

**РОССИЙСКАЯ АССОЦИАЦИЯ МЕДИЦИНСКОЙ
ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ**

**СОВРЕМЕННЫЕ СТАНДАРТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ
АНТИНУКЛЕАРНОГО ФАКТОРА ПРИ СИСТЕМНЫХ
АУТОИММУННЫХ РЕВМАТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ**

Методические рекомендации

Москва – 2023

УДК 616.002.77
ББК 55.5
С56



Учреждения-разработчики: государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Московский клинический научно-практический центр имени А. С. Логинова Департамента здравоохранения города Москвы» (ГБУЗ МКНЦ имени А. С. Логинова ДЗМ); ООО «Ревмоцентр»; ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ДПО «РМАНПО МЗ РФ»).

Авторы: Александрова Е. Н. — д.м.н., заведующая лабораторией клинической иммунологии ГБУЗ МКНЦ имени А. С. Логинова ДЗМ; Новиков А. А. — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии ГБУЗ МКНЦ имени А. С. Логинова ДЗМ; Лукина Г. В. — д.м.н., профессор, заведующая отделом ревматологии ГБУЗ МКНЦ имени А. С. Логинова ДЗМ; Клюквина Н. Г. — д.м.н., врач-ревматолог ООО «Ревмоцентр»; Васильев В. И. — д.м.н., профессор, врач-ревматолог ООО «Ревмоцентр»; Казаков С. П. — д.м.н., доцент, заведующий кафедрой медицинской биохимии и иммунопатологии Академического образовательного центра трансляционной и фундаментальной медицины ФГБОУ ДПО «РМАНПО МЗ РФ».

Рецензенты: Цвиренко С. В. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики и бактериологии ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации; Каратеев Д. Е. — д.м.н., заведующий отделением ревматологии, профессор кафедры терапии факультета усовершенствования врачей ГБУЗ МО МОНИКИ им. М. Ф. Владимирского, главный внештатный специалист ревматолог Министерства здравоохранения Московской области.

Методические рекомендации предназначены для использования в практической работе врачей клинической лабораторной диагностики, ревматологов, терапевтов, врачей общей практики и являются собственностью Российской ассоциации медицинской лабораторной диагностики, а также не подлежат тиражированию и распространению без соответствующего разрешения. Авторы несут ответственность за предоставленные данные в методических рекомендациях.

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ	6
ВВЕДЕНИЕ	8
ЭТАПЫ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИНУКЛЕАРНЫХ АНТИТЕЛ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ: СКРИНИНГОВЫЕ И ПОДТВЕРЖДАЮЩИЕ ТЕСТЫ	9
МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИНУКЛЕАРНОГО ФАКТОРА	10
РЕФЕРЕНСНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ, СКРИНИНГОВЫЕ И КОНЕЧНЫЕ ТИТРЫ АНТИНУКЛЕАРНОГО ФАКТОРА	11
КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ АНТИНУКЛЕАРНОГО ФАКТОРА	12
НОМЕНКЛАТУРА И КЛАССИФИКАЦИЯ ТИПОВ СВЕЧЕНИЯ АНТИНУКЛЕАРНОГО ФАКТОРА	13
КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ АССОЦИАЦИИ ТИПОВ СВЕЧЕНИЯ АНТИНУКЛЕАРНОГО ФАКТОРА ПРИ СИСТЕМ- НЫХ АУТОИММУННЫХ РЕВМАТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИ- ЯХ	15
Ядерные типы свечения	15
Цитоплазматические типы свечения	18
Митотические типы свечения	19
СТАНДАРТНАЯ ФОРМА ОТЧЕТА О РЕЗУЛЬТАТАХ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИНУКЛЕАРНОГО ФАКТОРА	21
РЕКОМЕНДАЦИИ ПО КРАТНОСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ АНТИНУКЛЕАРНОГО ФАКТОРА ПРИ СИСТЕМНЫХ АУТОИММУННЫХ РЕВМАТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ	23
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	24
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	25

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АНА	антинуклеарные антитела
АНФ	антинуклеарный фактор
БШ/СШ	болезнь/синдром Шегрена
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
дс	двуспиральная
ДС	диагностическая специфичность
ДЧ	диагностическая чувствительность
ИБ	иммуоблот
ИВМ	идиопатические воспалительные миопатии
ИФА	иммуноферментный анализ
МИА	мультиплексный иммунный анализ
НРИФ	непрямая реакция иммунофлюоресценции
НРИФ-HEp-2	исследование АНА методом НРИФ на HEp-2-клетках
ОПОР	отношение правдоподобия отрицательного результата теста
ОППР	отношение правдоподобия положительного результата теста
ПБХ	первичный билиарный холангит
РНП	рибонуклеопротеин
САРЗ	системные аутоиммунные ревматические заболевания
СЗСТ	смешанное заболевание соединительной ткани
СКВ	системная красная волчанка
ССД	системная склеродермия
ФИА	флюоресцентный иммунный анализ
ФИТЦ	флуоресцеин-5-изотиоцианат
ХЛИА	хемилюминесцентный иммунный анализ
ЭЯА	экстрагируемые ядерные антигены
АС	anti-cell (варианты антиклеточных паттернов АНФ)
АМА	anti-mitochondrial antibodies
BCOADC	branched chain 2-oxo acid dehydrogenase complex
CENP-F	centromere nucleoprotein F
DFS	dense fine speckled
HMG	high mobility group
HMGCR	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase
hUBF	human upstream binding factor
ICAP	International consensus on ANA patterns
INCENP	inner centromere protein
KIF	kinesin family

LBR	lamin B receptor
LEDGF	lens epithelium-derived growth factor
MCA	mitotic chromosomal antigen
MDA5	melanoma differentiation-associated protein 5
Mi-2	nucleosome remodeling deacetylase
MKLP	mitotic kinesin-like protein
MPP	M-phase phosphoprotein
MSA	mitotic spindle apparatus
NMP	nuclear matrix protein
NOR-90	nucleolus organiser region
NUMA	nuclear mitotic apparatus
NXP	nuclear matrix protein
OGDC	2-oxoglutarate dehydrogenase complex
PBS	фосфатно-солевой буфер
PCM	pericentriolarmaterial
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PDH	pyruvate dehydrogenase
RNP	ribonucleoprotein
SAE	small ubiquitin-like modifier activating enzyme
SMN	survival of motor neuron
TIF1 γ	transcription intermediary factor-1 γ
Tpr	translocated promoter region

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящем документе использованы ссылки на следующие нормативные документы (стандарты):

- ГОСТ 2.105-95 «Единая система конструкторской документации. Общие требования к текстовым документам»;
- ГОСТ 7.9-95 «Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Реферат и аннотация. Общие требования»;
- ГОСТ 7.0-99 «Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Информационно-библиотечная деятельность, библиография. Термины и определения»;
- ГОСТ 7.32-2001 «Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Отчет о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления»;
- ГОСТ ИСО 8601-2001 «Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Представление дат и времени. Общие требования»;
- ГОСТ 7.1-2003 «Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Библиографическая запись. Библиографическое описание. Общие требования и правила составления»;
- ГОСТ 7.60-2003 «Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Издания. Основные виды. Термины и определения»;
- ГОСТ Р 7.0.1-2003 «Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Издания. Знак охраны авторского права. Общие требования и правила оформления»;
- ГОСТ Р 7.0.4-2006 «Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Издания. Выходные сведения. Общие требования и правила оформления»;
- ГОСТ Р 7.0.49-2007 «Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Государственный рубрикатор научно-технической информации. Структура, правила использования и ведения»;
- ГОСТ Р 7.0.53-2007 «Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Издания. Международный стандартный книжный номер. Использование и издательское оформление»;
- ГОСТ Р 7.0.5-2008 «Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Библиографическая ссылка. Общие требования и правила составления»;
- ГОСТ Р 7.0.12-2011 «Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Библиографическая запись. Сокращение слов и словосочетаний на русском языке. Общие требования и правила».

Резюме. Представлены современные стандарты исследования антинуклеарного фактора (АНФ) при системных аутоиммунных ревматических заболеваниях (САРЗ), разработанные Российской Ассоциацией Медицинской Лабораторной Диагностики с учетом отечественных и зарубежных рекомендаций, доказательной базы методов диагностики, обобщения данных мировых и отечественных публикаций, а также личного опыта ведущих специалистов в области клинической иммунологии и клинической лабораторной диагностики России.

САРЗ относятся к гетерогенной группе иммуновоспалительных болезней человека, в патогенезе которых ключевую роль играют аутоиммунитет и аутовоспаление, связанные с генетически детерминированными и индуцированными факторами внешней среды (инфекции, курение и др.) дефектами активации приобретенного и врожденного иммунного ответа. Примерами САРЗ являются системная красная волчанка, системная склеродермия, синдром Шегрена и идиопатические воспалительные миопатии.

Основная цель лабораторной диагностики САРЗ — получение объективной информации о наличии и характере иммунопатологических изменений у пациента, что является важным инструментом для ранней диагностики, оценки активности, тяжести течения, прогноза болезни и эффективности проводимой терапии.

Положительные результаты определения антинуклеарных антител (АНА) являются одним из основных лабораторных маркеров САРЗ, входя в число диагностических критериев этих заболеваний. «Золотым стандартом» и первичным скрининговым методом определения АНА в сыворотке крови служит непрямая реакция иммунофлюоресценции (НРИФ) на криостатных срезах мышины или крысиной печени (почек), либо клетках линии HEp-2. В отечественной литературе АНА, тестируемые методом НРИФ, традиционно обозначают как антинуклеарный фактор (АНФ).

Стандартизация исследования АНФ методом НРИФ создает предпосылки для снижения внутри- и межлабораторной вариабельности полученных результатов, способствует оптимизации взаимодействия между специалистами лаборатории и врачами-клиницистами в вопросах назначения и клинической интерпретации лабораторных тестов при ведении пациентов с САРЗ.

Решение проблемы стандартизации определения АНФ становится особенно важным в связи с ростом числа лабораторий, выполняющих данный тест и увеличением количества его определений, назначаемых не только ревматологами, но и врачами других специальностей.

Стандарты предназначены для специалистов (заведующих, врачей-лаборантов, биологов клиничко-диагностических лабораторий), занятых в области лабораторной диагностики САРЗ, ревматологов, терапевтов, дерматологов, нефрологов, онкологов, кардиологов, неврологов, гастроэнтерологов, отоларингологов, офтальмологов, гематологов, гинекологов.

ВВЕДЕНИЕ

Антинуклеарные антитела (АНА) — гетерогенная группа органонеспецифических аутоантител, реагирующих с различными антигенами клеточного ядра и цитоплазмы. Семейство АНА включает около 100-150 разновидностей аутоантител, в том числе антитела к двуспиральной (дс) дезоксирибонуклеиновой кислоте (ДНК), гистонам, нуклеосомам, экстрагируемым ядерным антигенам (ЭЯА) (Sm, U1 рибонуклеопротеину (РНП), Ro/SSA, La/SSB, Scl-70, Jo-1, рибосомальному белку Р), ядрышковым антигенам, компонентам цитоплазмы, мембран и митотического аппарата собственных клеток организма [3, 9]. В связи с этим более правильным названием данной группы аутоантител считается не «антинуклеарные», а «антиклеточные» антитела [9].

«Золотым стандартом» и первичным скрининговым методом определения АНА в сыворотке крови служит непрямая реакция иммунофлюоресценции (НРИФ) на криостатных срезах мышшиной или крысиной печени (почек), либо клетках линии НЕр-2 (эпителиальных клетках рака гортани человека) [8,11, 14].

В отечественной литературе АНА, тестируемые методом НРИФ, традиционно обозначают как антинуклеарный фактор (АНФ) [3]. Оценка результатов НРИФ проводится с обязательным указанием конечного титра обнаружения АНФ в исследуемых сыворотках и типа свечения. Согласно современным рекомендациям применение НЕр-2-клеток в качестве субстрата предпочтительнее, так как позволяет существенно повысить чувствительность метода и описать различные типы свечения ядра и цитоплазмы [3, 13]. Исследование АНФ с помощью НРИФ на НЕр-2-клетках (НРИФ-НЕр-2) служит эталонным скрининговым тестом для диагностики системных аутоиммунных ревматических заболеваний (САРЗ): системной красной волчанки (СКВ), системной склеродермии (ССД), болезни/синдрома Шегрена (БШ/СШ), идиопатических воспалительных миопатий (ИВМ), смешанного заболевания соединительной ткани (СЗСТ) и перекрестных синдромов [3, 8, 9, 11, 13, 14].

В последние годы особое внимание уделяется вопросам стандартизации определения АНФ методом НРИФ-НЕр-2 [2, 6]. Перспективным направлением стандартизации и улучшения воспроизводимости исследования АНФ является применение автоматизированных систем визуализации и интерпретации клеточных иммунофлюоресцентных тестов [1]. Важную роль в стандартизации тестирования АНФ на НЕр-2 клетках при САРЗ играет разработанная Международным консенсусом по паттернам АНА («International consensus on ANA patterns» (ICAP)) новая номенклатура типов ядерного,

цитоплазматического и митотического свечения, включающая 30 вариантов «антиклеточных» («anti-cell» (АС)) паттернов [5, 8, 18]. К нерешенным проблемам стандартизации НРИФ-НЕР-2 относят субъективный характер интерпретации паттернов АНФ, отсутствие квалифицированной экспертной оценки, технологические различия при выполнении теста, необходимость разработки единой русскоязычной номенклатуры типов свечения и унифицированной формы отчета о результатах определения АНА данным методом [2, 6, 12]. Стандартизация исследования АНФ в НРИФ-НЕР-2 создает предпосылки для снижения внутри- и межлабораторной вариабельности полученных результатов, способствует оптимизации взаимодействия между специалистами лаборатории и врачами-ревматологами в вопросах назначения и клинической интерпретации лабораторных тестов при ведении пациентов с САРЗ.

ЭТАПЫ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИНУКЛЕАРНЫХ АНТИТЕЛ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ:

СКРИНИНГОВЫЕ И ПОДТВЕРЖДАЮЩИЕ ТЕСТЫ

Рекомендуется двухэтапная стратегия определения АНА в сыворотке крови [2, 6, 12, 13]:

- на первом этапе осуществляется скрининговое исследование совокупности АНА (АНФ) в НРИФ методом ручной микроскопии или автоматизированного распознавания типов ядерного/цитоплазматического свечения с использованием в качестве субстрата НЕР-2-клеток;

- на втором этапе пациентам с положительными результатами НРИФ-НЕР-2 проводятся подтверждающие тесты для выявления специфических антител к отдельным ядерным и цитоплазматическим антигенам (дсДНК, ЭЯА и др.) с помощью твердофазных биоаналитических технологий — иммуноферментного анализа (ИФА), иммуноблота (ИБ), флуоресцентного, хемилюминесцентного, мультиплексного иммунного анализа (ФИА, ХЛИА, МИА). Среди подтверждающих исследований АНА различают рефлекс-тесты (выполняются лабораторией самостоятельно, без нового врачебного направления) и последовательные, «каскадные» тесты (выполняются лабораторией после нового назначения лечащего врача).

Некоторые типы АНА при САРЗ (антитела к центромерам, ядерному антигену пролиферирующих клеток — «proliferating cell nuclear antigen» (PCNA), комплексу Гольджи, митотическому аппарату клетки) обнаружи-

ваются преимущественно методом НРИФ на HEp-2-клетках, что исключает необходимость их дальнейшего исследования с помощью подтверждающих тестов. С другой стороны, ряд антител к ЭЯА, в частности, антитела против SS-A/Ro, рибосомального белка Р и Jo-1, могут не выявляться методом НРИФ-HEp-2. При отрицательных результатах определения антител к SS-A/Ro, рибосомальному белку Р и Jo-1 в НРИФ-HEp-2, но высокой вероятности наличия у больного САРЗ следует использовать альтернативные методы идентификации данных аутоантител (ИФА, ИБ, ХЛИА и др.). Выбор спектра подтверждающих исследований АНА зависит от типа ядерного/цитоплазматического свечения АНФ в НРИФ-HEp-2 и совокупности клинических факторов [6, 8, 13].

В практике клинко-диагностических лабораторий широкое распространение получили скрининговые методы определения АНА на основе ИФА, ИБ, ХЛИА, ФИА и МИА [10, 13, 17]. Эти методы твердофазного анализа не могут полностью заменить первичный скрининг АНА (АНФ) с помощью НРИФ-HEp-2, так как идентифицируют антитела к ограниченному количеству антигенов с измененными либо утраченными эпитопами, что приводит к увеличению числа ложноотрицательных результатов до 35% [9, 16]. Среди больных СКВ диагностическая чувствительность (ДЧ) ИФА (75,2%), ФИА (74,0%), ХЛИА (80,6%) и суспензионных мультиплексных технологий (74,0%) при скрининговом выявлении АНА ниже таковой у НРИФ-HEp-2 (90,7%) [6]. Международными рекомендациями допускается применение твердофазных методов иммунного анализа (ИФА, ХЛИА, ФИА, ИБ, МИА) для скрининга АНА при условии обязательного проведения их повторного исследования с помощью НРИФ-HEp-2 в случае расхождения результатов измерения АНА с клиническими данными [13]. Новой эффективной диагностической стратегией является комбинация НРИФ-HEp-2 с одним из двух высокочувствительных скрининговых методов твердофазного иммунного анализа АНА — ФИА (EliA CTD Screen, Thermo Fisher, ФРГ) или ХЛИА (QUANTA Flash CTD Screen Plus, Inova Diagnostics, Испания) [7].

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИНУКЛЕАРНОГО ФАКТОРА

Исследование АНА (АНФ) методом НРИФ-НЕР-2 должно проводиться с использованием зарегистрированных на территории Российской Федерации как изделия медицинского назначения диагностических наборов реагентов, перечень которых представлен в Государственном реестре медицинских изделий, опубликованном на официальном сайте Росздравнадзора www.roszdravnadzor.ru, в разделе «Электронные сервисы» <https://roszdravnadzor.gov.ru/services/misearch/>, в соответствии с инструкциями по их применению.

1. ПОДГОТОВКА СЫВОРОТКИ КРОВИ К АНАЛИЗУ

1.1. Образец венозной крови (4,0-10,0 мл) берется в пробирку с активатором свертывания.

1.2. Образец центрифугируется 10 минут в режиме в зависимости от метода и вида центрифуги с определенным ускорением (g) ротора ($RCF = g$) для достижения которого необходимо ориентироваться по нормограмме соответствия ускорения (RCF), действующего на образец в роторе и скорости вращения (rpm) в зависимости от диаметра ротора (Рис .1) или (при 1500 g (3000 об/мин)) [4].

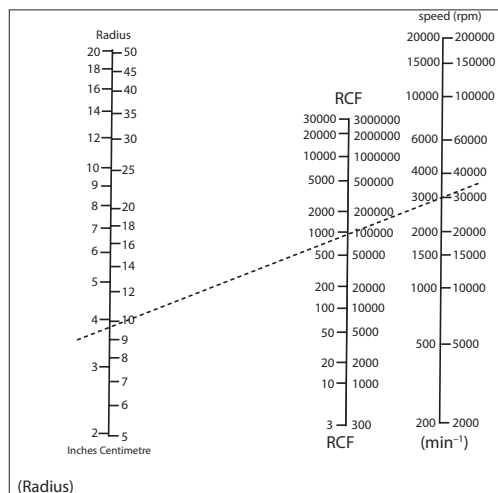


Рисунок 1.

Нормограмма соответствия ускорения (RCF), действующего на образец в роторе и скорости вращения (rpm) в зависимости от диаметра ротора.

1.3. Используется верхний слой сыворотки.

1.4. Если сыворотка не используется немедленно, рекомендуется ее хранить при температуре -70°C с добавлением азида натрия (100-300 мкг/мл).

1.5. Разведите сыворотку в фосфатно-солевом буфере (PBS) с добавлением 0,5 г/л Tween-20 и 0,1 г азида натрия (PBS-T). Бычий сывороточный

альбумин (20 г/л) может быть добавлен в разбавляющий буфер для уменьшения неспецифического связывания сывороточных глобулинов с субстратом. Использование Tween-20 не является обязательным. Для скрининга сыворотка разводится 1:160. В коммерческих тест-системах буфер поставляется в готовом виде.

2. КОНЬЮГАТ

В качестве конъюгата используются поливалентные козы или кроличьи антитела к IgG человека, конъюгированные с флуоресцеин-5-изотиоцианатом (ФИТЦ). В коммерческих тест-системах реагент поставляется подобранным для оптимальной реакционной способности с соответствующим субстратом.

3. ИНКУБАЦИЯ С СЫВОРОТКОЙ

3.1. Вносится 40-50 мкл разбавленной сыворотки в лунки предметного стекла.

3.2. Предметные стекла инкубируются во влажной камере в течение 30 минут при комнатной температуре.

3.3. Предметные стекла промываются буфером PBS-T и немедленно помещаются в PBS. Далее стекла промываются при шейкировании 2 раза по 10 минут.

4. ИНКУБАЦИЯ С КОНЬЮГАТОМ

4.1. С помощью фильтровальной бумаги с предметных стекол удаляются остатки буфера, и в каждую лунку вносятся 40-50 мкл конъюгата.

4.2. Стекла инкубируются в течение 30 мин при комнатной температуре во влажной камере.

4.3. Промывка предметных стёкол, как указано в шаге 2.3.

4.4. На предметное стекло наносится 2-3 капли монтажной среды (70% глицерина в PBS, pH 8,3) и укладывается покровное стекло.

4.5. Результаты анализируются с применением флуоресцентного микроскопа с комбинацией фильтров, оптимальных для обнаружения ФИТЦ при увеличении 40X.

РЕФЕРЕНСНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ, СКРИНИНГОВЫЕ И КОНЕЧНЫЕ ТИТРЫ АНТИНУКЛЕАРНОГО ФАКТОРА

Нормальные титры АНФ в сыворотке крови при использовании НРИФ-НЕР-2 составляют <1:160 [2, 3, 8, 11, 12, 15]. Различают низко позитивные (1:160-1:320), умеренно позитивные (1:640) и высоко позитивные (1:1280

и более) титры АНФ. АНФ в титре 1:40 выявляется у 25-30%, 1:80 — у 10-15%, 1:160 и выше — у 5% здоровых людей. Частота обнаружения АНФ повышается с возрастом (особенно среди женщин), у родственников больных САРЗ, на фоне приема лекарственных препаратов, при вирусных и бактериальных инфекциях, злокачественных новообразованиях.

Скрининговое разведение сыворотки 1:160 отражает оптимальное соотношение ДЧ и диагностической специфичности (ДС) метода определения АНФ с помощью НРИФ-НЕр-2 и позволяет идентифицировать 95% больных САРЗ и 95% здоровых лиц [15].

В клинических рекомендациях представлена научно-обоснованная точка зрения о необходимости указания в бланке выдачи результатов НРИФ-НЕр-2 максимального конечного титра АНФ, полученного при разведении сыворотки до прекращения флюоресценции [3, 10, 11, 15], однако в повседневной клинической практике в связи с отсутствием корреляции большинства паттернов АНФ, кроме гомогенного, с активностью САРЗ считается допустимым использовать конечные титры, не превышающие 1:640-1:2560 [2, 12]. В бланке отчета о результатах определения АНА методом НРИФ-НЕр-2 следует указывать конечные титры для каждого из выявленных паттернов АНФ в отдельности в случае их различной интенсивности [2, 12].

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ АНТИНУКЛЕАРНОГО ФАКТОРА

Для оценки клинической информативности исследования АНФ с помощью НРИФ-НЕр-2 рекомендуется расчет операционных характеристик теста: ДЧ и ДС, отношение правдоподобия положительных результатов (ОППР) и отношение правдоподобия отрицательных результатов (ОПОР). Наиболее полезными для диагностики САРЗ являются лабораторные тесты с ОППР >5 и ОПОР $<0,2$; полезными — с ОППР >2 и ≤ 5 , ОПОР $>0,2$ и $\leq 0,5$; исследования, не имеющие пользы, характеризуются ОППР ≤ 2 и ОПОР $>0,5$ [3, 11].

Тестирование АНФ методом НРИФ-НЕр-2 очень полезно для диагностики СКВ (ДЧ:93%, ДС:57%, ОППР:2,2, ОПОР:0,11) (положительные результаты обнаружения АНФ служат диагностическим критерием СКВ) и ССД (ДЧ:85%, ДС:54%, ОППР:1,86, ОПОР:0,27), полезно для диагностики СШ, ассоциирующегося с СКВ (ДЧ:48%, ДС:52%, ОППР:0,99, ОПОР:1,01), и менее полезно для диагностики ИВМ (ДЧ:61%, ДС:63%, ОППР:1,67, ОПОР:0,61).

Позитивность по АНФ рассматривается в качестве диагностического

критерия лекарственной волчанки, СЗСТ и аутоиммунного гепатита. АНФ является очень полезным маркером для оценки прогноза и мониторинга течения ювенильного идиопатического артрита в сочетании с увеитом вторичного феномена Рейно, ассоциирующегося с САРЗ.

Положительные результаты определения АНФ не имеют доказанного диагностического и прогностического значения при ревматоидном артрите (РА), рассеянном склерозе, заболеваниях щитовидной железы, инфекциях, идиопатической тромбоцитопенической пурпуре и фибромиалгии [3, 11].

Показаниями к определению АНФ являются: артрит в сочетании с лихорадкой, гломерулонефрит, необъяснимое системное заболевание, цитопении, необъяснимая патология центральной нервной системы, полисерозит, сухой кератоконъюнктивит и ксеростомия, феномен Рейно, пальпируемая пурпура.

НОМЕНКЛАТУРА И КЛАССИФИКАЦИЯ ТИПОВ СВЕЧЕНИЯ АНТИНУКЛЕАРНОГО ФАКТОРА

В 2014 г. группой экспертов ICAP была разработана единая международная номенклатура типов свечения АНФ в НРИФ-HEp-2, которая постоянно обновляется и в настоящее время включает 30 вариантов «антиклеточных» паттернов (с AC-0 по AC-29), разбитые на 4 большие группы [8, 13, 18]:

- отрицательное (негативное) свечение (1 паттерн, AC-0);
- ядерное свечение (15 паттернов, с AC1 по AC-14 и AC-29);
- цитоплазматическое свечение (9 паттернов, с AC-15 по AC-23);
- митотическое свечение (5 паттернов, с AC-24 по AC-28).

В русскоязычной адаптации международная номенклатура и схема классификации типов свечения АНФ при использовании НРИФ-HEp-2 представлена на рис. 2 [5, 18]. Актуальная номенклатура, клиническое значение, подробное описание и иллюстрации типов свечения АНФ размещены на веб-сайте ICAP: <https://www.anapatterns.org>.

В зависимости от клинической значимости и простоты распознавания различают типы свечения АНФ, описываемые специалистами компетентного и экспертного уровней. В верхней части схемы классификации паттернов АНФ расположены легкораспознаваемые типы свечения, которые должны определяться во всех лабораториях специалистами компетентного уровня [18]: отрицательное свечение (AC-0); 8 вариантов ядерного свечения (гомогенное — AC-1, плотное мелкокрапчатое — AC-2, центромерное — AC-3, крапчатое — AC-4/5*, ядерные точки — AC-6/7*, нуклеолярное — AC-8/9/10*, ядерное мембранное — AC-11/12*, плеоморфное — AC-13/14*); 5 вариантов

цитоплазматического свечения (фибрилярное — АС-15/16/17*, крапчатое — АС-19/20*, митохондриальное — «anti-mitochondrial antibodies» (АМА) — АС-21, Гольджи — АС-22, палочки и кольца — АС-23) и митотическое свечение — АС-24/25/26/27/28*.

В нижней части схемы указаны паттерны АНФ, оцениваемые специалистами экспертного уровня, включающие 12 типов ядерного свечения: топоизомераза 1 — АС-29, мелкокрапчатое — АС-4, крупнокрапчатое — АС-5, множественные точки в ядре — АС-6, единичные точки в ядре — АС-7, гомогенное нуклеолярное — АС-8, глыбчатое нуклеолярное — АС-9, точечное нуклеолярное — АС-10, ядерное мембранное гладкое — АС-11, ядерное мембранное точечное — АС-12, PCNA — АС-13, центромерный нуклеопротеин F (CENP-F «centromere nucleoprotein F» — АС-14); 6 типов цитоплазматического свечения: фибриллярное линейное — АС-15, фибриллярное филаментозное — АС-16, фибриллярное сегментарное — АС-17, дискретные точки — АС-18, плотное мелкокрапчатое — АС-19, мелкокрапчатое — АС-20; 5 типов митотического свечения: centrosomes — АС-24, веретено деления — АС-25, ядерный митотический аппарат — «nuclear mitotic apparatus» (NUMA) — АС-26, межклеточный мостик — АС-27, митотические хромосомы — АС-28.

При САРЗ, наряду с простыми и четкими одиночными типами свечения АНФ в НРИФ-НЕР-2 (например, АС-1, АС-3, АС-22) наблюдаются различные сочетания нескольких паттернов у 1 пациента, в том числе «множественные», «смешанные» и «составные» варианты флюоресцентного окрашивания. «Множественные» паттерны характеризуются наличием 2 и более четко классифицируемых типов свечения АНФ (например, АС-3 и АС-21 или АС-4 и АС-22) в одном образце сыворотки, обусловленных связыванием различных АНА с таргетными антигенами, расположенными в отдельных областях клетки. «Смешанные» паттерны индуцируются одновременным существованием у пациента нескольких типов свечения АНФ, которые локализуются в одном и том же клеточном домене, однако не могут быть идентифицированы каждый по отдельности (например, АС-1+АС-5 или АС-4 + АС-5). «Составные» паттерны наблюдаются в тех случаях, когда одно антиядерное антитело вызывает характерное для данного аутоантитела специфическое окрашивание 2 или более областей клетки (например, АС-14, АС-26).

*Примечание: *типы ядерного, цитоплазматического и митотического свечения АНФ компетентного уровня оценки, указываемые без расшифровки составляющих их индивидуальных АС-паттернов.*

КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ АССОЦИАЦИИ ТИПОВ СВЕЧЕНИЯ АНТИНУКЛЕАРНОГО ФАКТОРА ПРИ СИСТЕМНЫХ АУТОИММУННЫХ РЕВМАТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Типы свечения АНФ отражают наличие в сыворотках пациентов определенных разновидностей антиген-специфических АНА, которые ассоциируются с соответствующими нозологическими формами САРЗ [8] (Приложение № 1).

Ядерные типы свечения

АС-0 Отрицательное (Negative)

АС-1 Гомогенное (Homogeneous)

Клиническое значение: диагностика СКВ, лекарственной волчанки, аутоиммунного гепатита, ювенильного идиопатического артрита в сочетании с увеитом.

Аутоантигены: дсДНК, гистоны, хроматин/нуклеосомы, группа хромосомных белков, участвующих в транскрипции «high mobility group» (HMG). При аутоиммунном гепатите и ювенильном идиопатическом артрите аутоантигены неидентифицированы.

Подтверждающие тесты: исследование антител к дсДНК, гистонам, нуклеосомам с помощью ИФА, ИБ, ХЛИА, МИА. При аутоиммунном гепатите и ювенильном идиопатическом артрите подтверждающие тесты не проводятся.

АС-2 Плотное мелкокрапчатое (Dense fine speckled)

Клиническое значение: изолированное, моноспецифическое свечение DFS70 выявляется у 2-22% здоровых лиц (в том числе у 24-54% АНФ-позитивных доноров) и негативно ассоциируется с САРЗ (0-2,5%).

Аутоантигены: ядерный антиген «dense fine speckled» (DFS70), имеющий молекулярную массу 70 кДа; идентичен фактору роста эпителия хрусталика «lens epithelium-derived growth factor» (LEDGF/p75).

Подтверждающие тесты: исследование антител к DFS70 с помощью ИФА, ИБ, ХЛИА, ПРИФ с селективной адсорбцией, иммунопреципитация, Вестерн блот. Новый субстрат (Her-2 ELITE/DFS70-KO, «Immco Diagnostic-Trinity Biotech», США), состоящий из смеси стандартных Her-2-клеток и генно-инженерных DFS70-KO Her-2-клеток, не экспрессирующих DFS70/LEDGF/p75 антиген и подавляющих связывание антител к DFS с таргетным антигеном, позволяет дифференцировать DFS от классических типов

ядерного свечения. Одноэтапный анализ антител к DFS70 методом НРИФ на HEp-2/DFS70-КО-клетках устраняет необходимость применения других подтверждающих тестов (ИФА, ХЛИА, ИБ, НРИФ HEp-2 с селективной адсорбцией) при исследовании данных антител.

АС-3 Центромерное (Centromere)

Клиническое значение: диагностика лимитированной формы ССД, синдрома Рейно (предшествующего развитию лимитированной формы ССД), субтипа СШ, первичного билиарного холангита (ПБХ), ССД в сочетании с СКВ.

Аутоантигены: центромерные нуклеопотеины (CENP)-А, В, С. Наиболее часто выявляются антитела к CENP-B.

Подтверждающие тесты: доступно исследование антител к CENP-B с помощью ИФА, ИБ, ХЛИА, МИА.

АС-4 Мелкокрапчатое (Fine speckled)

Клиническое значение: диагностика БШ/СШ, СКВ, неонатальной волчанки, врожденной полной поперечной блокады сердца, подострой кожной волчанки, ИВМ (дерматомиозита, перекрестного миозита, паранеопластического миозита), ССД, перекрестных синдромов.

Аутоантигены: SS-A/Ro 52&60, SS-B/La, деацетилаза, ремодулирующая нуклеосомы «nucleosome remodeling deacetylase» (Mi-2), транскрипционный промежуточный фактор 1γ «transcription intermediary factor-1γ» (TIF1γ), Ku.

Антитела к SS-A/Ro 60, SS-B/La, Mi-2, TIF1γ, Ku могут не выявляться методом НРИФ-HEp-2 (слабое свечение); при подозрении на наличие CAPЗ необходимо исследование данных антител с помощью других методов твердофазного иммунного анализа.

Подтверждающие тесты: исследование антител к SS-A/Ro 52&60, SS-B/La с помощью ИФА, ИБ, ХЛИА, МИА; исследование профиля миозит-специфических и миозит-ассоциированных антител (к Mi-2, TIF1γ, Ku) методом ИБ («inflammatory myopathy profile»).

Антитела к Mi2, TIF1γ в комбинации с антителами к белку, ассоциированному с дифференцировкой меланомы «melanoma differentiation-associated protein 5» (MDA5), ферменту, активирующему SUMO – малый убиквитин-подобный модификатор «small ubiquitin-like modifier activating enzyme» (SAE), ядерному матричному белку 2 «nuclear matrix protein» (NXP) обнаруживаются при дерматомиозите; антитела к Ro52, Ku, в сочетании с антителами к РНП, РМ/ScI и аминоксилсинтетазам т-РНК (Jo1) – при перекрестных миозитах, ассоциирующихся с СКВ, ССД, СЗСТ; антитела к TIF1γ, NXP2, 3-гидрокси-3-метилглутарил кофермент А редуктазе «3-hydroxy-3-methylglutaryl-

coenzyme A reductase» (HMGCR) — при паранеопластическом миозите.

АС-5 Крупнокрапчатое (*Large/Coarse speckled*)

Клиническое значение: диагностика СКВ, СЗСТ, ССД, перекрестных синдромов (ИВМ/ССД).

Аутоантигены: Sm, hnРНП, U1РНП, РНК-полимераза III, реже — U2РНП, U11/U12РНП.

Подтверждающие тесты: исследование антител к Sm, U1РНП, РНК-полимеразе III с помощью ИФА, ИБ, ХЛИА, МИА, антител к U2РНП, U11/U12РНП методом иммунопреципитации.

АС-6 Множественные точки в ядре (*Multiple nuclear dots*)

Клиническое значение: диагностика ПБХ, ИВМ (дерматомиозита), других аутоиммунных и воспалительных заболеваний.

Аутоантигены: Sp-100, белки промиелоцитарного лейкоза (PML), MJ/NXP-2.

Подтверждающие тесты: при ПБХ исследование антител к Sp-100 (совместно с PML-Sp140 и АМА) методом ИБ в составе профиля печеночных антител («liver-blot»); при дерматомиозите определение антител к MJ/NXP — методом ИБ в составе профиля миозит-специфических и миозит-ассоциированных антител («inflammatory myopathy profile»).

АС-7 Единичные точки в ядре (*Few nuclear dots*)

Клиническое значение: отсутствует.

Аутоантигены: P80-коилин и белок выживаемости моторных нейронов «survival of motor neuron» (SMN).

Подтверждающие тесты: отсутствуют.

АС-8 Гомогенное нуклеолярное (*Homogeneous nucleolar*)

Клиническое значение: выявляется при ССД, перекрестном синдроме (ИВМ/ССД), других САРЗ.

Аутоантигены: PM/Scl-75, PM/Scl-100, Th/To, B23/nucleophosmin, nucleolin, No55/SC65.

Антитела к PM/Scl могут дополнительно давать мелкое крапчатое ядерное свечение АС-4.

Подтверждающие тесты: при лимитированной форме ССД исследование антител к Th/To в составе профиля склеродермических антител с помощью ИБ; при ИВМ/ССД исследование антител к PM/Scl методами ИФА, ХЛИА, МИА и ИБ (в составе профилей склеродермических, миозит-специфических и миозит-ассоциированных антител).

АС-9 Глыбчатое нуклеолярное (*Clumpy nucleolar*)

Клиническое значение: выявляется при диффузной форме ССД, сопро-

возжающейся лёгочной артериальной гипертензией, поражением скелетной мускулатуры, тяжелой кардиоваскулярной патологией и нарушением моторики ЖКТ; чаще наблюдается у афро- и латиноамериканцев.

Аутоантигены: U3RNP «ribonucleoprotein» (RNP)/фибриллярин.

Подтверждающие тесты: исследование антител к U3RNP/фибриллярину в составе профиля склеродермических антител методом ИБ.

АС-10 Точечное нуклеолярное (Punctate nucleolar)

Клиническое значение: выявляется при ССД, синдроме Рейно, БШ/СШ, злокачественных новообразованиях.

Аутоантигены: РНК-полимераза I, ядрышковый транскрипционный фактор, регулирующий транскрипцию генов рРНК РНК-полимеразой «human upstream binding factor» (hUBF) / «nucleolus organizer region» (NOR-90).

Антитела к РНК-полимеразе I могут сочетаться с антителами к РНК-полимеразе III, дающими крупнокрапчатое ядерное свечение АС-5.

Подтверждающие тесты: исследование антител к hUBF/NOR-90 в составе профиля склеродермических антител методом ИБ. Отсутствие коммерческих подтверждающих тест-систем для определения антител к РНК-полимеразе I, рекомендуется исследование антител к РНК-полимеразе III с помощью ИФА, ИБ.

АС-11 Ядерное мембранное гладкое (Smooth nuclear envelope)

Клиническое значение: редко встречается при СКВ, антифосфолипидном синдроме (АФС) и других САРЗ, аутоиммунных цитопениях, аутоиммунных заболеваниях печени.

Аутоантигены: ламинины А, В, С или ламинин-ассоциированные белки.

Подтверждающие тесты: отсутствуют.

АС-12 Ядерное мембранное точечное (Punctate nuclear envelope)

Клиническое значение: обнаруживается при ПБХ и других аутоиммунных заболеваниях печени, САРЗ.

Аутоантигены: gp210 и другие белки комплекса ядерных пор (нуклеопорин p62, рецептор ламинина В «lamin B receptor» (LBR), транслоцированная промоторная область «translocated promoter region» (Tpr).

Подтверждающие тесты: исследование антител к gp210 методом ИБ в составе профиля печеночных антител («liver-blot»); отсутствие коммерческих тест-систем для определения антител к p62, LBR и Tpr.

АС-13 PCNA

Клиническое значение: выявляется при СКВ.

Аутоантигены: PCNA (вспомогательный белок ядерного антигена клеточной пролиферации: фактор элонгации ДНК-полимеразы дельта).

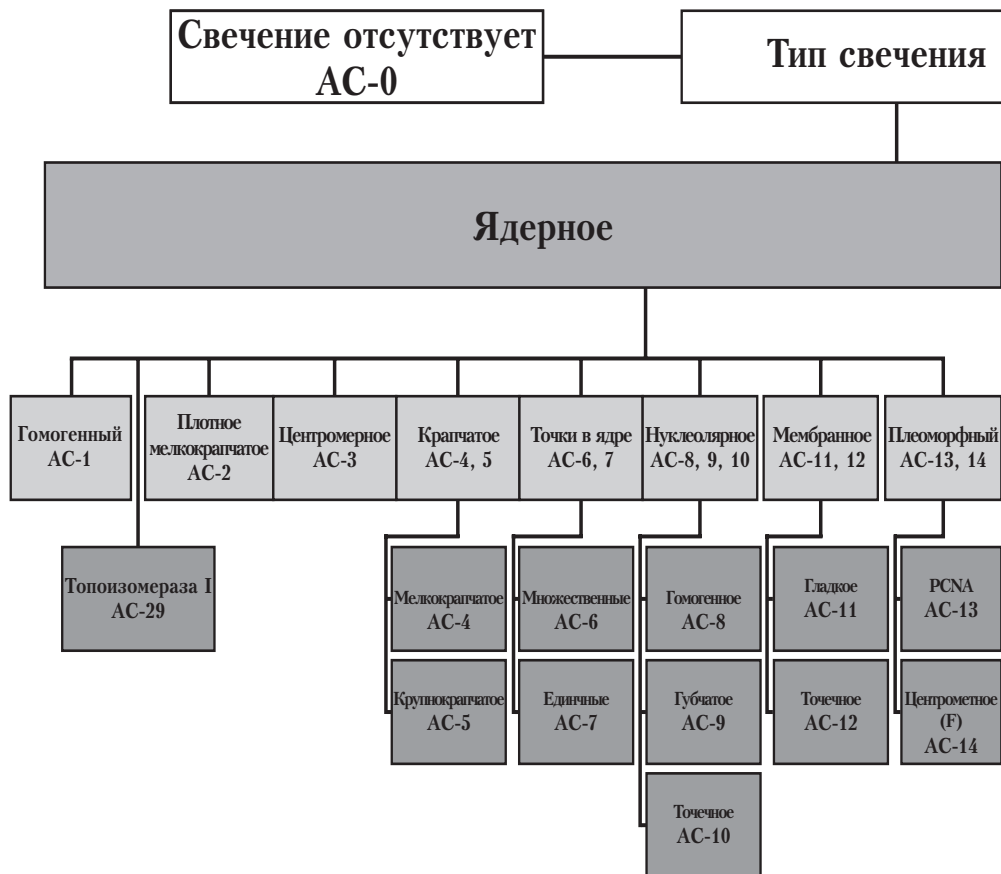
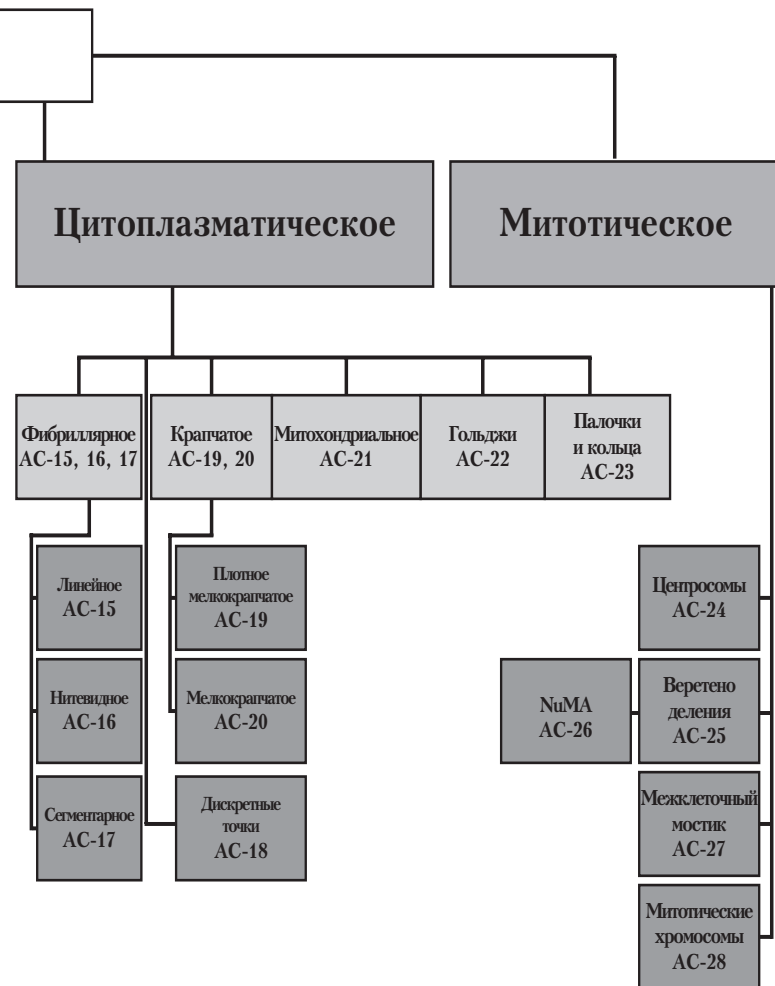


Рисунок 2.

*Русскоязычная адаптация международной номенклатуры и
схема классификации типов свечения АНФ при использовании
НРИФ-НЕР-2*



Подтверждающие тесты: исследование антител к PCNA методами ИФА, ИБ, ХЛИА, МИА.

AC-14 CENP-F

Клиническое значение: выявляются при БШ/СШ, болезни Крона, отторжении трансплантата, злокачественных новообразованиях.

Аутоантигены: CENP-F.

Подтверждающие тесты: отсутствуют.

AC-29 Топоизомераза I (Торо I)

Клиническое значение: диагностика диффузной формы ССД.

Аутоантигены: ДНК-топоизомераза I.

Подтверждающие тесты: исследование антител к топоизомеразе I (Scl-70) с помощью ИФА, ИБ, ХЛИА, МИА.

Цитоплазматические типы свечения

AC-15 Фибриллярное линейное (Fibrillar linear)

Клиническое значение: выявляется при аутоиммунном гепатите I типа, хронической инфекции HCV, целиакии (IgA изотип), реже — при CAP3.

Аутоантигены: актин, немышечный миозин.

Подтверждающие тесты: исследование IgG-антител к гладкой мускулатуре (ASMA) с помощью НРИФ на срезах печени/почек/желудка крыс/мышей (диагностический критерий аутоиммунного гепатита I типа), антител к F-актину методом ИБ (учитывать его низкую ДЧ).

AC-16 Фибриллярное нитевидное (Fibrillar filamentous)

Клиническое значение: антитела к цитокератину 8, 18 и 19 могут обнаруживаться у больных АИГ, антитела к цитокератину 18 — у пациентов с хронической обструктивной болезнью лёгких, антитела к цитокератину 19 — при идиопатическом лёгочном фиброзе; антитела к виментину — у пациентов с нейрофиброматозом 1 типа; при РА могут обнаруживаться антитела к цитруллиновым изоформам виментина, однако маловероятно, что они связаны с данным типом свечения.

Аутоантигены: цитокератин 8, 18 и 19, тубулин, виментин.

Подтверждающие тесты: отсутствуют.

AC-17 Фибриллярное сегментарное (Fibrillar segmental)

Клиническое значение: обнаруживаются при СКВ и могут указывать на развитие люпус-нефрита, а также при АИГ первого типа.

Аутоантигены: альфа-актин, винекулин.

Подтверждающие тесты: отсутствуют.

AC-18 Дискретные точки (Discrete dots)

Клиническое значение: выявляется при САРЗ (БШ/СШ, СКВ, ревматоидном артрите), нейропатиях и ПБХ.

Аутоантигены: процессинговые антигены GW (глицин-триптофановых) телец (Ge-1/Hedls, GW182, Su/Ago2) и антигены эндосом (EEA1, CLIP-170, GRASP-1, LBPA).

Подтверждающие тесты: исследование антител к Ge-1/Hedls, GW182 и Su/Ago2 методами МИА и иммунопреципитации, отсутствие доступных коммерческих тест-систем.

AC-19 Плотное мелкокрапчатое (Dense fine speckled)

Клиническое значение: выявляется при СКВ и ИВМ. Антитела к рибосомальному белку Р ассоциируются с нейропсихическими проявлениями СКВ, развитием СКВ в детском возрасте в сочетании с гемолитической анемией, реже выявляются при аутоиммунном гепатите. Антитела к PL-7, PL-12 обнаруживаются при ИВМ с наличием антисинтетазного синдрома, характеризующегося интерстициальным поражением лёгких, артритом, синдромом Рейно, изменением кожи кистей по типу «руки механика».

Аутоантигены: рибосомальный белок Р, PL-7, PL-12.

Антитела к аминоксилсинтетазам т-РНК (PL-7, PL-12) и рибосомальному белку Р могут не выявляться методом НРИФ-Нер-2 (слабое свечение). При подозрении на наличие ИВМ или СКВ необходимо исследование данных антител с помощью других методов твердофазного иммунного анализа.

Подтверждающие тесты: исследование антител к рибосомальному белку Р методами ИФА, ИБ, ХЛИА, МИА; исследование антител к аминоксилсинтетазам т-РНК (PL-7, PL-12) методом ИБ в составе профиля миозит-специфических и миозит-ассоциированных антител («inflammatory myopathy profile»).

AC-20 Мелкокрапчатое (Fine speckled)

Клиническое значение: выявляется при ИВМ, сопровождающихся антисинтетазным синдромом.

Аутоантигены: Jo-1/гистидил-синтетаза т-РНК.

Антитела к Jo-1 могут не выявляться методом НРИФ-Нер-2 (слабое свечение). При подозрении на наличие ИВМ необходимо исследование данных антител с помощью других методов твердофазного иммунного анализа.

Подтверждающие тесты: исследование антител к Jo-1 методами ИФА, ХЛИА, МИА и ИБ в составе профиля миозит-специфических и миозит-ассоциированных антител («inflammatory myopathy profile»).

АС-21 Митохондриальное (АМА)

Клиническое значение: выявляется при ПБХ, ССД, перекрестных синдромах (ПБХ/ССД, ПБХ/СШ).

Аутоантигены: Е2-субъединица пируватдегидрогеназного «pyruvate dehydrogenase» (PDH) комплекса – антиген внутренней мембраны митохондрий М2 (PDH-Е2/М2), Е2-субъединица оксоглутаратдегидрогеназного комплекса «2-oxoglutarate dehydrogenase complex» (OGDC-Е2), Е2-субъединица дегидрогеназного комплекса 2-оксикислоты с разветвленной цепью «branched chain 2-oxo acid dehydrogenase complex» (BCOADC-Е2), Е1 α - и Е1 β субъединицы PDH, Е3-связывающий белок PDH.

Подтверждающие тесты: исследование АМА к PDH-Е2 (АМА-М2) с помощью НРИФ на срезах печени/почек/желудка крыс (мышей), а также методами ИФА, ХЛИА, МИА и ИБ в составе профиля печеночных антител («liver blot»). Исследование антител к Е1 α - и Е1 β -субъединицам PDH, Е3-связывающему белку PDH, OGDC-Е2, BCOADC-Е2 проводится с помощью ИБ в рамках расширенного профиля печеночных антител.

АС-22 Гольджи (Golgi)

Клиническое значение: редко выявляется при СКВ и других САРЗ.

Аутоантигены: гиантин/макрогольджин, гольджин-95/GM130, гольджин-160, гольджин-97, гольджин-245.

Подтверждающие тесты: отсутствуют.

АС-23 Палочки и кольца (Rods and rings)

Клиническое значение: встречается у пациентов с гепатитом С, получающих комбинированную терапию пегилированным интерфероном- α /рибавирином.

Аутоантиген: IMPDH2.

Подтверждающие тесты: отсутствуют.

Митотические типы свечения

АС-24 Центросомы (Centrosome)

Клиническое значение: выявляется при ССД, СКВ, ревматоидном артрите, синдроме Рейно.

Аутоантигены: перицентрин, нинеин, центросомальные белки (Сер250, Сер110).

Подтверждающие тесты для выявления антител к α -энолазе, γ -энолазе, нинеину, Сер250, Mob1, перичентриолярному материалу «pericentriolar material» (PCM1/2) и перицентрину отсутствуют.

АС-25 Веретено деления (Spindle fibers)

Клиническое значение: может выявляться при БШ/СШ и СКВ.

Аутоантигены: HsEg5.

Подтверждающие тесты: отсутствуют.

АС-26 NuMA

Клиническое значение: выявляется при САРЗ (лимитированной форме ССД, СКВ, ревматоидном артрите, БШ/СШ), органоспецифических аутоиммунных заболеваниях, реже — при других патологических состояниях.

Аутоантигены: ядерный митотический аппарат (NuMA), центрофиллин, SP-N, белок ядерного матрикса «nuclear matrix protein» (NMP)-22.

Подтверждающие тесты: отсутствуют.

АС-27 Межклеточный мостик

Клиническое значение: обнаружены при ССД, СКВ, феномене Рейно и злокачественных новообразованиях.

Аутоантигены: CENP-E, CENP-F, TD60, аппарат митотического веретена «mitotic spindle apparatus» (MSA)-36, семейство кинезинов «kinesin family» (KIF)-14, митотический кинезиноподобный белок «mitotic kinesin-like protein» (MKLP)-1, фосфопротеин М-фазы «M-phase phosphoprotein» (MPP)1/KIF20B, внутренний центромерный белок «inner centromere protein» (INCENP).

Подтверждающие тесты: отсутствуют.

АС-28 Митотические хромосомы

Клиническое значение: выявляются при СКВ, БШ/СШ, ревматической полимиалгии, карциноме.

Аутоантигены: модифицированные гистоны H3, митотический хромосомный антиген «mitotic chromosomal antigen» (MCA-1).

Подтверждающие тесты: отсутствуют.

СТАНДАРТНАЯ ФОРМА ОТЧЕТА О РЕЗУЛЬТАТАХ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИНУКЛЕАРНОГО ФАКТОРА

Модель стандартного отчета о результатах исследования АНФ с помощью ПРИФ-НЕР-2 разработана на основе межлабораторного консенсуса с учетом рекомендаций ИСАР и требований ГОСТ Р ИСО 15189-2015 [2, 12].

Отчет о результатах исследования АНФ должен включать следующие данные:

1. Наименование медицинской организации.
2. Наименование лаборатории, которая представляет отчет.
3. ФИО пациента, пол, дату рождения, при необходимости — дополнительные данные (№ медицинского страхового полиса и др.).
4. Номер медицинской карты пациента, получающего медицинскую помощь в амбулаторных условиях или номер истории болезни пациента при оказании медицинской помощи в условиях стационара.
5. Диагноз основного заболевания, код диагноза в соответствии с МКБ.
6. ФИО врача отделения, запросившего исследование, и способы контакта с ним.
7. Дата и время взятия первичной пробы.
8. Наименование биоматериала (сыворотка).
9. Вид исследования — исследование АНФ.
10. Метод исследования — ПРИФ на НЕР-2-клетках.
11. Результаты исследования с указанием титра и типа свечения АНФ.
12. Референтный интервал (титр $<1:160$).
13. Перечень подтверждающих тестов для выявления АНА к отдельным ядерным/цитоплазматическим антигенам у АНФ-позитивных пациентов (при необходимости).
14. Комментарий: корректная интерпретация теста может проводиться только лечащим врачом с учетом клинической картины заболевания.
15. Дата и время выдачи отчета.
16. Идентификация лица, уполномоченного выдавать отчеты о результатах исследования АНФ.
17. Примеры оформления отчетов о результатах исследования АНФ с помощью ПРИФ-НЕР-2 представлены на рис. 3.

Рисунок 3. Стандартная форма отчета о результатах выявления антинуклеарного фактора:

А – пример отчета при выявлении одиночного (изолированного) типа свечения; **Б** – пример отчета при выявлении смешанного типа свечения; **В** – пример отчета при выявлении множественного типа свечения

А.

Наименование организации
Наименование лаборатории

Ф.И.О. пациента: _____
Возраст пациента: _____
Номер образца: _____
Диагноз(МКБ): _____
Метод: непрямая иммунофлюоресценция на клетках линии НЕР-2

Ф.И.О. врача: _____
Материал: Сыворотка
Дата поступления образца: _____
Дата выполнения исследования: _____
Дата выдачи результата: _____

Наименование	Результат		Реф. интервал
Исследование АНФ	Титр	Тип свечения	<1:160
	1:320	Ядерное крупнокрапчатое (АС-5)	

Врач КДЛ: _____

М.П.

Б.

Наименование организации
Наименование лаборатории

Ф.И.О. пациента: _____
Возраст пациента: _____
Номер образца: _____
Диагноз(МКБ): _____
Метод: непрямая иммунофлюоресценция на клетках линии НЕР-2

Ф.И.О. врача: _____
Материал: Сыворотка
Дата поступления образца: _____
Дата выполнения исследования: _____
Дата выдачи результата: _____

Наименование	Результат		Реф. интервал
Исследование АНФ	Титр	Тип свечения	<1:160
	1:320	Ядерное гомогенное+крупнокрапчатое (АС-1+АС-5)	

Врач КДЛ: _____

М.П.

В.

Наименование организации
Наименование лаборатории

Ф.И.О. пациента: _____
Возраст пациента: _____
Номер образца: _____
Диагноз(МКБ): _____
Метод: непрямая иммунофлюоресценция на клетках линии НЕР-2

Ф.И.О. врача: _____
Материал: Сыворотка
Дата поступления образца: _____
Дата выполнения исследования: _____
Дата выдачи результата: _____

Наименование	Результат		Реф. интервал
Исследование АНФ	Титр	Тип свечения	<1:160
	1:640	Ядерное центромерное (АС-3)	
	1:320	Цитоплазматическое митохондриальное (АС-21)	

Врач КДЛ: _____

М.П.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО КРАТНОСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ АНТИНУКЛЕАРНОГО ФАКТОРА ПРИ СИСТЕМНЫХ АУТОИММУННЫХ РЕВМАТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

В повседневной клинической практике важное значение имеют вопросы, касающиеся кратности определения иммунологических маркеров у больных САРЗ [3]. При определении кратности исследований лабораторных биомаркеров должны учитываться:

- стадия заболевания;
- связь лабораторных биомаркеров с активностью заболевания;
- прогнозирование обострения, тяжести течения, прогрессирования заболевания;
- лабораторный мониторинг проводимой терапии;
- прогнозирование эффективности терапии;
- вероятность сероконверсии на фоне проводимой терапии;
- уровни позитивности аутоантител.

Определение АНФ методом НРИФ-НЕР-2 может проводиться с частотой 1 раз в 6 месяцев – 1 год.

Данный тест нецелесообразно использовать для мониторингирования активности патологического процесса в связи с отсутствием корреляции большинства типов свечения, кроме гомогенного (АС-1), с активностью заболевания [2, 12]. Кратность исследования АНФ при выявлении паттерна АС-1, ассоциирующегося с антителами к дсДНК и нуклеосомам, составляет 1 раз в 3 месяца, так как концентрация данных аутоантител в сыворотках больных СКВ коррелирует с активностью заболевания и может изменяться на фоне отрицательной сероконверсии в процессе иммуносупрессивной терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

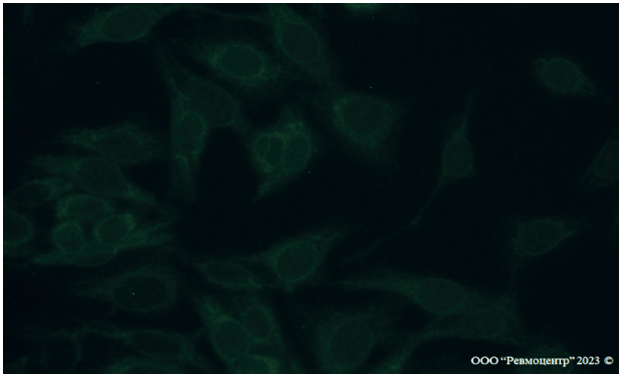
В последние годы отмечен значительный рост количества исследований АНА (АНФ) методом ПРИФ-НЕР-2, назначаемых ревматологами и врачами других специальностей в качестве эталонного скринингового теста для диагностики САРЗ, включая СКВ, ССД, БШ/СШ и ИВМ. Для обеспечения качества взаимодействия клиничко-диагностических и иммунологических лабораторий с клиническими подразделениями лечебно-профилактического учреждения необходимо внедрение в повседневную практику современных стандартов определения АНФ, разработанных на основе клинических рекомендаций и межлабораторного консенсуса, по вопросам, касающимся скрининговых и конечных титров АНФ, «АС» — номенклатуры типов ядерного, цитоплазматического и митотического свечения, порядка выполнения и перечня подтверждающих тестов для идентификации специфических антител к отдельным ядерным антигенам, кратности тестирования, создания унифицированной формы отчета о результатах исследования АНФ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

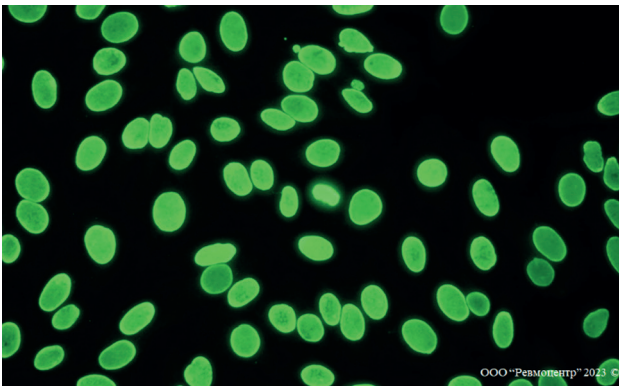
1. Автоматизированный анализ антинуклеарных антител методом непрямой реакции иммунофлюоресценции с использованием НЕР-2-клеток / Е. Н. Александрова, Ж. Г. Верижникова, А. А. Новиков [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2015. – Т. 60. – № 3. – С. 30–35.
2. Актуальные вопросы стандартизации исследования антинуклеарных антител методом непрямой иммунофлюоресценции на НЕР-2-клетках / Е. Н. Александрова, А. А. Новиков, С. П. Казаков [и др.] // Медицинский алфавит. – 2022. – № 29. – С. 36–40. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2022-29-36-40>
3. Александрова, Е. Н. Лабораторная диагностика ревматических заболеваний (клинические рекомендации) / Е. Н. Александрова, А. А. Новиков, Е. Л. Насонов // Лабораторная служба. – 2015. – Т. 4. – № 2. – С. 44–58. <https://doi.org/10.17116/labs20154244-58>
4. Вершинина М.Г., Казаков С.П., Федоскова Т.Г. с соавт. Рекомендации по преаналитическому этапу лабораторных исследований для диагностики аллергических заболеваний. // Учебно-методическое пособие / Под. ред. проф. С.А. Чорбинской. - Москва: ФГБУ ДПО ЦГМА УД Президента РФ, Издательский дом «Практическая медицина». - 2019.- 54 с.
5. Русскоязычная адаптация международной номенклатуры типов свечения ядра и цитоплазмы клетки (ICAP) для стандартизации выявления антинуклеарного фактора / О. Ю. Ткаченко, С. В. Лапин, А. В. Мазинг, А. А. Тотолян // Медицинская иммунология. – 2020. – Т. 22. – № 6. – С. 1195–1214. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-RVO-2067>
6. Современный взгляд на проблемы исследования антинуклеарных антител при

- системной красной волчанке (обзор литературы) / Е. Н. Александрова, А. А. Новиков, Ж. Г. Верижникова, Г. В. Лукина // Клиническая лабораторная диагностика. – 2018. – Т. 63. – № 6. – С. 340–348. <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-6-340-348>
7. Bossuyt, X. Detection of antinuclear antibodies: added value of solid phase assay? / X. Bossuyt, S. Fieuids // *Ann. Rheum. Dis.* – 2013. – Vol. 73, N 3. – P. e10. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204793>
 8. Clinical relevance of HEp-2 indirect immunofluorescent patterns: the International Consensus on ANA patterns (ICAP) perspective / J. Damoiseaux, L. E. C. Andrade, O. G. Carballo [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* – 2019. – Vol. 78, N 7. – P. 879–889. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-214436>
 9. Current concepts and future directions for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies / M. Mahler, P. L. Meroni, X. Bossuyt, M. J. Fritzler // *J. Immunol. Res.* – 2014. – Vol. 2014. – P. 315179. <https://doi.org/10.1155/2014/315179>
 10. Current state of diagnostic technologies in the autoimmunology laboratory / R. Tozzoli, C. Bonaguri, A. Melegari [et al.] // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 2013. – Vol. 51, N 1. – P. 129–38. <https://doi.org/10.1515/cclm-2012-0191>
 11. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: antinuclear antibody testing / D. H. Solomon, A. J. Kavanaugh, P. H. Schur [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2002. – Vol. 47, N 4. – P. 434–44. <https://doi.org/10.1002/art.10561>
 12. How to report the antinuclear antibodies (anti-cell antibodies) test on HEp-2 cells: guidelines from the ICAP initiative / C. A. von Muhlen, I. Garcia-De La Torre, M. Infantino [et al.] // *Immunol. Res.* – 2021. – Vol. 69, N 6. – P. 594–608. <https://doi.org/10.1007/s12026-021-09233-0>
 13. International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies / N. Agmon-Levin, J. Damoiseaux, C. Kallenberg [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* – 2014. – Vol. 73, N 1. – P. 17–23. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-203863>
 14. Meroni, P. L. ANA screening: an old test with new recommendations / P. L. Meroni, P. H. Schur // *Ann. Rheum. Dis.* – 2010. – Vol. 69, N 8. – P. 1420–2. <https://doi.org/10.1136/ard.2009.127100>
 15. Range of antinuclear antibodies in «healthy» individuals / E. M. Tan, T. E. Feltkamp, J. S. Smolen [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 1997. – Vol. 40, N 9. – P. 1601–11. <https://doi.org/10.1002/art.1780400909>
 16. Satoh, M. The uses and misuses of multiplex autoantibody assays in systemic autoimmune rheumatic diseases / M. Satoh, S. Tanaka, E. K. Chan // *Front. Immunol.* – 2015. – Vol. 6. – P. 181. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00181>
 17. Standardization of autoantibody testing: a paradigm for serology in rheumatic diseases / P. L. Meroni, M. Biggioggero, S. S. Pierangeli [et al.] // *Nat. Rev. Rheumatol.* – 2014. – Vol. 10, N 1. – P. 35–43. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2013.180>
 18. The International Consensus on ANA Patterns (ICAP) in 2021-The 6th Workshop and Current Perspectives / E. K. Chan, C. A. von Muhlen, M. J. Fritzler [et al.] // *J. Appl. Lab. Med.* – 2022. – Vol. 7, N 1. – P. 322–330. <https://doi.org/10.1093/jalm/jfab140>

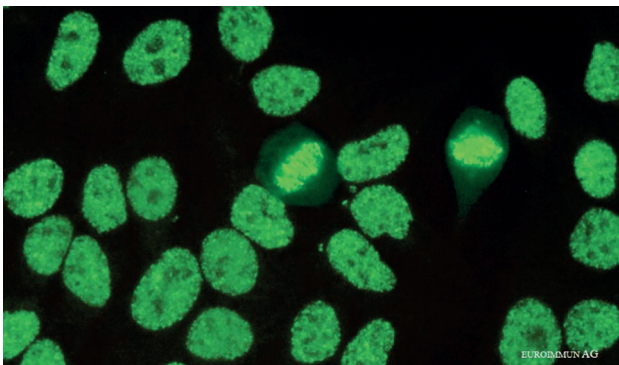
**ИЗОБРАЖЕНИЯ ТИПОВ СВЕЧЕНИЯ АНТИНУКЛЕАРНОГО ФАКТОРА
ПРИ СИСТЕМНЫХ АУТОИММУННЫХ РЕВМАТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ**
АС-0 Отрицательное (Negative)



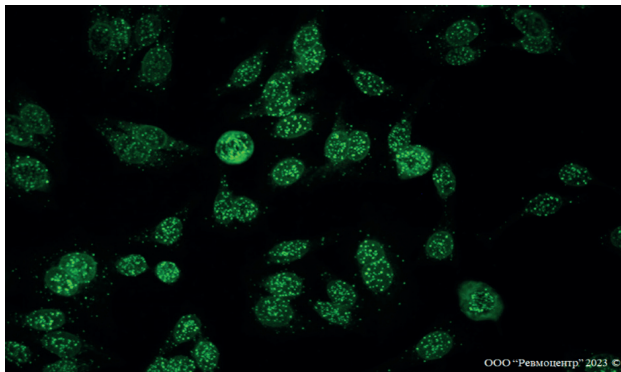
АС-1 Гомогенное (Homogeneous)



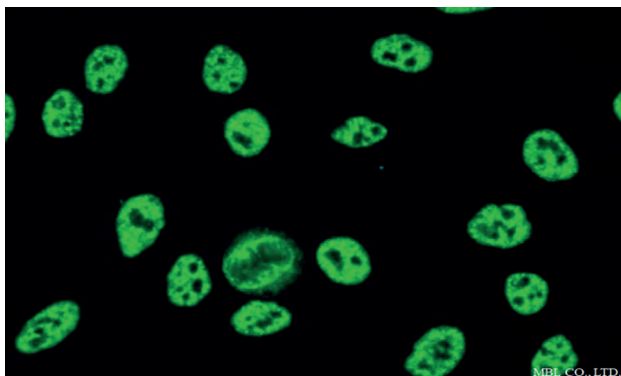
АС-2 Плотное мелкокрапчатое (Dense fine speckled)



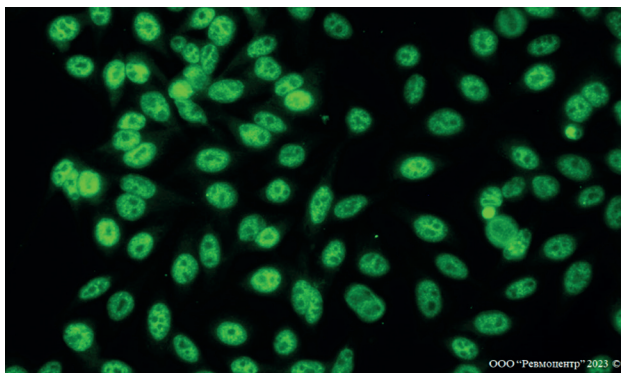
АС-3 Центромерное (Centromere)



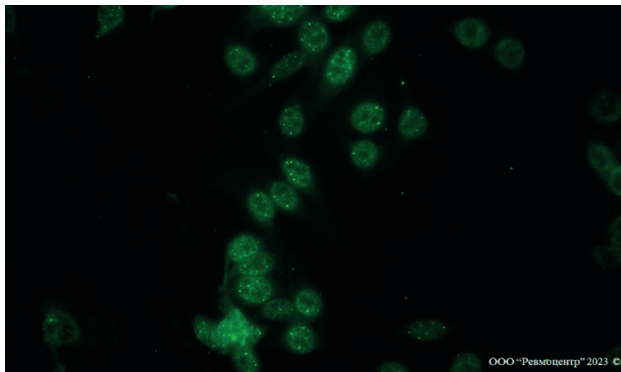
АС-4 Мелкокрапчатое (Fine speckled)



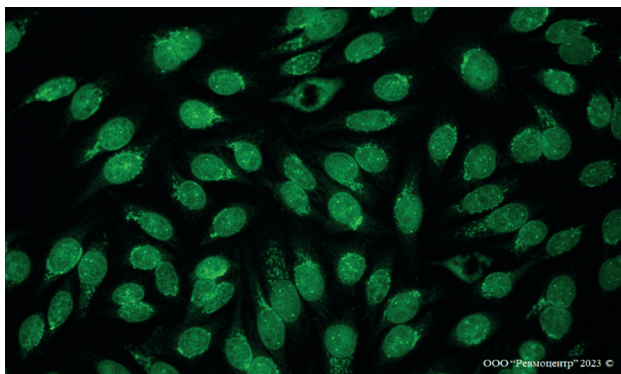
АС-5 Крупнокрапчатое (Large speckled)



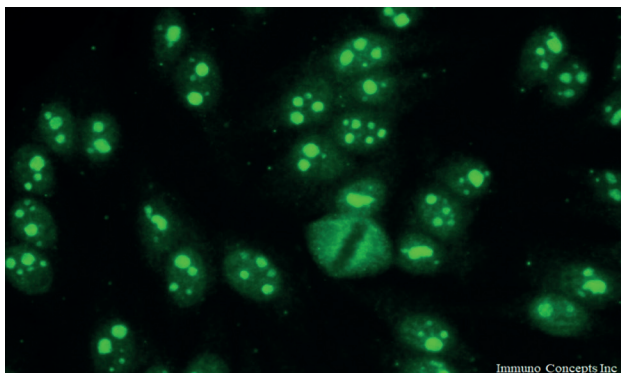
АС-6 Множественные точки в ядре (Multiple nuclear dots)



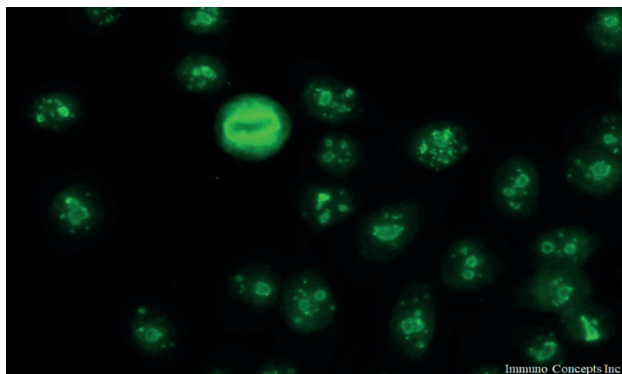
АС-7 Единичные точки в ядре (Few nuclear dots)



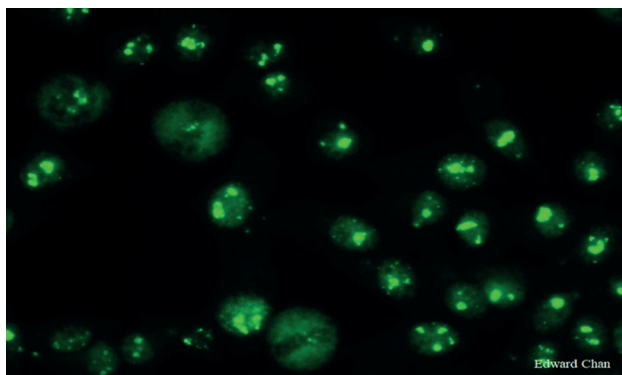
АС-8 Гомогенное нуклеолярное (Homogeneous nucleolar)



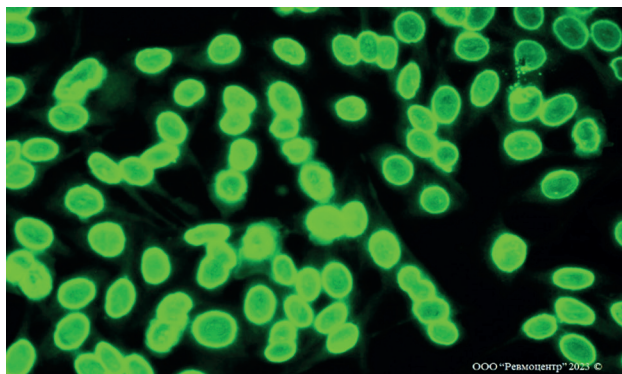
АС-9 Глыбчатое нуклеолярное (Clumpy nucleolar)



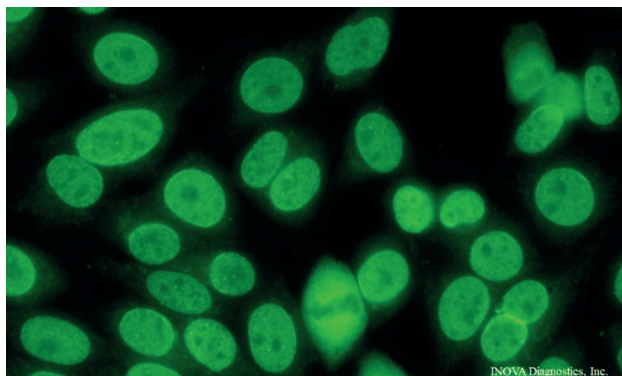
АС-10 Точечное нуклеолярное (Punctate nucleolar)



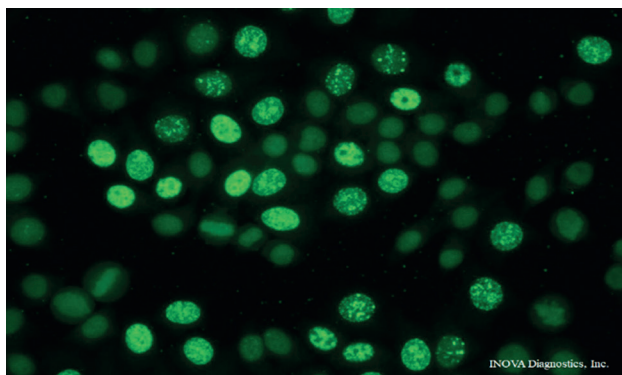
АС-11 Ядерное мембранное гладкое (Smooth nuclear envelope)



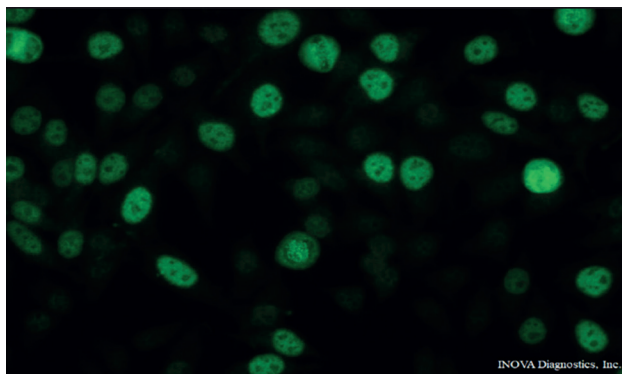
AC-12 Ядерное мембранное точечное (Punctate nuclear envelope)



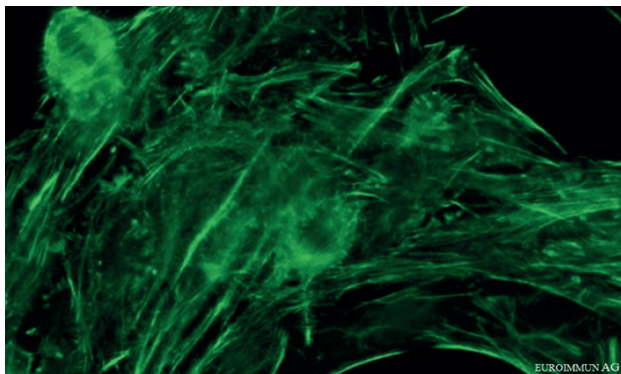
13 PCNA



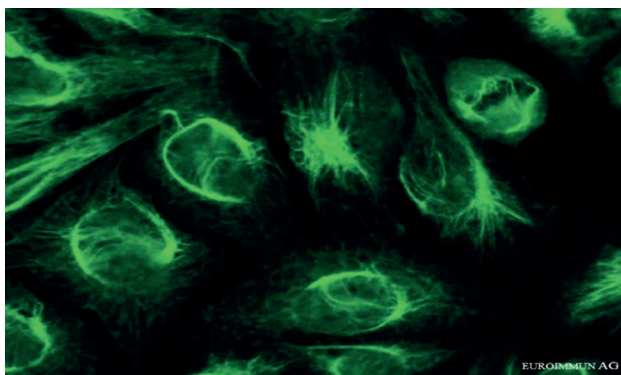
AC-14 CENP-F



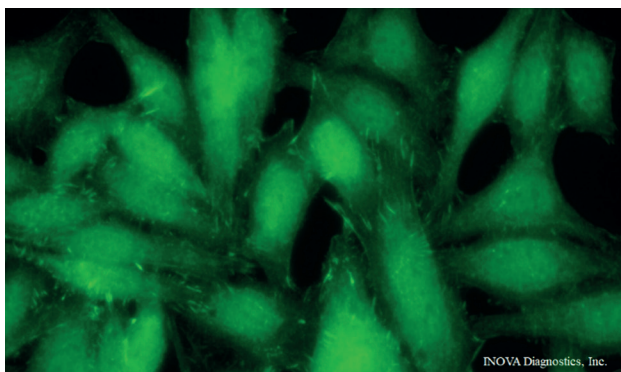
AC-15 Фибриллярное линейное (Fibrillar linear)



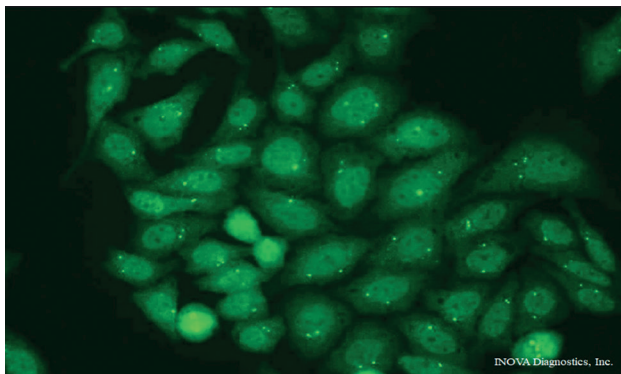
AC-16 Фибриллярное нитевидное (Fibrillar filamentous)



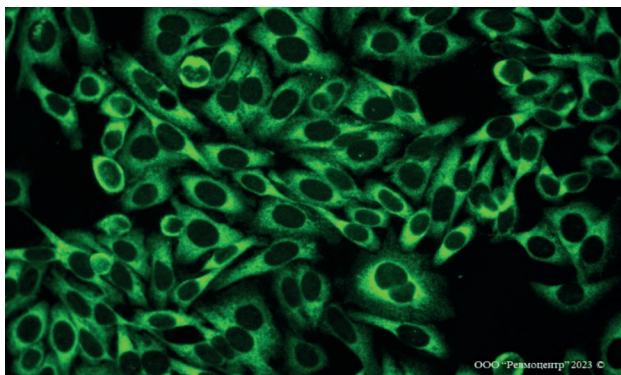
AC-17 Фибриллярное сегментарное (Fibrillar segmental)



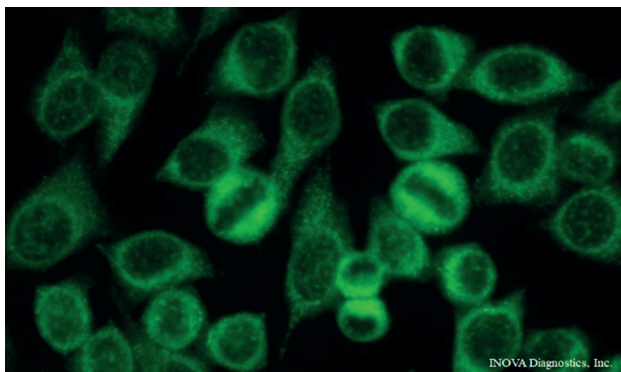
АС-18 Дискретные точки (Discrete dots)



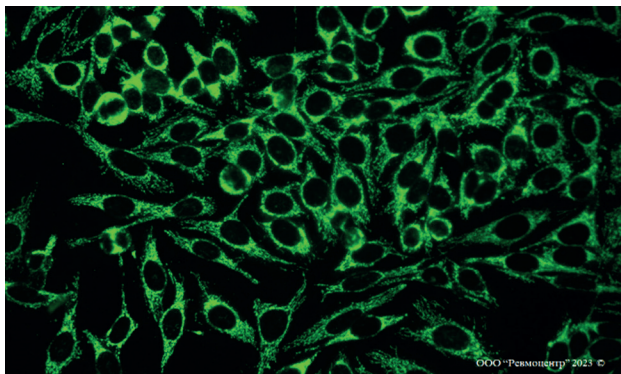
АС-19 Плотное мелкокрапчатое (Dense fine speckled)



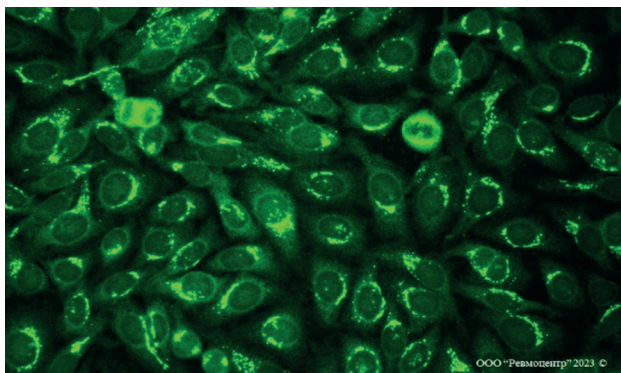
АС-20 Мелкокрапчатое (Fine speckled)



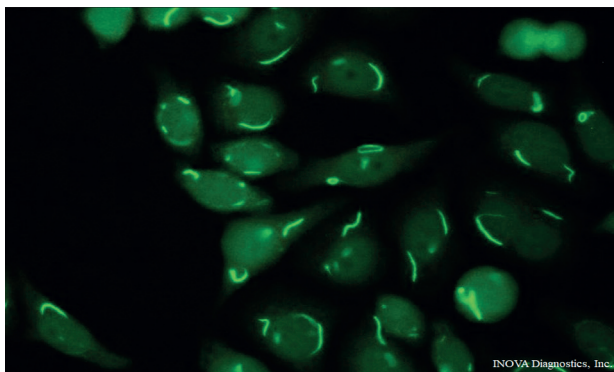
АС-21 Митохондриальное (АМА)



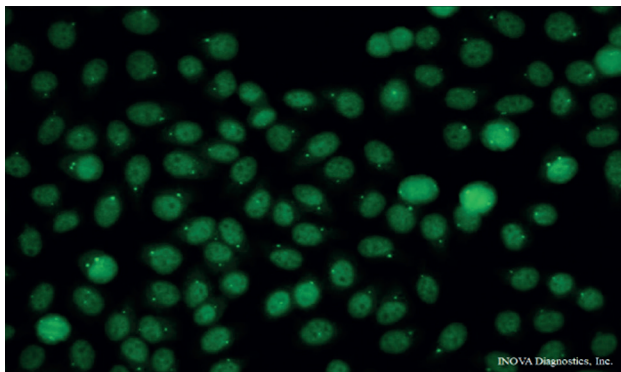
АС-22 Гольджи (Golgi)



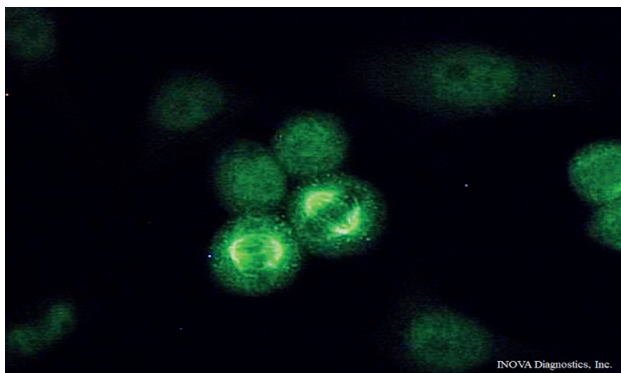
АС-23 Палочки и кольца (Rods and rings)



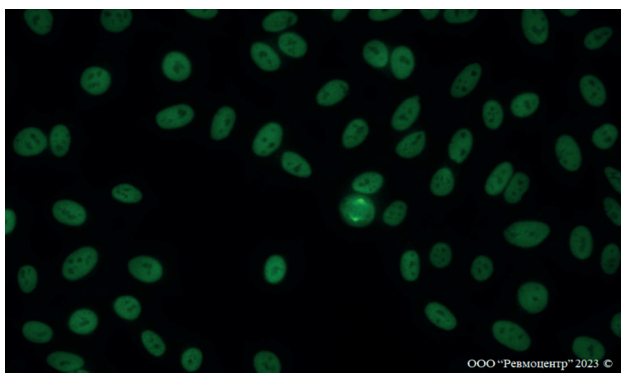
AC-24 Центросомы (Centrosome)



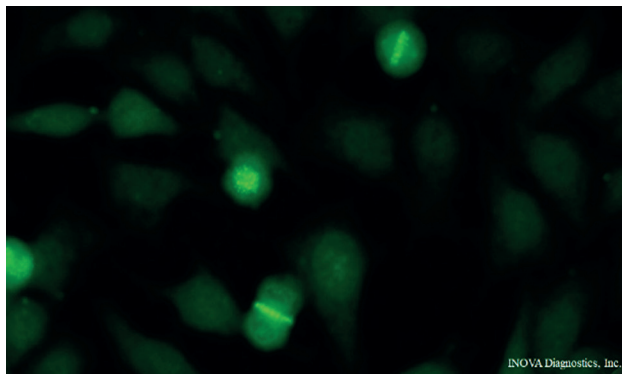
AC-25 Веретено деления (Spindle fibers)



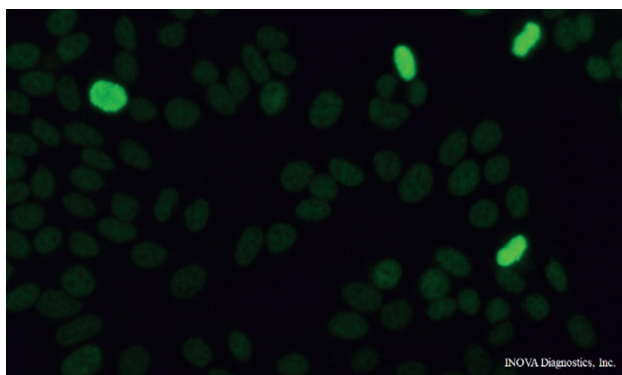
AC-26 NuMA



АС-27 Межклеточный мостик



АС-28 Митотические хромосомы



АС-29 Топоизомераза I (Торо I)

