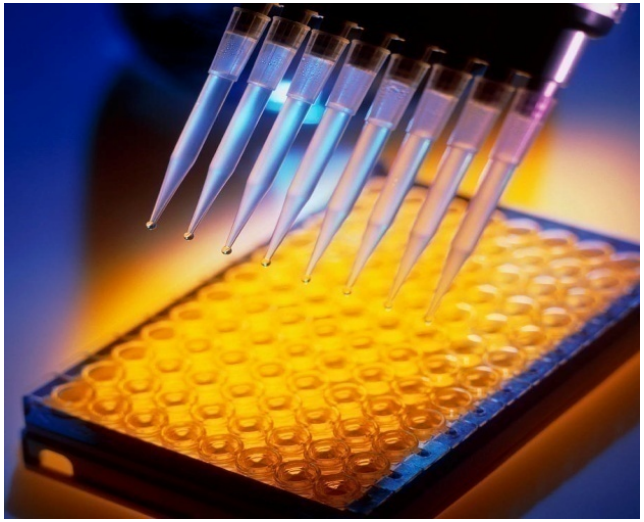
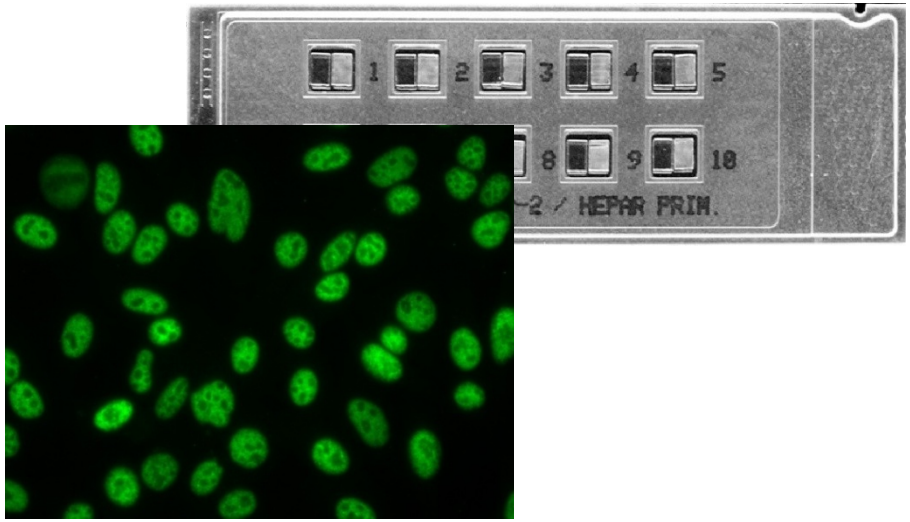
Серологические маркеры аутоиммунных заболеваний:

методы детекции, клиническая значимость, экономические аспекты





Скрипник Виктор Викторович

CORMAYGROUP

Санкт-Петербург, 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

Актуальность проблемы АИЗ

Частота встречаемости в популяции составляет до 2%

Преимущественно поражают население трудоспособного возраста, чаще женщин

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

(Насонов Е.Л., 2003)

Причины развития АИЗ

Попадание в кровоток секвестрированных («забарьерных») антигенов

Экспрессия новых детерминант

Отдельные гаплотипы генов кластера HLA

Молекулярная мимикрия

Поликлональная активация В-клеток

(Ярилин А.А., 1999)

Аутоантитела – основные серологические маркеры АИЗ

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. Скрининговые исследования

2. Дифференциальная диагностика

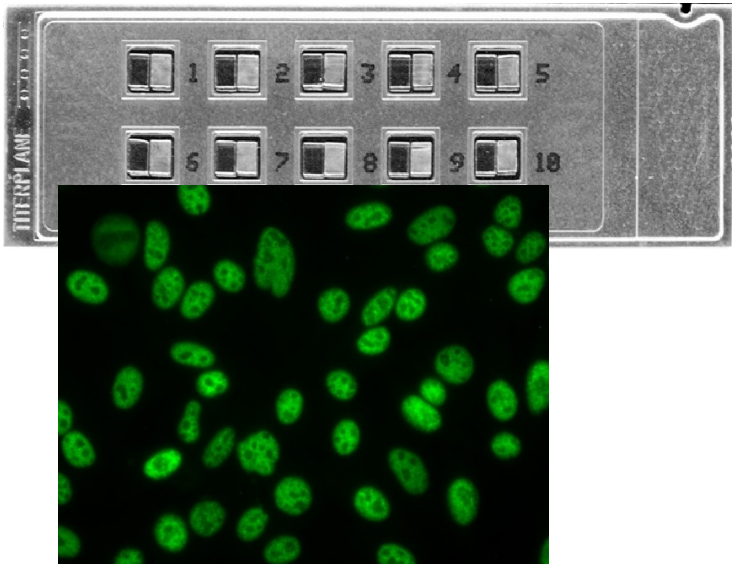
3. Динамическое наблюдение

4. Оценка эффективности лечения

CORMAYGROUP

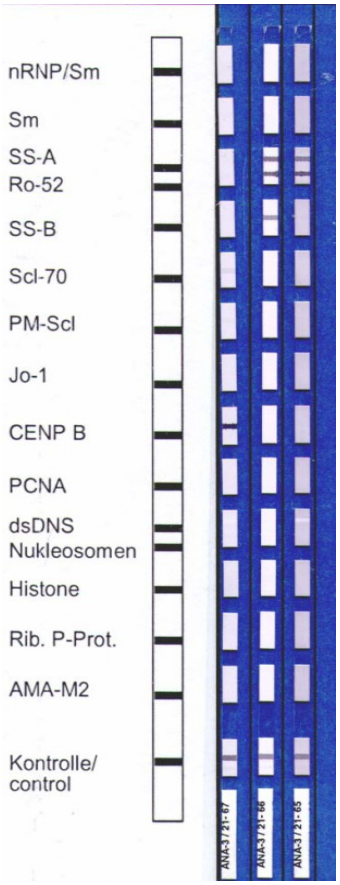
Методы детекции аутоантител

Непрямая иммунофлуоресценция (нРИФ)



Иммуноферментный Анализ (ИФА)

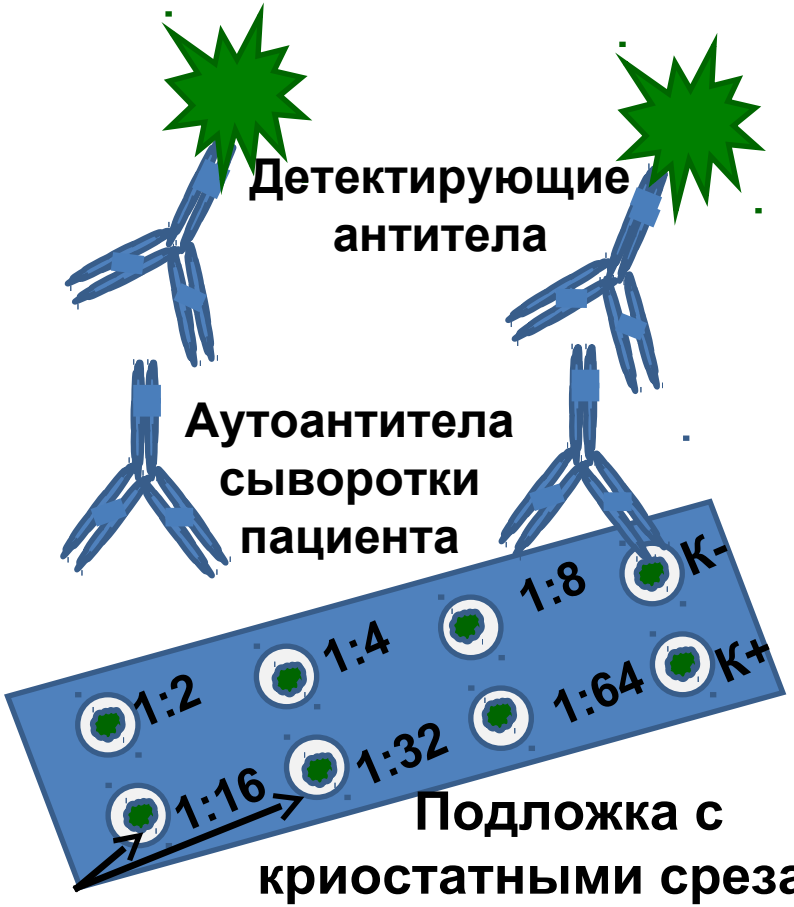
Лайн-блот



Мультиплексные тест-системы на магнитных частицах

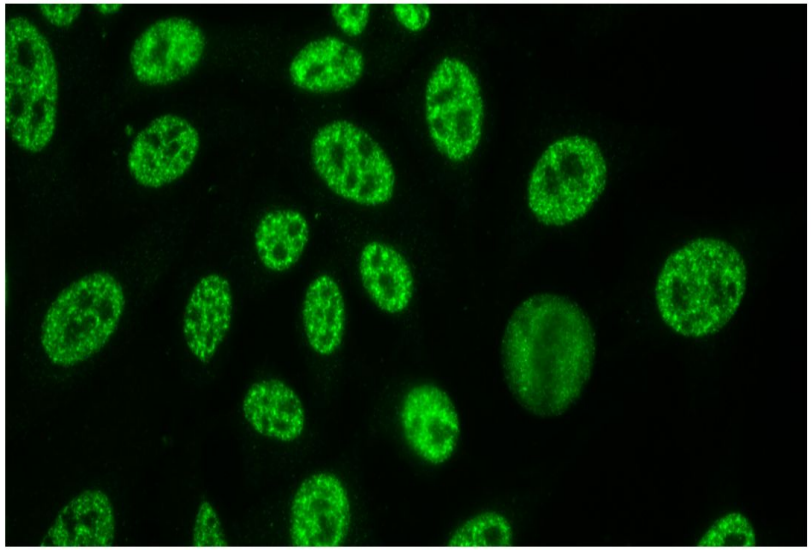
CORMAYGROUP

Непрямая иммунофлуоресценция



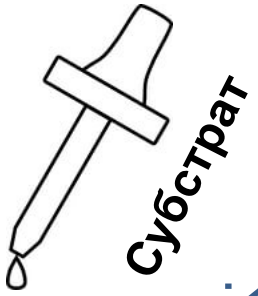
Титр сыворотки

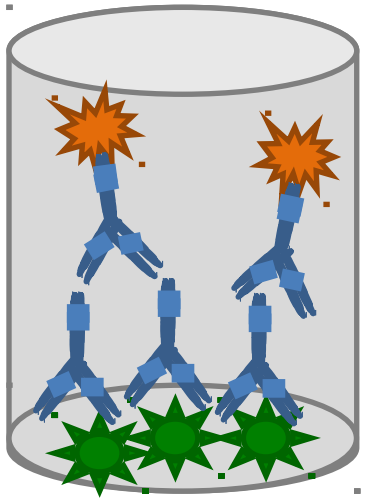
Подложка с криостатными срезами ткани или клеточным монослоем



Результат исследования – окрашивание определенных клеточных органелл или структур ткани

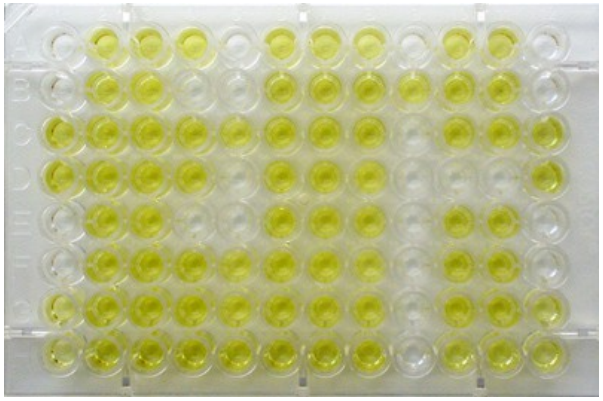
Иммуноферментный анализ





Антитела, меченные ферментом

Аутоантитела сыворотки пациента



Лунка с рекомбинатным и/или высокоочищенным иммобилизированным белком

Количественный результат, рассчитывается по калибровочной кривой

Непрямая иммунофлуоресценция

Экранирование антигена

Снижение чувствительности

Перекрестные реакции

Снижение специфичности

NOTA BENE!

Обычно используются ксеноантигены или аллоантигены

CORMAYGROUP

Иммуноферментный анализ (ИФА)

Лунка ИФА-планшета

Я не узнаю Вас в гримме

Потеря антигенных детерминант

Снижение чувствительности

Образование неоэпитопов

Снижение специфичности

Отрицательно заряженный полистирол

CORMAYGROUP

Методы детекции аутоантител

Параметр	нРИФ	ИФА	Лайн-блот
Учет результата	Визуальный	Аппаратный	
Тип результата	П/количеств.	Количеств.	П/количеств.
Автоматизация	Нет	Да	
Предел чувствительности метода	0,05 нг/мл	0,05 нг/мл	0,5 нг/мл

CORMAYGROUP

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 (ACCP); 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)

CORMAYGROUP

Стандартизация определения аутоантител

Сыворотка	Показатель	Активность
WHO 1064	ANA	100 МЕ
WHO Wo80	Антитела к двуцепочечной ДНК	100 МЕ
WHO 1066	Ревматоидный фактор	100 МЕ
65/93	Антитела к тиреоглобулину	1000 МЕ
97/658	Антитела к кардиолипину	100 GLP 100 MLP

CORMAYGROUP

Контроль качества

Внутрилабораторный

- ✓ Коммерческий контрольный материал
- ✓ Лабораторный контрольный материал

ФСВОК-2017

- ✓ Ат к глиадину
- ✓ Ат к трансглутаминазе
- ✓ ANA, dsDNA
- ✓ Ат к кардиолипину
- ✓ Ат к β-2-гликопротеину
- ✓ Ат к ТПО, Ат к ТГ
- ✓ ANCA
- ✓ ACCP, РФ

CORMAYGROUP

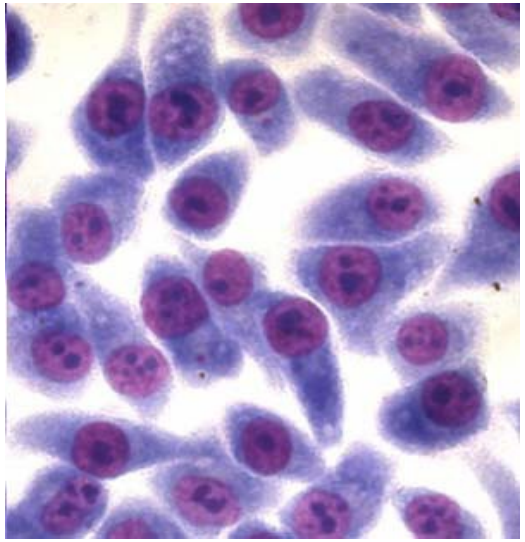
Маркеры основных АИЗ

CORMAYGROUP

Антинуклеарный фактор (АНФ)

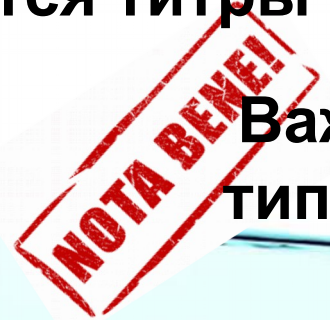
АНФ – группа аутоантител, состоящая из более чем 100 различных антител

Основной метод детекции - нРИФ



Hep-2 – основной субстрат нРИФ

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

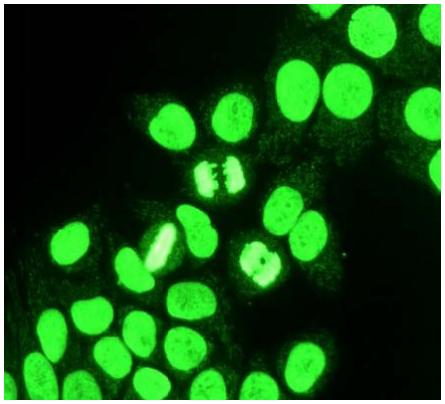


Важно учитывать тип свечения ядра

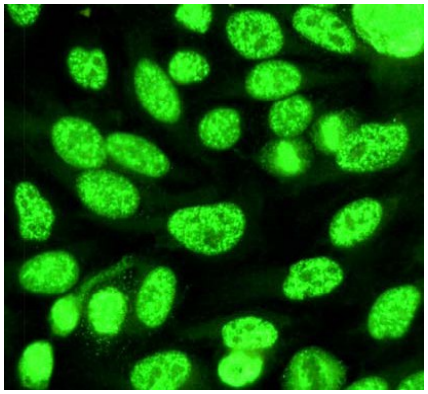
CORMAYGROUP

АНФ: метод нРИФ, типы окрашивания

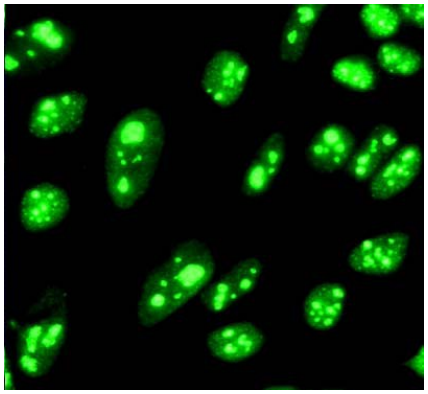
Гомогенный



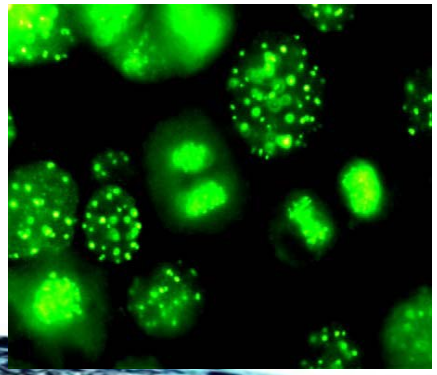
Гранулярный



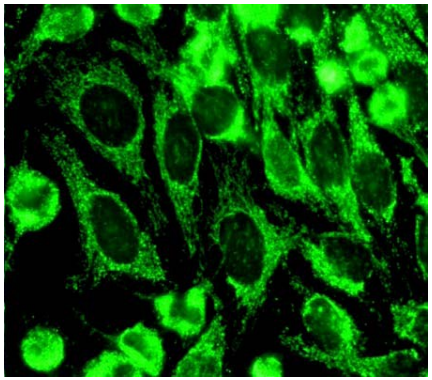
Ядрышковый



Центромерный



Цитоплазматический



(Лапин С.В. с соавт., 2010)

Системная красная волчанка (СКВ)

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

11 диагностических критериев СКВ

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

11. АНФ

10. dsDNA, Sm, LE-клетки

(Arthritis Rheum., Vol.25, P.1271-1277, 1982)

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)

Синдром Шегрена (СШ)

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

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

(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
- Ревматоидные узелки

5. РФ

(Rheumatism, Vol. 31, P. 315-324, 1988)

Серологические маркеры РА

Антитела	*Чувствит.*	*Специфичн.*	*Ранний артрит* (Чувст.; специф.)
ANA	~20%	~30%	<20%; <20%
РФ, IgM	~80%	~70%	<20%; <20%
ACCP, IgG	~80%	>90%	65%; 95%
AMCV, IgG	~75%	>90%	78%; 88%
RA-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)

CORMAYGROUP

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. Антикардиолипиновые А/т
3. А/т к β2-гликопротеину

(Venables P.J., 1989)

Серологические маркеры АФС

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

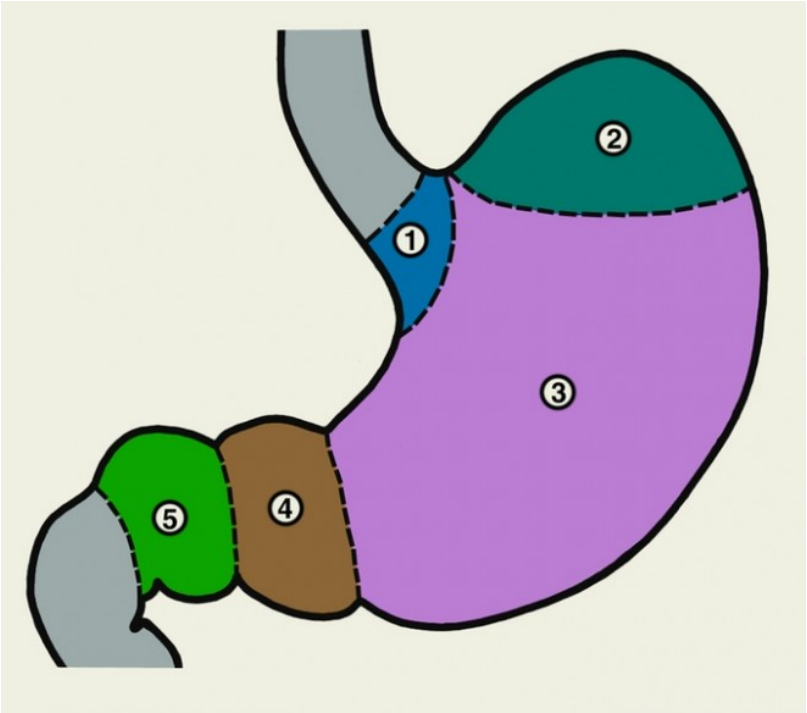
(Stephen M., 2007)

Аутоиммунные заболевания ЖКТ

- Гастрит типа А
- Целиакия
- Болезнь крона (БК)
- Неспецифический язвенный колит (НЯК)
- Аутоиммунный гепатит (АИГ)

CORMAYGROUP

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 B_{12}

Встречается у 20-30% больных с эндокринопатиями

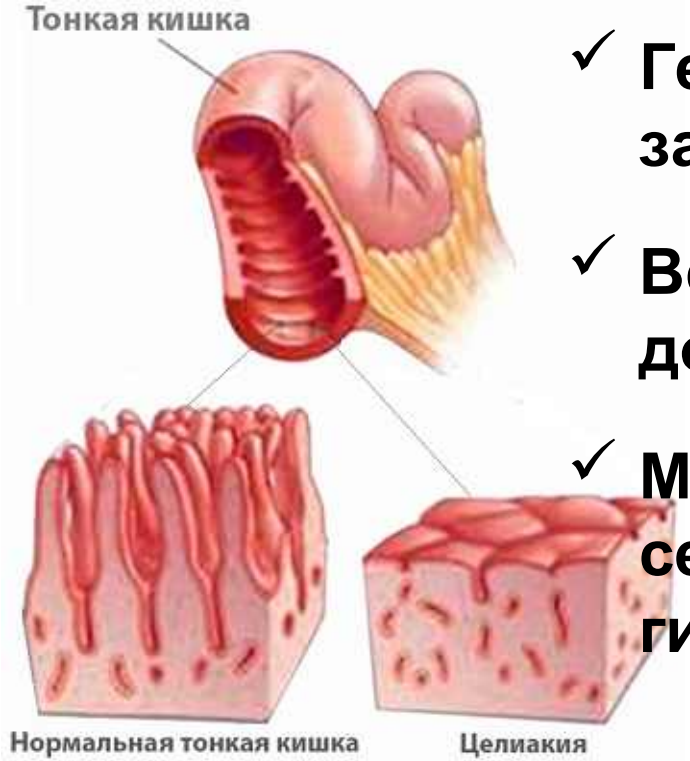
Серологические маркеры гастрита типа А и пернициозной анемии

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

CORMAYGROUP

Целиакия (глютеновая энтеропатия)

Целиакия – иммуноопосредованная непереносимость α-глиадина – основного белка клейковины



- ✓ **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

CORMAYGROUP

Серологические маркеры целиакии

Антитела	*Чувствит.*	*Специфичн.*
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

CORMAYGROUP

Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК)

Неспецифический язвенный колит

Болезнь Крона

Воспалительное заболевание стенки кишки

Типичная локализация:

толстая кишка

Поражение

слизистой оболочки

Типичная локализация:

подвздошная кишка

Трансмуральное

поражение стенки кишки

Гистология:

наличие гранулем

CORMAYGROUP

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

CORMAYGROUP

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

CORMAYGROUP

CORMAYGROUP

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

CORMAYGROUP

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**

CORMAYGROUP

Chorus TRIO - автоматический «стриповый» ИФА-анализатор

DIESSE

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

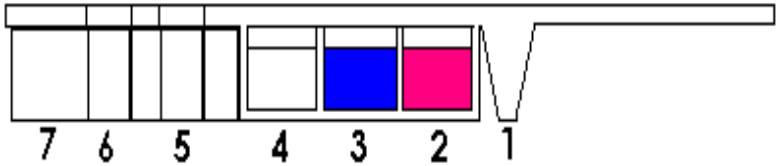
CORMAYGROUP

Стрип-полоски

INNOVATIVE CLINICAL DIAGNOSTIC SYSTEMS

- ✓ Готовый к использованию стрип для проведения одного теста содержит все необходимые реагенты
- ✓ Каждый стрип имеет штрих-код со всей необходимой информацией

- ✓ Программное обеспечение проверяет информацию о стрипе во избежание ошибок
- ✓ Объем пробы на 1 анализ: 50 мкл (ИФА) и 150 мкл (РСК)



1. **Лунка для образца**
2. **Лунка с конъюгатом**
3. **Лунка с разбавителем**
4. **Лунка с субстратом**
5. **Лунка без антител**
6. **Лунка с антителами**
7. **Свободная лунка**

Контрольные материалы и калибраторы

INNOVATIVE CLINICAL DIAGNOSTIC SYSTEMS

- ✓ Каждый набор содержит калибровочный и положительный контрольный образец
- ✓ Калибровка обязательно выполняется для каждого нового лота реагентов
- ✓ Память анализатора позволяет хранить до 2-х калибровок для каждого теста

Инфекционные заболевания (ИФА)

INNOVATIVE CLINICAL DIAGNOSTIC SYSTEMS

Вирусные инфекции:

- ✓ Вирус Эпштейн-Барр EBNA IgG
- ✓ Вирус Эпштейн-Барр VCA IgM/IgG
- ✓ Вирус Эпштейн-Барр EA IgM/IgG
- ✓ Вирус паротита IgM/IgG
- ✓ Вирус кори IgM/IgG
- ✓ Вирус ветряной оспы IgM/IgG
- ✓ Вирус тосканской лихорадки IgM/IgG

TORCH-комплекс:

- ✓ Токсоплазма IgM/IgA/IgG/авидность
- ✓ Краснуха IgG/IgM/авидность
- ✓ Цитомегаловирус IgG/IgM/авидность
- ✓ Вирус простого герпеса 1+2 IgM/IgG
- ✓ Вирус простого герпеса 1 IgM/IgG
- ✓ Вирус простого герпеса 2 IgM/IgG

Бактериальные инфекции:

- ✓ Mycoplasma pneumoniae IgG/IgM
- ✓ Helicobacter pylori IgA/IgG
- ✓ Treponema pallidum IgM/IgG/Screen

Инфекционные заболевания (РСК)

INNOVATIVE CLINICAL DIAGNOSTIC SYSTEMS

Вирусные инфекции:

- ✓ Вирус гриппа А /В
- ✓ Вирус парагриппа
- ✓ Аденовирус
- ✓ Респираторно-синцитиальный вирус
- ✓ Вирус лихорадки Q
- ✓ Вирус ECHO N/P
- ✓ Вирус коксаки А/В
- ✓ Вирус полиомиелита
- ✓ Реовирусы

Бактериальные инфекции:

- ✓ Listeria monocytogenes
- ✓ Brucella
- ✓ Leptospira
- ✓ Campylobacter jejuni
- ✓ Shigella flexneri
- ✓ Borrelia
- ✓ Bordetella pertussis
- ✓ Chlamydia
- ✓ Mycoplasma pneumoniae
- ✓ Legionella pneumophila
- ✓ Yersinia enterocolitica

Аутоиммунные заболевания (ИФА)

INNOVATIVE CLINICAL DIAGNOSTIC SYSTEMS

ЖКТ:

- ✓ LKM-1 IgG
- ✓ LC-1 IgG
- ✓ tTg IgA/IgG
- ✓ Gliadin IgA/IgG
- ✓ AMA-2 IgG
- ✓ ASCA IgA/IgG

Тромбоз:

- ✓ Cardiolipin IgM/IgG
- ✓ β2-Glycoprotein IgM/IgG

Васкулит:

- ✓ MPO IgG
- ✓ PR3 Sensitive IgG

Щитовидная железа:

- ✓ Anti-Tg/Anti-TPO
- ✓ Thyroglobulin

Ревматология:

- ✓ dsDNA IgG
- ✓ ANA-8 IgG
- ✓ ENA-6 S IgG
- ✓ SS-A IgG/SS-B IgG
- ✓ snRNP-c IgG
- ✓ U170 IgG
- ✓ Sm IgG
- ✓ Jo-1 IgG
- ✓ Scl 70 IgG
- ✓ Cenp B IgG
- ✓ CCP IgG

Преимущества

INNOVATIVE CLINICAL DIAGNOSTIC SYSTEMS

- ✓ Широкая панель востребованных тестов
- ✓ Минимальные трудозатраты врачей лаборатории
- ✓ Возможность использования анализатора для выполнения «редких» тестов и тестов в режиме «cito»
- ✓ Выполнение РСК-тестов в автоматическом режиме
- ✓ Высокая точность и воспроизводимость результатов
- ✓ Отсутствие необходимости накапливать образцы и хранить их в заморозке

Выводы:

1. ИФА – метод, широко используемый 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. 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

CORMAYGROUP

CORMAY GROUP

Биохимические анализаторы

CORMAYGROUP

MULTI +

ACCENT-200

ACCENT-300

Реагенты для биохимии

Для открытых систем

Для Sapphire,
Olympus/Beckman Coulter,
Hitachi и пр.

Реагенты для гематологии

Реагенты и контрольные материалы для гематологии

- Реагенты для всех 3-diff анализаторов,
- Реагенты для большинства 5-diff анализаторов,
- Контрольные материалы

Гематологический анализатор

Mythic 22 AL

Самый компактный 5-diff анализатор с автоподатчиком проб

Спасибо за внимание!

CORMAYGROUP

Российский офис CORMAY GROUP

ООО “КОРМЕЙ РУСЛАНД”

127410 г. Москва,

Алтуфьевское шоссе д. 41 А, офис 52

тел/факс: 8-495-221-58-49; www.cormay.ru

Менеджер по ПФО: **Апсите Наталья Сергеевна**

e-mail: **28@cormay.ru**

Тел: **8-495-221-58-49 доб. 28**