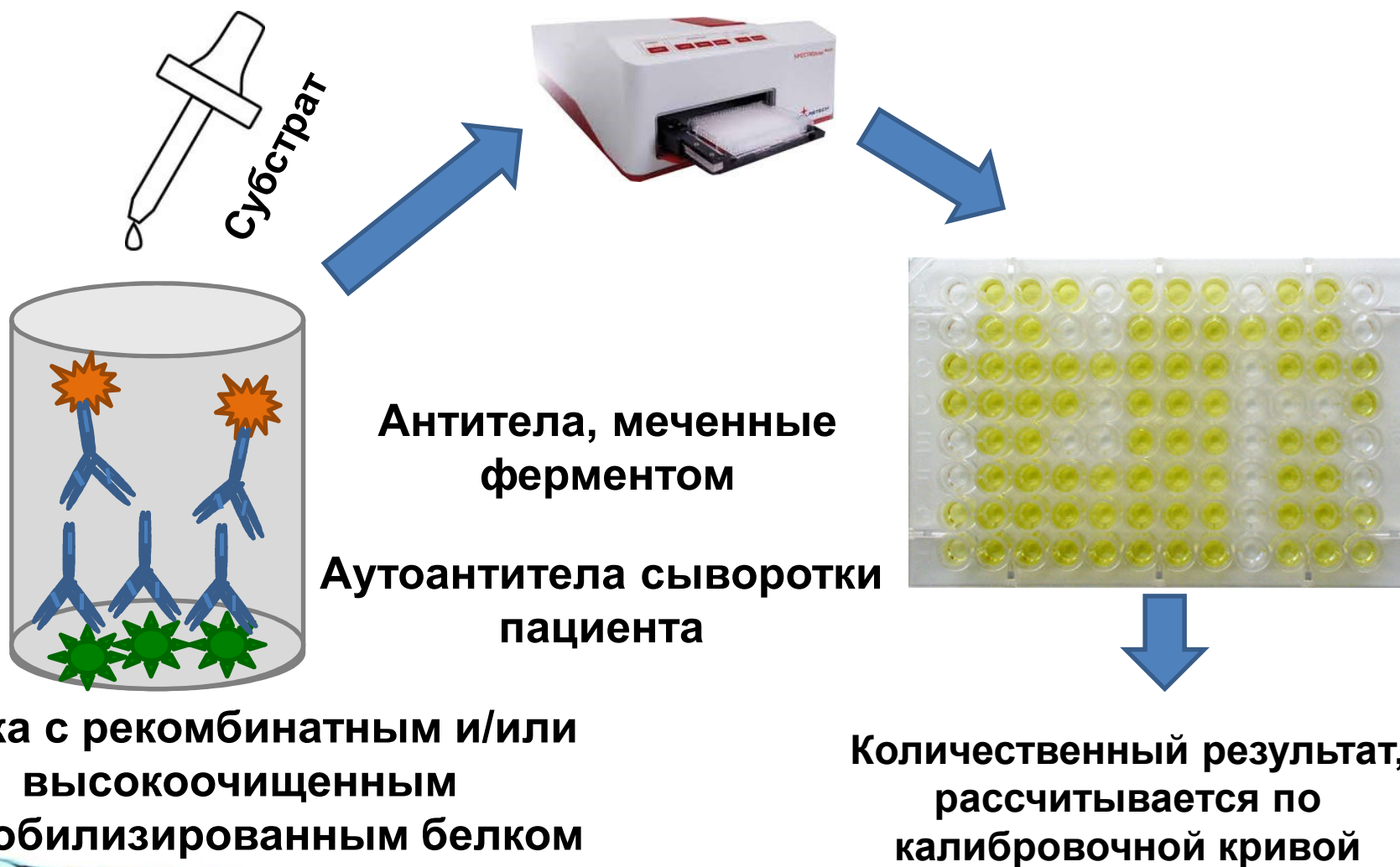


Непрямая иммунофлуоресценция



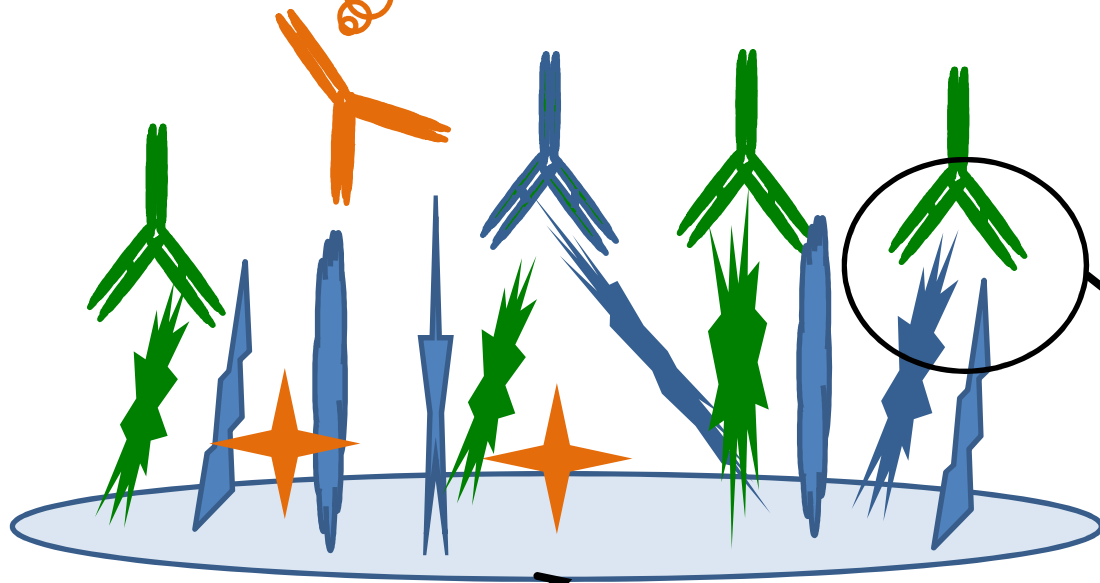
Результат исследования – окрашивание определенных клеточных органелл или структур ткани

Иммуноферментный анализ



Непрямая иммунофлуоресценция

Где же мой антиген???



Экранирование антигена

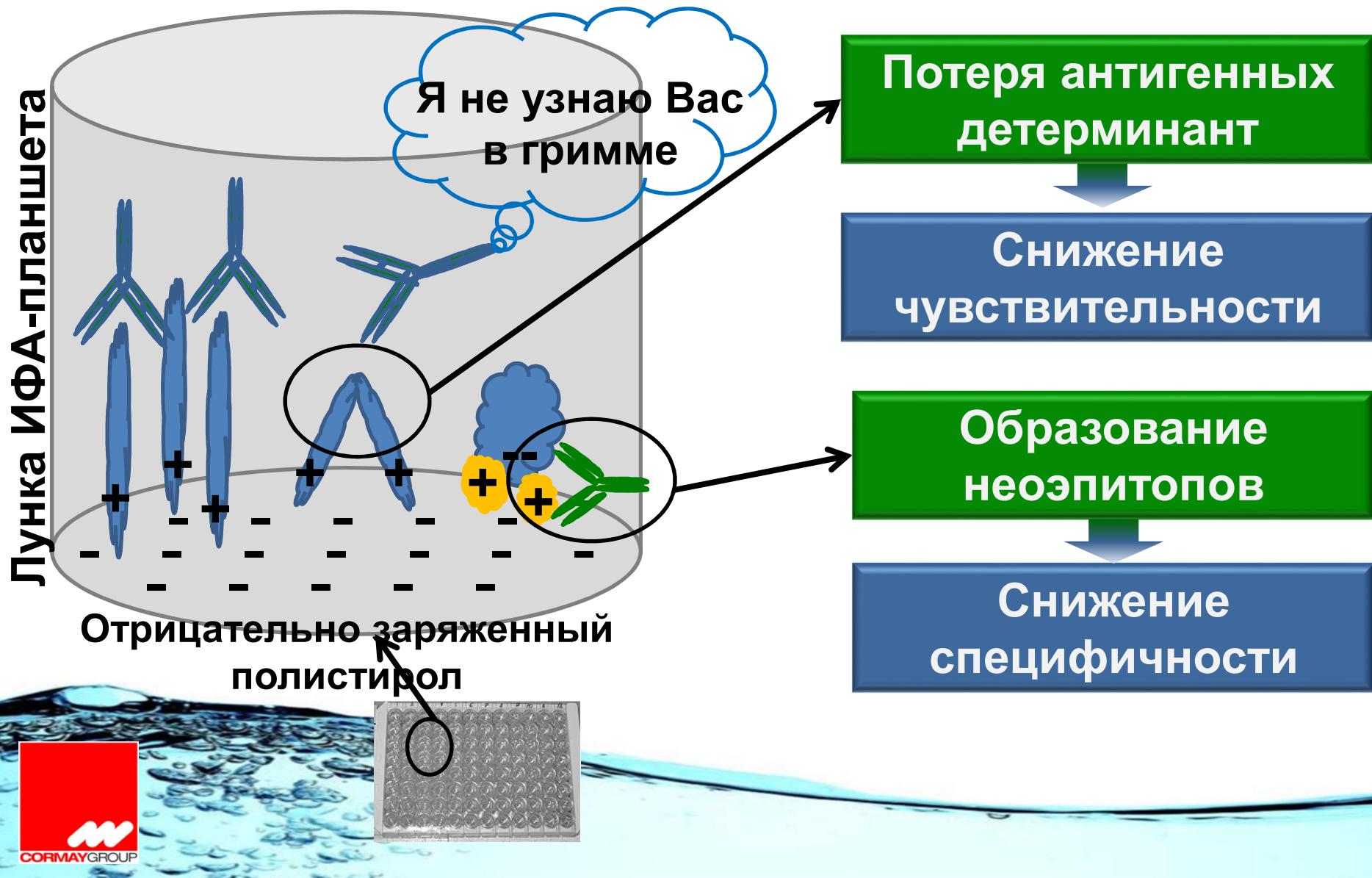
Снижение чувствительности

Перекрестные реакции

Снижение специфичности

Обычно используются ксеноантигены или аллоантигены

Иммуноферментный анализ (ИФА)



Методы детекции аутоантител

Параметр	нРИФ	ИФА	Лайн-блот
Антигенный субстрат	Срез ткани или культура клеток	Очищенный или рекомбинантный антиген	
Количество антигенов	Много	1	До 20
Артефакты	Экранирование Перекрест	Потеря детерминант	
Повреждение детерминант	Да		
Образование неоэпитопов	Нет	Редко	
Идентификация антигена	Нет	Да	

Методы детекции аутоантител

Параметр	нРИФ	ИФА	Лайн-блот
Учет результата	Визуальный	Аппаратный	
Тип результата	П/количеств.	Количеств.	П/количеств.
Автоматизация	Нет	Да	
Чувствительность метода	0,05 нг	0,05 нг	0,5 нг
Себестоимость реагентов (АНА)*	210 – 295 Р (скриннинг)	182-334 Р (скриннинг)	1045 – 1765 Р (9 антигенов)

* По данным zakupki.gov.ru



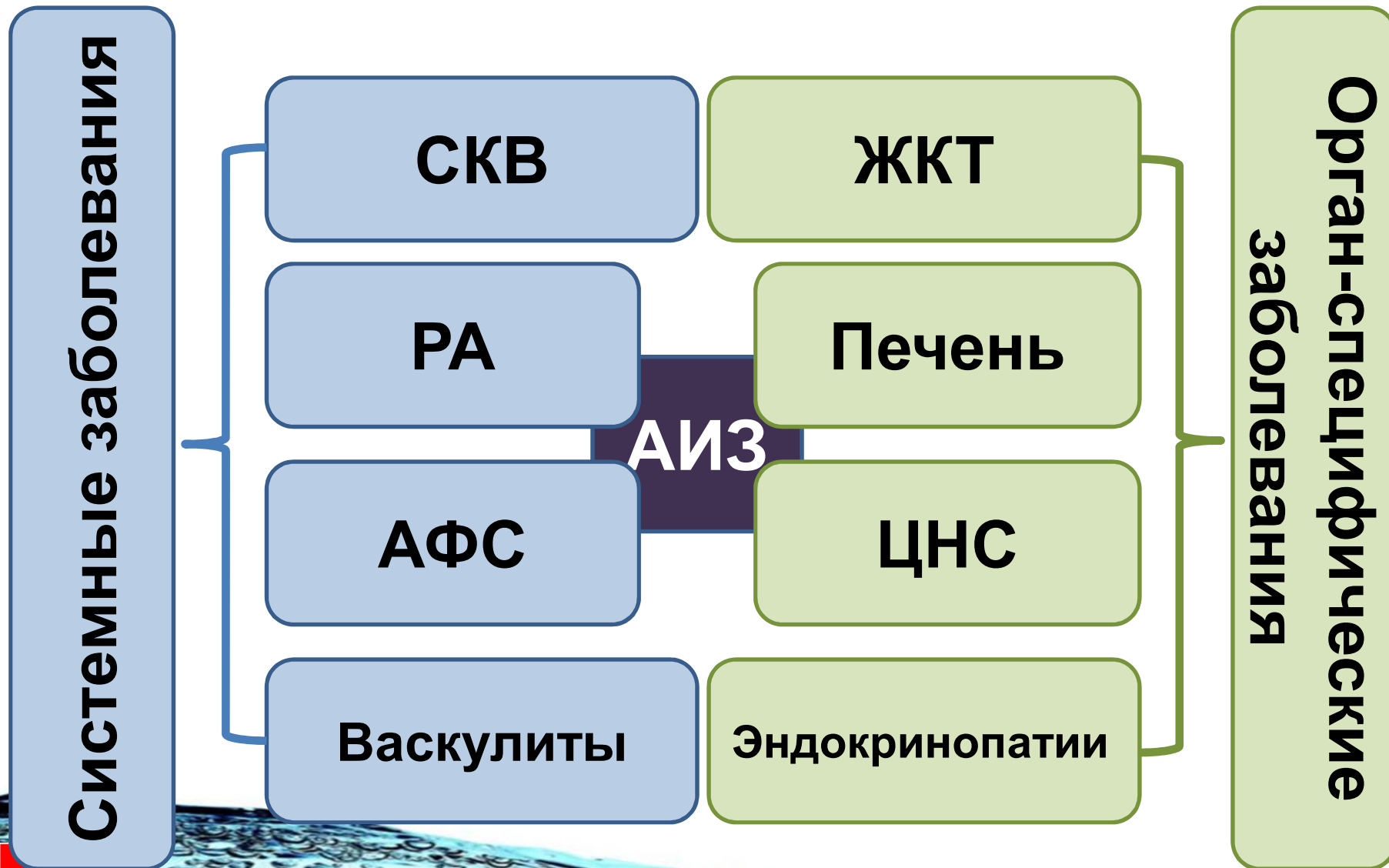
Переход от метода нРИФ к ИФА

нРИФ	ИФА
Антинуклерный фактор (ANA)	ДНК; гистоны; нуклеосомы; Sm; RNP; SS-A; SS-B; Scl-70 и др.
Антиперинуклеарный фактор	Циклический цитруллированный пептид (АССР); модифицированный виментин
Антиэпителиальные А/т	Нет
Антитела к цитоплазме нейтрофилов (ANCA)	Протеиназа-3 (PR-3), миелопероксидаза (MPO)
А/т к эндомизию	Тканевая трансглутаминаза (ткТГ)
Микросомальный антиген	Тиреопероксидаза (ТПО)

Маркеры основных АИЗ



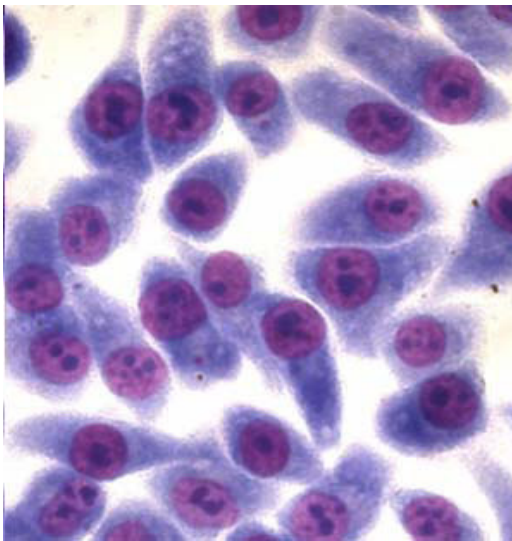
Основные нозологии / мишени при АИЗ



Антинуклеарный фактор (АНФ)

АНФ – группа аутоантител, состоящая из более чем 100 различных антител

Основной метод детекции - нРИФ



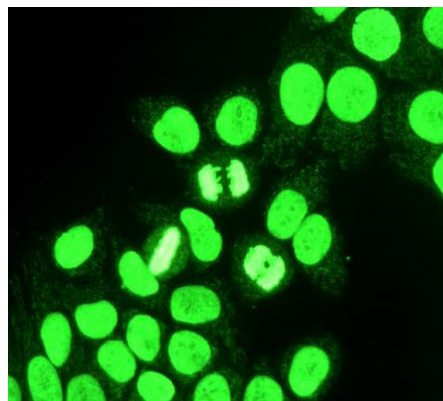
Нер-2 – основной субстрат нРИФ

- Результат теста выражается в титрах – оценка аффинности антител
- Для различных субстратов величина пограничного титра неодинаковая
- Для субстрата Нер-2 положительными считаются титры более 1:40

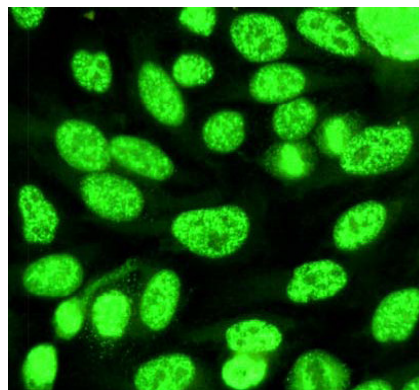
Важно учитывать тип свечения ядра

АНФ: метод нРИФ, типы окрашивания

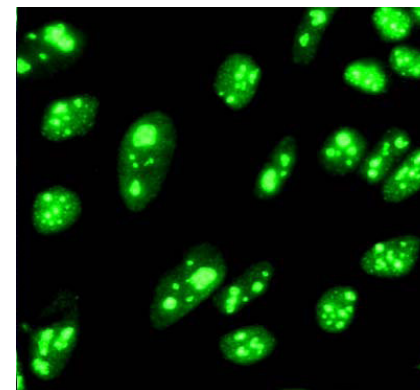
Гомогенный



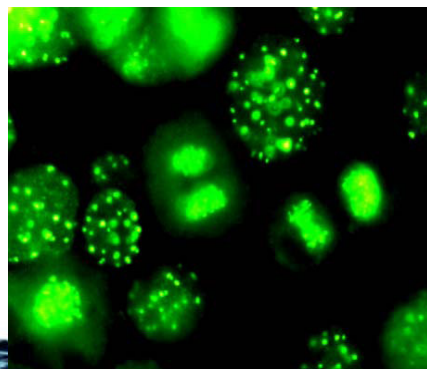
Гранулярный



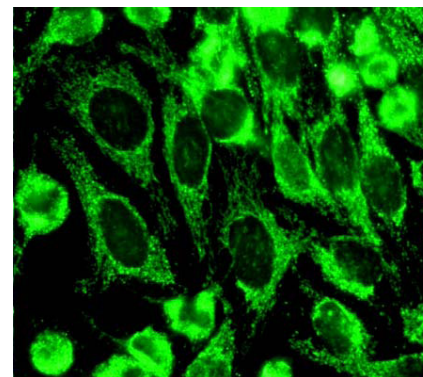
Ядрышковый



Центромерный



Цитоплазматический



Системная красная волчанка (СКВ)

СКВ – хроническое аутоиммунное заболевание соединительной ткани неизвестной этиологии, характеризующееся гиперпродукцией аутоантител, вызывающих воспалительное поражение органов

- Серозит
- Изъязвление ротоглотки
- Артрит более 2-х суставов
- Фоточувствительность
- Дискоидные поражения кожи
- Сыпь в виде бабочки
- Гематологические нарушения
- Поражение почек
- Поражение ЦНС

11 диагностических критериев СКВ

11. АНФ

10. dsDNA, Sm, LE-клетки



Серологические маркеры СКВ

Антитела	Чувствит.	Специфичн.	Тип свечения в нРИФ
АНФ (ANA)	~98%	<40%	Разные
dsDNA, IgG	~70%	~75%	Гомоген.
Гистоны, IgG	~70%	~50%	Гомоген.
Нуклесомы, IgG	~75%	>95%	Гомоген.
Sm, IgG	~30%	>95%	Грануляр.
SS-A, IgG	~30%	~50%	Грануляр.



(Di. S. Sal, 2014; Лапин С.В., 2010)

Алгоритм лабораторной диагностики СКВ

АНФ Нер-2 > 1:40

АНФ Нер-2 ≤ 1:40

или

АНФ / ANA

или

ANA: положительно

ANA: отрицательно

А\т к dsDNA,
нуклеосомам

Отрицательно

Диагноз СКВ
маловероятен

Положительно

Регрессия
симптоматики

Сохранение
симптоматики

Вероятность СКВ
более 90%

Динамическое наблюдение,
диагностический поиск

Синдром Шегрена (СШ)

СШ – аутоиммунное хроническое воспалительное заболевание экзокринных желез, с преимущественным поражением слезных и слюнных желез.

<i>Антитела</i>	<i>Чувствит.</i>	<i>Специфичн.</i>	<i>Тип свечения в нРИФ</i>
ANA	~60%	~20%	Разные
SS-A/Ro, IgG	~60%	~60%	Грануляр.
SS-B/La, IgG	~50%	~90%	Грануляр.



CORIMAY GROUP

(Venables P.J., 1989)

Ревматоидный артрит (РА)

РА – аутоиммунное хроническое прогрессирующее воспалительное заболевание, характеризующееся симметричным эрозивным артритом периферических суставов и воспалительным поражением внутренних органов

7 диагностических критериев РА

• Утренняя скованность

• Артрит суставов кисти

• Активный артрит более 3-х суставов

• Симметричное поражение суставов

• Периартикулярное поражение кости

5. РФ

• Ревматоидные узелки



Серологические маркеры РА

Антитела	Чувствит.	Специфичн.	Ранний артрит (Чувст.; специф.)
ANA	~20%	~30%	<20%; <20%
РФ, IgM	~80%	~70%	<20%; <20%
АССР, IgG	~80%	>90%	65%; 95%
АМСV, IgG	~75%	>90%	78%; 88%
РА-33, IgG	~75%	>90%	62%; 82%



(Yousefghahari B. et al., 2013; Lashkari M. et al., 2014;
Van Boekel M. et al., 2001; Лапин С.В. с соавт., 2010)

Антифосфолипидный синдром (АФС)

АФС – аутоиммунное хроническое прогрессирующее заболевание, характеризующееся рецидивирующими тромбозами и привычным невынашиванием беременности

Клинические критерии

1. Сосудистый тромбоз
2. Невынашивание беременности

Лабораторные критерии

1. Волчаночный антикоагулянт
2. Антикардиолипидовые А/т
3. А/т к β 2-гликопротеину



(Venables P.J., 1989)

Серологические маркеры АФС

<i>Антитела</i>	<i>Чувствит.</i>	<i>Специфичн.</i>
dsDNA	~30%	~30%
Волчаночный антикоагулянт	~65%	~80%
Кардиолипин, IgM + IgG	~70%	~50%
β-2 гликопротеин, IgM + IgG	~85%	~50%



(Stephen M., 2007)

Аутоиммунные заболевания ЖКТ

Гастрит типа А

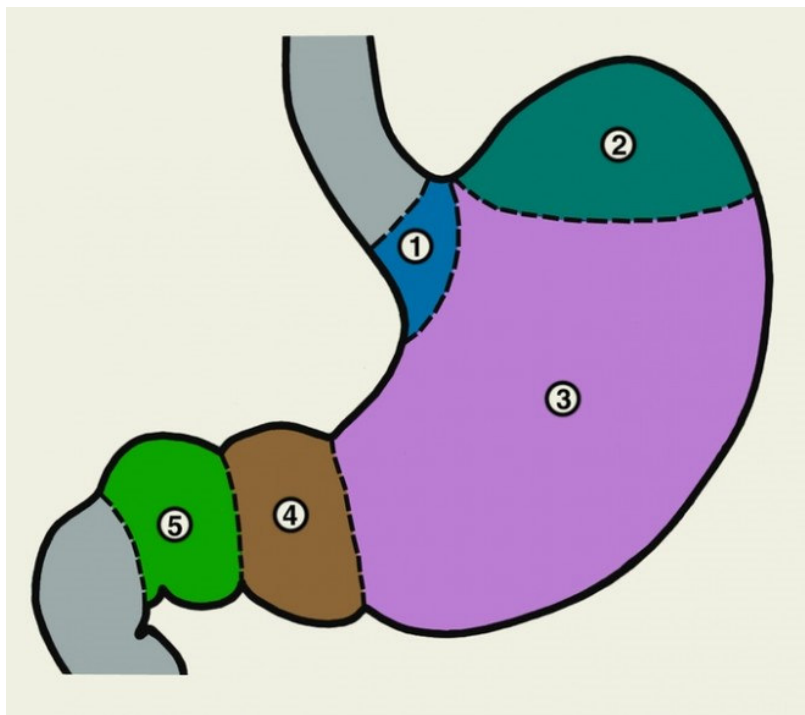
Целиакия

Болезнь Крона (БК)

Неспецифический язвенный колит (НЯК)

Аутоиммунный гепатит (АИГ)

Гастрит типа А и пернициозная анемия



1 – кардия

2 – дно

3 - тело

4 - антрум

5 - привратник

Гастрит типа А – заболевание, характеризующееся воспалением фундального отдела желудка, вызванное антителами к париетальным клеткам

По разным данным, встречаемость составляет от 5 до 15% среди пациентов с гастритом

Прогрессирование заболевания приводит к развитию пернициозной анемии, вследствие нарушения всасывания витамина В₁₂

Встречается у 20-30% больных с эндокринопатиями

Серологические маркеры гастрита типа А и пернициозной анемии

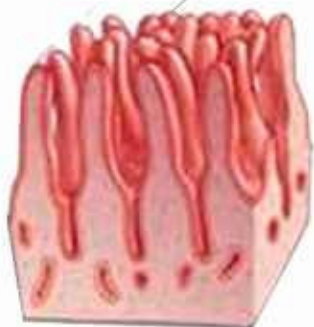
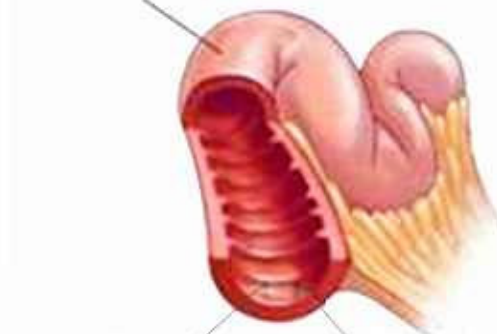
Антитела	Чувствит.	Специфичн.
Париетальные клетки	~75%	~60%
Внутренний фактор, IgG	>45%	>95%



Целиакия (глютеновая энтеропатия)

Целиакия – иммуноопосредованная **непереносимость α-глиадина** – основного белка клейковины

Тонкая кишка



Нормальная тонкая кишка



Целиакия

- ✓ Генетически детерминированное заболевание
- ✓ Встречаемость составляет от 1:300 до 1:6500 населения
- ✓ Метод лабораторной диагностики: серологические маркеры и гистологическое исследование

1. Типичная форма
2. Латентная форма
3. Рефрактерная форма
4. Атипичная форма
5. Потенциальная форма

Серологические маркеры целиакии

<i>Антитела</i>	<i>Чувствит.</i>	<i>Специфичн.</i>
Эндомизий	~90%	~99%
Глиадин, IgA	~50%	~75%
Тканевая трансглутаминаза, IgA	~90%	~95%
Деамидированный глиадин, IgA	~85%	~95%



Определение аутоантител класса IgG оправдано только у лиц с селективной IgA-агаммаглобулинемией



Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК)

**Неспецифический
язвенный колит**

Воспалительное заболевание стенки кишки



Типичная локализация:
толстая кишка

Поражение
слизистой оболочки

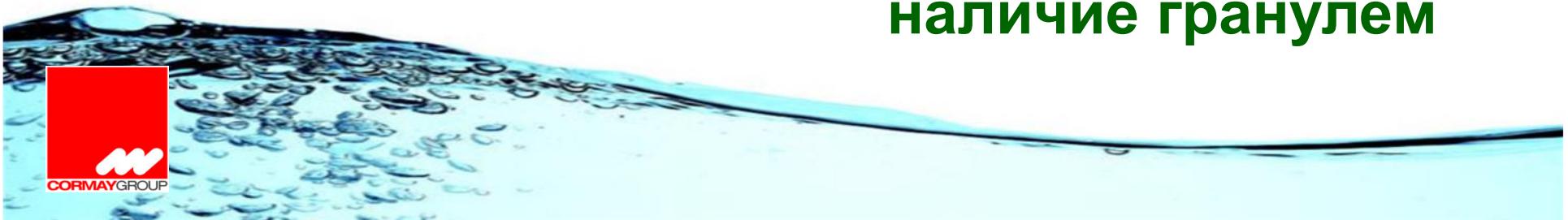
Болезнь Крона



Типичная локализация:
подвздошная кишка

Трансмуральное
поражение стенки кишки

Гистология:
наличие гранулем



Лабораторные маркеры ВЗК

Неспецифический язвенный колит

1. Антитела к бокаловидным клеткам

- Встречаются у 50-60% больных
- Вероятный антиген – муцин

2. Антитела к цитоплазме нейтрофилов (ANCA)

- Встречаются у 20-80% больных
- Отражают активность системного поражения и коррелируют с тяжестью внекишечных проявлений
- Отрицательный прогностический признак при терапии 5-аминосалициловой кислоты

Болезнь Крона

1. Антитела к *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA)

- Встречаются у 30-75% больных
- Метод детекции – ИФА
- Коррелируют с тяжестью клинической картины



Кальпротектин – маркер воспаления стенки кишки

Повышенный уровень кальпротекина в кале наблюдается при:

- ✓ Воспалительных заболеваниях кишечника
- ✓ Целиакии
- ✓ Энтеритах и энтероколитах
- ✓ Поражении ЖКТ при муковисцидозе
- ✓ Опухолях и др.



*Повышенный уровень кальпротекина не дает возможности провести дифференциальный диагноз, но нормальные значения маркера в **99%** случаев свидетельствуют о функциональном заболевании кишечника*



Экономические аспекты определения маркеров аутоиммунных заболеваний

- 1. Тесты относятся к минорной группе**
- 2. Трудоемки в исполнении**
- 3. Дорогостоящи**
- 4. Выдача результата на 5-14 день после взятия крови**



- ✓ Низкая эффективность оказания медицинской помощи
 - ✓ Длительные сроки госпитализации
- ✓ Одномоментное определение маркеров, что приводит к высокой финансовой нагрузке на пациента или ЛПУ



Оптимизация работы лаборатории

В настоящее время активно внедряются в лабораторную практику «стриповые» ИФА-анализаторы:

- 1. Полностью автоматизированный метод**
- 2. Выполнение тестов в день взятия биоматериала без увеличения себестоимости теста**
- 3. Минимальные трудозатраты врача**
- 4. Широкая панель тестов: маркеры аутоиммунных заболеваний, кальпротектин, маркеры инфекционных заболеваний**
- 5. Возможность последовательного выполнения тестов**

✓ Высокая эффективность оказания медицинской помощи

ChorusTRIO - автоматический «стриповый» ИФА-анализатор

PIESSE
PIESSE

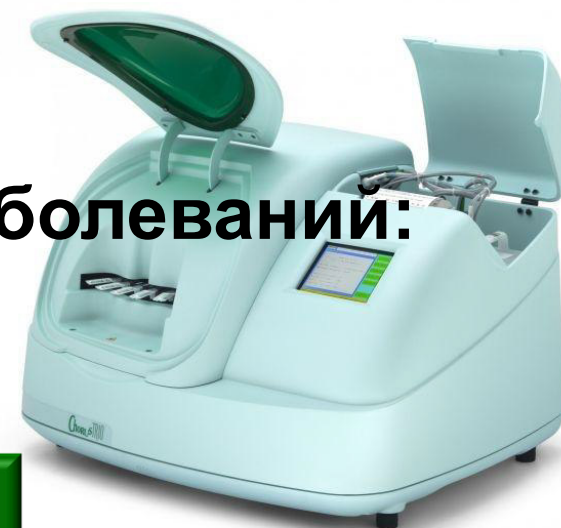
INNOVATIVE CLINICAL DIAGNOSTIC SYSTEMS

1. Диагностика аутоиммунных заболеваний:

✓ Более 30 тестов

2. Диагностика инфекционных заболеваний:

✓ Более 50 тестов



Анализатор позволяет провести определение маркеров аутоиммунных заболеваний и в течение 2-х часов после взятия биоматериала



Заключение

- 1. ИФА – метод выбора в лабораторной практике для детекции аутоантител**
- 2. Диагностическая значимость маркеров АИЗ неодинакова для различных нозологических форм, тем не менее, определение аутоантител – важный диагностический инструмент в современной практике**
- 3. Разработка автоматизированных методов количественного определения маркеров АИЗ позволят внедрять в практику методы оценки прогноза заболевания и диагностики рецидива до развития клинических проявлений**
- 4. Использование современных «стриповых» ИФА-анализаторов позволяет активно внедрять в практику маркеры АИЗ, сокращая срок выполнения тестов с 7-14 дней до 1 дня, тем самым повышая привлекательность тестов для клиницистов**



Спасибо за внимание!

