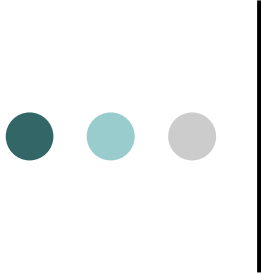


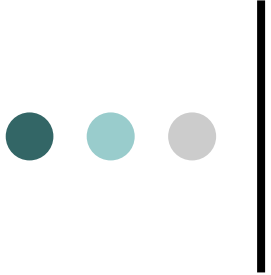
«Диагностика аутоиммунных заболеваний: методы и показатели»

Костецкая Наталья Ивановна, к.м.н.



Распространенность аутоиммунных заболеваний

Встречаемость АИЗ	Типичные представители	Популяционная частота
Частые	Аутоиммунный тиреоидит, ревматоидный артрит, псориаз	0,1-1%
Редкие	СКВ, СД 1 типа, РС, гломерулонефриты, целиакия, витилиго	0,01-0,0001%
Очень редкие	Б. Аддисона, с-м Гудпасчера, с-м Гийена – Барре	Менее 0,0001%



Определение аутоиммунитета

- Хроническое воспаление неизвестной этиологии
- Связь заболевания с генами системы HLA
- Терапия иммуносупрессивными препаратами
- Аутоантитела в сыворотке крови и биологических жидкостях

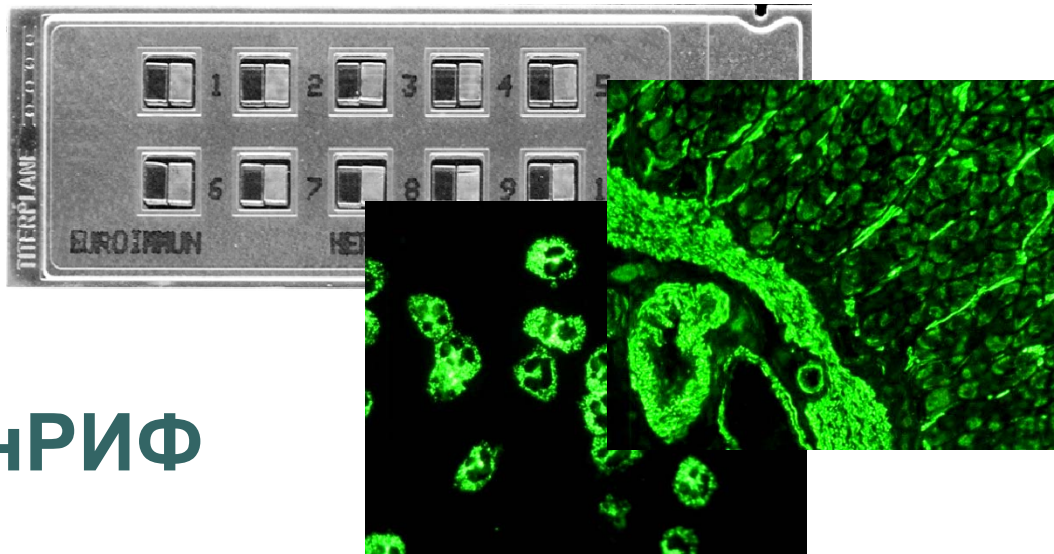


Выявление аутоантител

- Антитела представляют собой поликлональные популяции белков с разной аффинностью к антигенам
- АутоАТ против сходных антигенов- семейства ауто АТ (АНФ, АНЦА и др.)
- Количество и аффинность варьирует во времени
- Поликлональные низкоаффинные антитела встречаются в норме
- Для определения клинико-лабораторной взаимосвязи должен быть точно определен **основной аутоантиген** и уровень связывания с ним

Методические возможности выявления антител

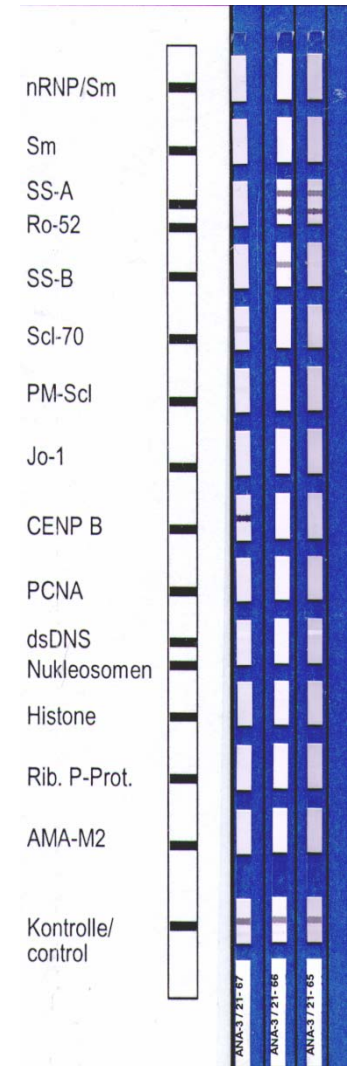
ИРИФ



ИФА

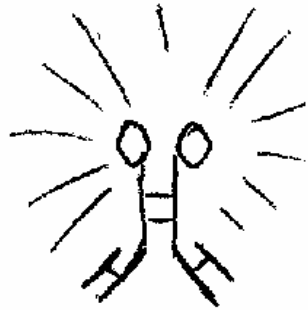


БЛОТ



Непрямая / прямая иммунофлюоресценция (ИРИФ)

2-й этап



**Античеловеческая
сыворотка, меченная
флюоресцеином**

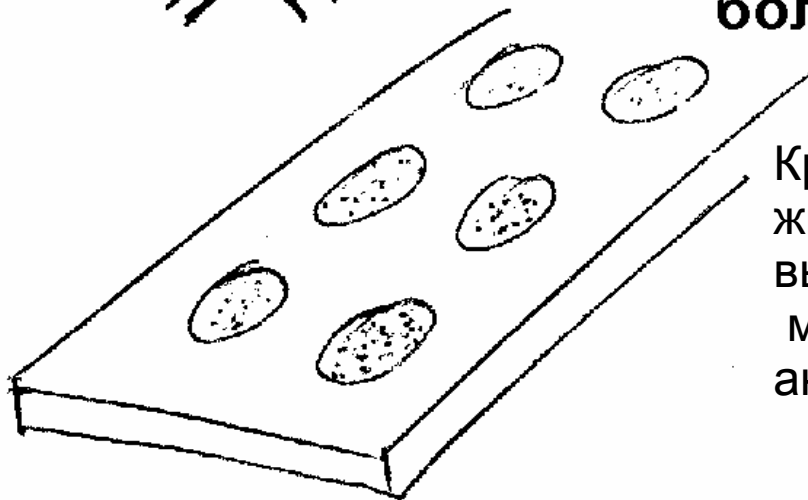
Монтирование в
щелочном глицерине
(pH=8,3) и ФЛ-
микроскопия

1-й этап



**Аутоантитела
в сыворотке
больного**

Серийные разведения
сыворотки больного в
буфере близком
сыворотке крови



Криосрезы ткани лабораторных
животных, клеточные линии,
выделенные клеточные популяции,
могут быть нанесены очищенные
антигены (spot-IFF)



Особенности нРИФ

- Полуколичественный результат (титр) - **мера как количества, так и аффинности антител**
- Использование нативных антигенов, оценка аутоантител к конформационным и нерастворимым антигенам
- В материале множество антигенов, что приводит к различным вариантам «окрашивания» морфологических структур — **удобно для скрининга**
- Возможно «маскирование антител» за счет множества перекрестных реакций
- Субъективность учета результатов



Иммуноферментный метод (ИФА)

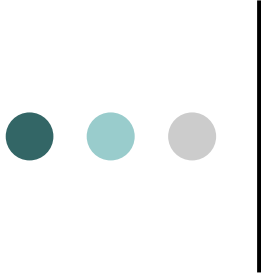
- Очистка/синтез антигена – **изменение его структуры**
- Сорбция антигена на пластике – **перекрестные реакции при смеси антигенов**, реакции с блокирующим веществом
- Связывание аутоантител с антигеном в лунках планшета – **зависит от концентрации Ig**
- Количественная стандартизация метода с помощью набора стандартов и контролей
- Простота и объективность в оценке результатов

Сравнение нРИФ и ИФА

Метод	нРИФ	ИФА
Определяемый параметр	аффинно-зависимый	концентрационно-зависимый
Содержание IgG	не зависит	зависит
Число мишеней	много антигенов	один антиген
Денатурация антигена	редко	часто
Реакции с блокирующим в-вом	редко	часто
Растворимый аг	не используется	используется
Автоматизация	плохо	хорошо

● ● ● | Иммуноблоттинг (лайн-блот)

- Классический иммуноблоттинг (Вестерн-блот) — метод, включающий разделение белков и их перенос на нитроцеллюлезную мембрану, окраска сывороткой с последующей детекцией с помощью хромогена
- В методах **дот-блота/лайн-блота** используются очищенные белки, нанесенные на мембрану
- Много антигенов в одной реакции — **«мультиплексный анализ»**
- Дальнейшая миниатюризация реализуется в биочипах — высокая чувствительность и информативность
- Планарные биочипы/жидкие биочипы



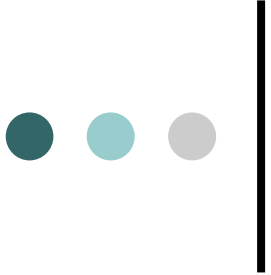
Решение клинических задач с разными лабораторными методами

Задача обследования	Используемый метод
Скрининг аутоантител при ранней диагностике	нРИФ
Дифференциальная диагностика	Иммуноблот
Мониторинг эффективности терапии	ИФА, иммунохимия



Основные группы тестов

- Диагностика диффузных болезней соединительной ткани
- Диагностика васкулитов
- Диагностика артритов
- Аутоиммунные поражения печени и ЖКТ
- Эндокринология
- Неврология
- Заболевания легких
- Диагностика парапротеинемий

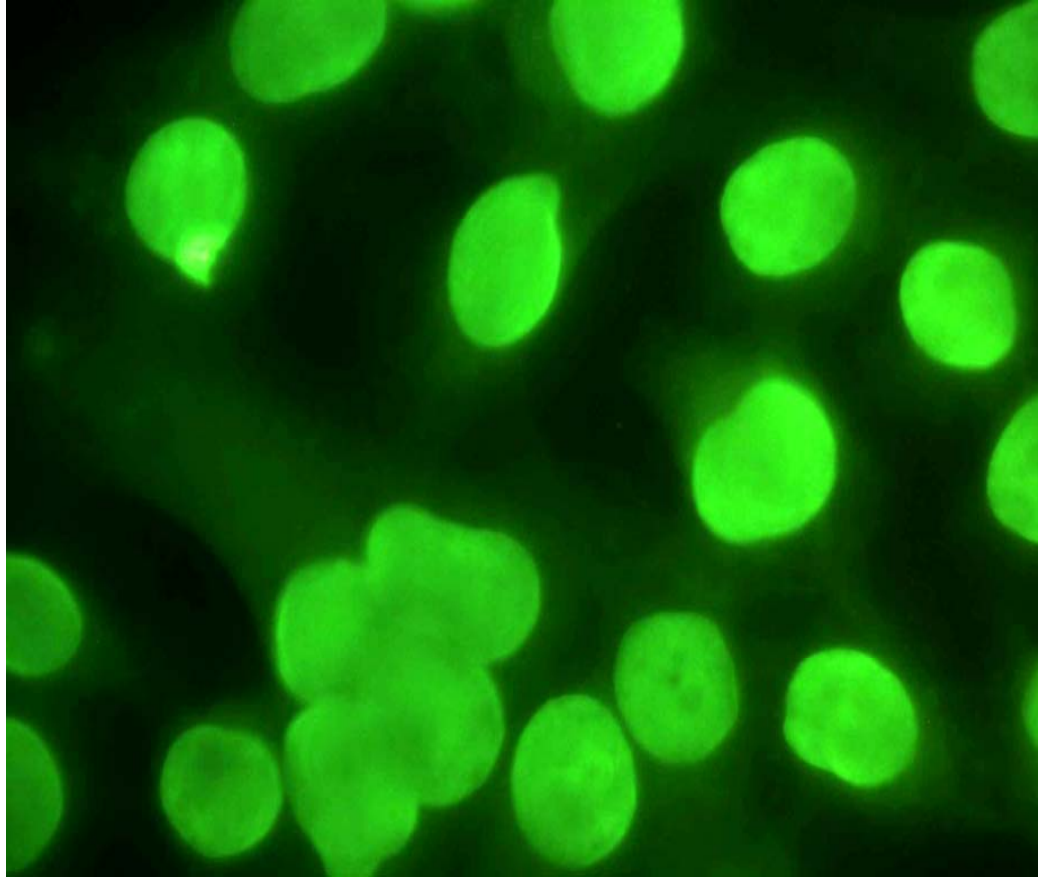


Системные ревматические заболевания

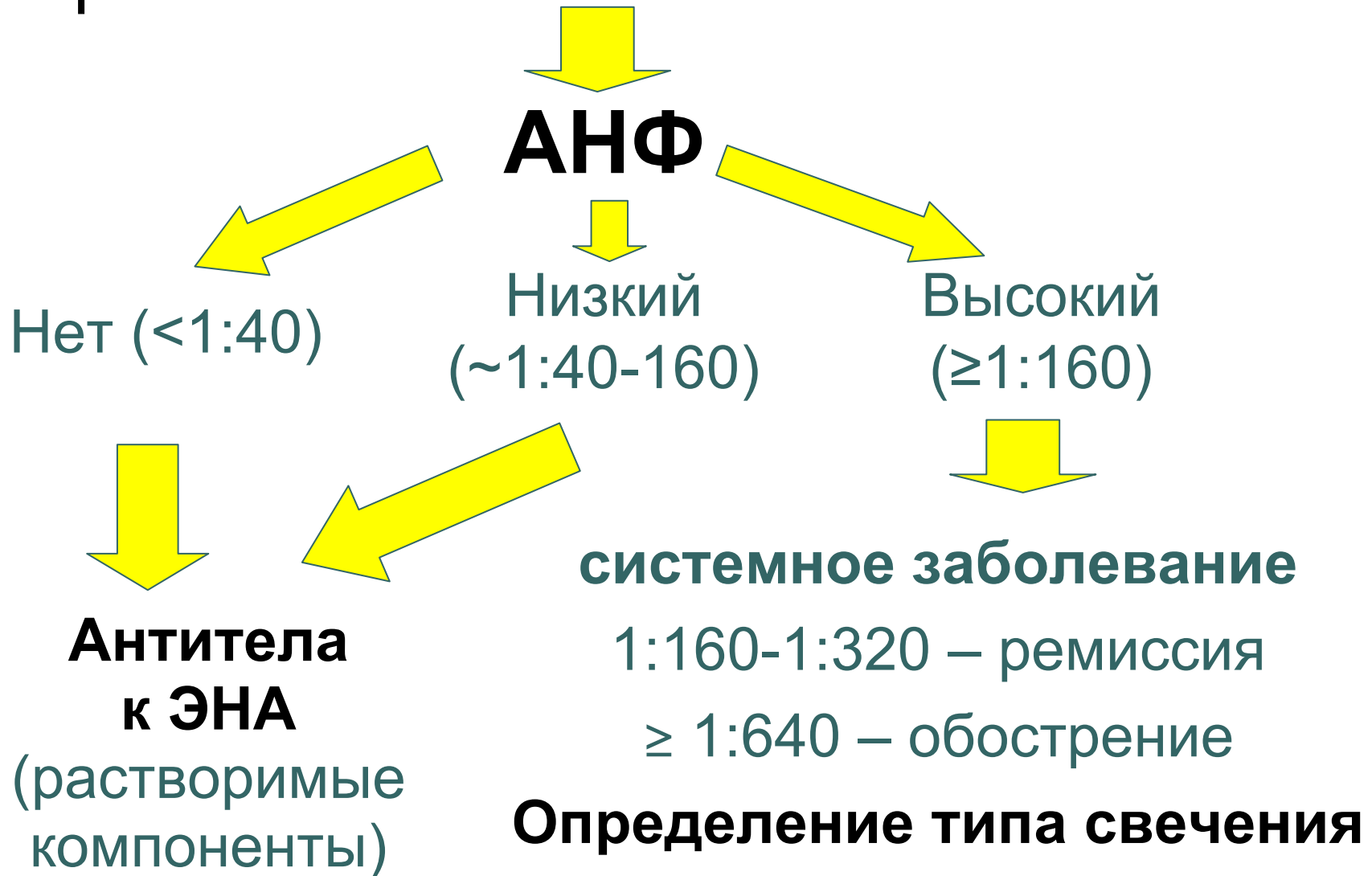
- Разнообразная клиническая симптоматика (кожа и внутренние органы)
- Иммунологическое обследование входит в критерии диагностики
- Единый иммунопатогенез – **патологический апоптоз** кератиноцитов и лимфоцитов, ведущий к гиперсенсibiliзации иммунной системы
- Иммунный ответ на компоненты ядра и цитоплазмы – **антинуклеарные антитела**

- ● ●

Антинуклеарный фактор на клеточной линии НEr-2



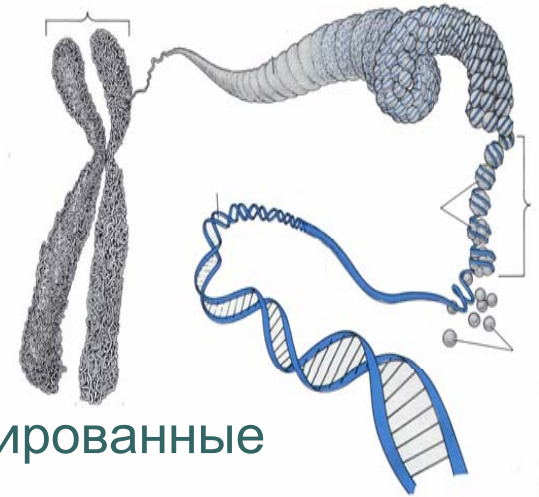
● ● ● | Подозрение на системное
заболевание СТ (СКВ, СС, ПМ)



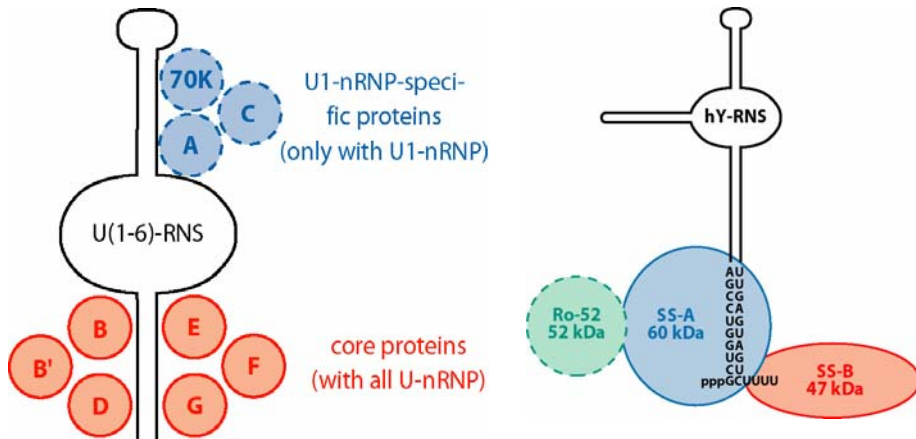
Основные антигены антинуклеарных антител



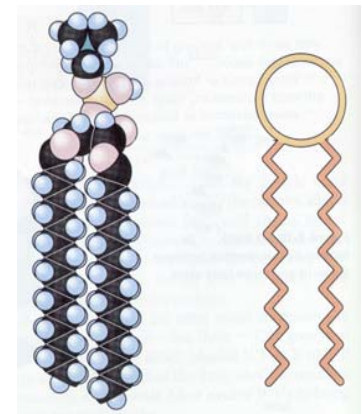
ДНК-
ассоциированные



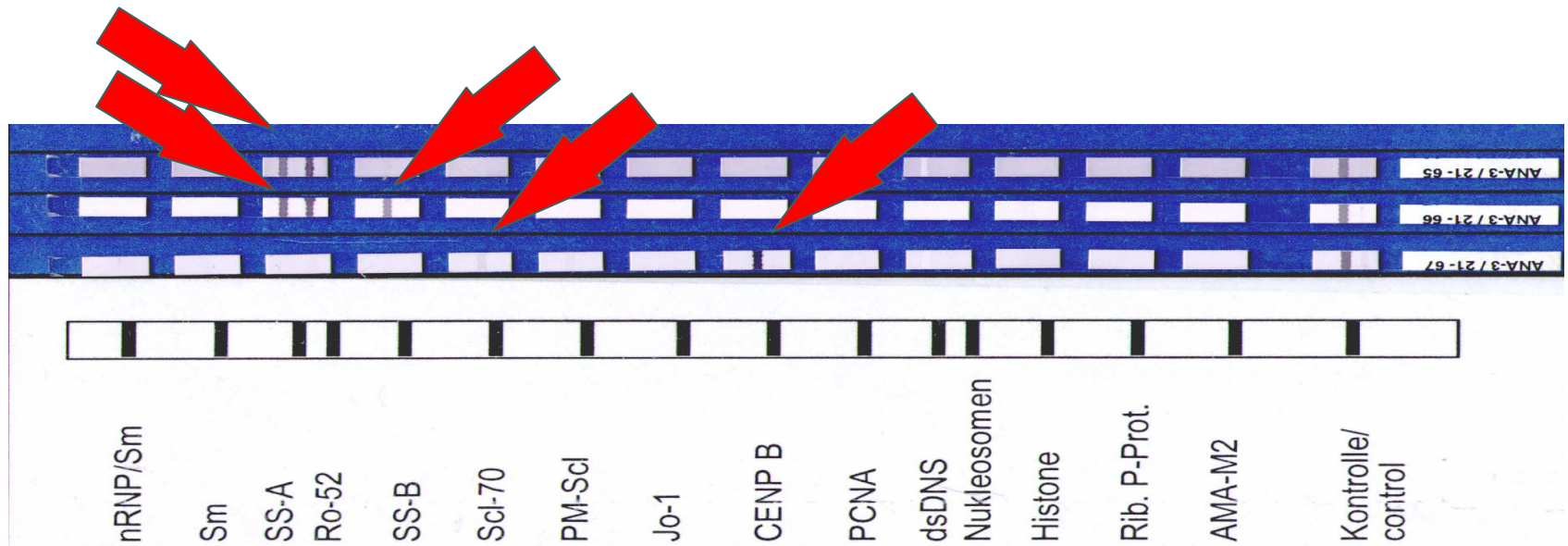
РНК-ассоциированные



Мембрано-
ассоциированные

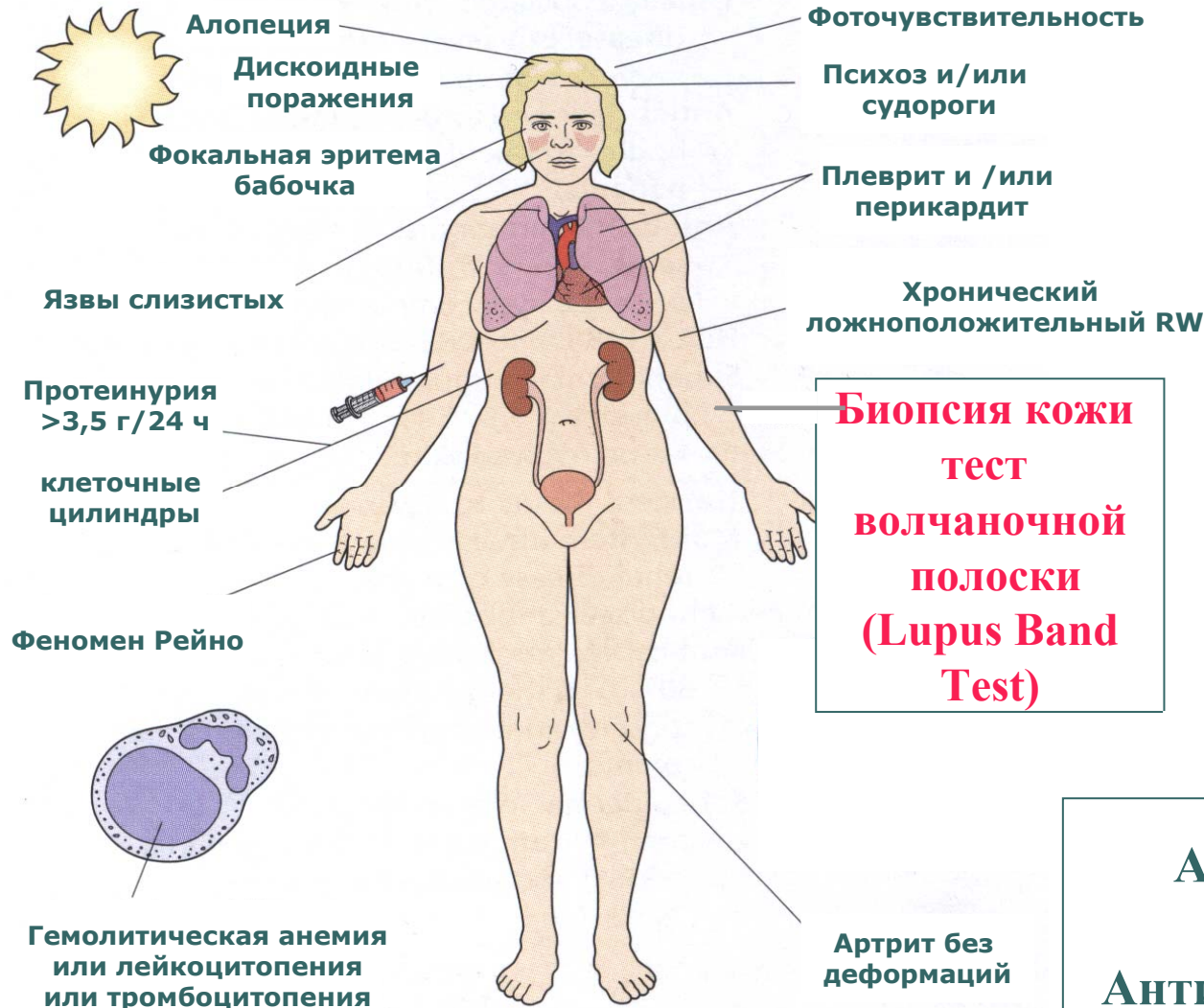


Иммуноблот антинуклеарных антител – дифференциальная диагностика ДБСТ

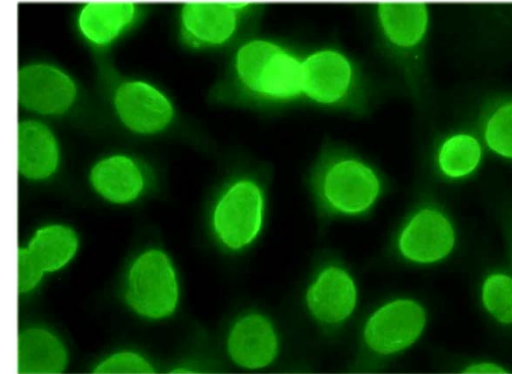


- Позволяет одновременно определять аутоАТ к основным ядерным рибопротеиновым антигенам
- Обладает большей специфичностью и меньшей себестоимостью по сравнению с ИФА методом

Системная КВ



Гомогенный тип свечения АНФ



Иммуноблот АНА

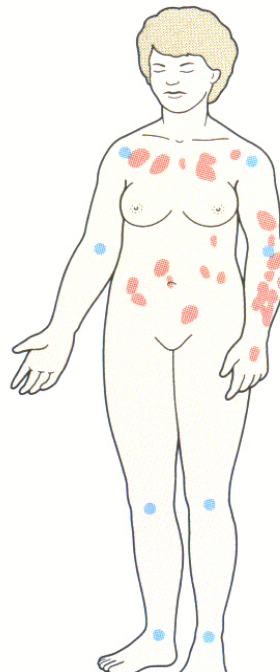
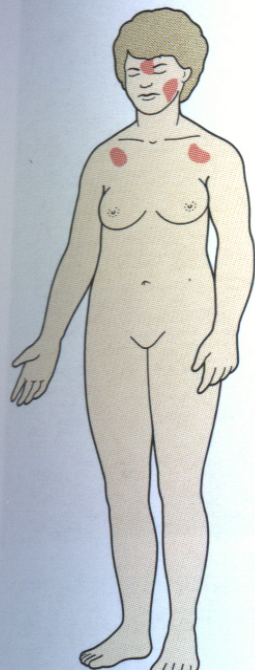
Антитела к дсДНК
Sm-антиген
Антитела к нуклеосомам
Антитела к кардиолипину



Хроническая кожная

Подострая кожная

Дискоидная КВ



Фоточувствительность
Поражение головы и шеи
Бляшки атрофические
или гипертрофические
Гипопигментация
Рубцующаяся алопеция

Фоточувствительность
Поражение всего туловища
Бляшки папулосквамозные,
аннулярные
Течение хроническое,
рекуррентное
Без рубцевания

**АНФ с гранулярным
свечением,
антитела к SS-A/SS-B**



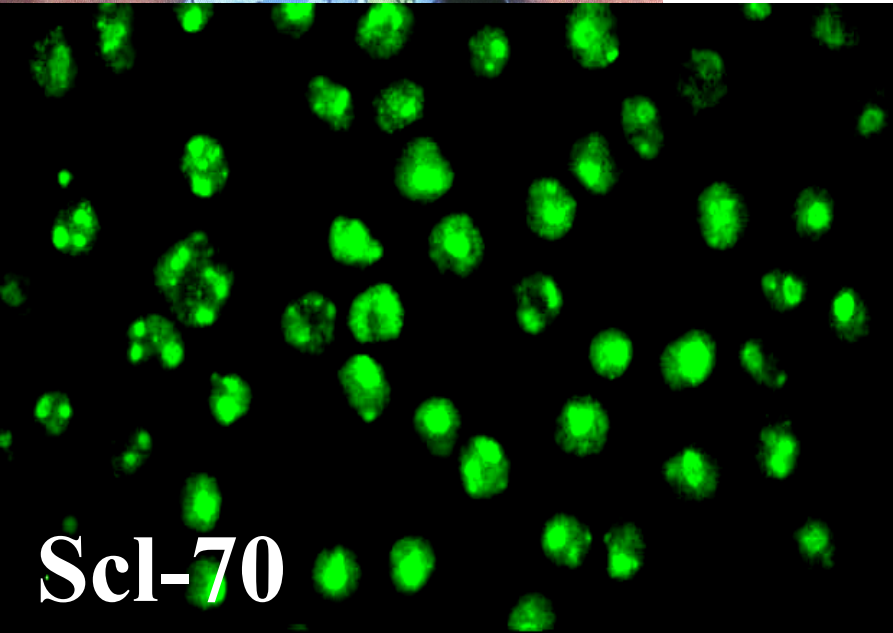
Диффузная склеродермия



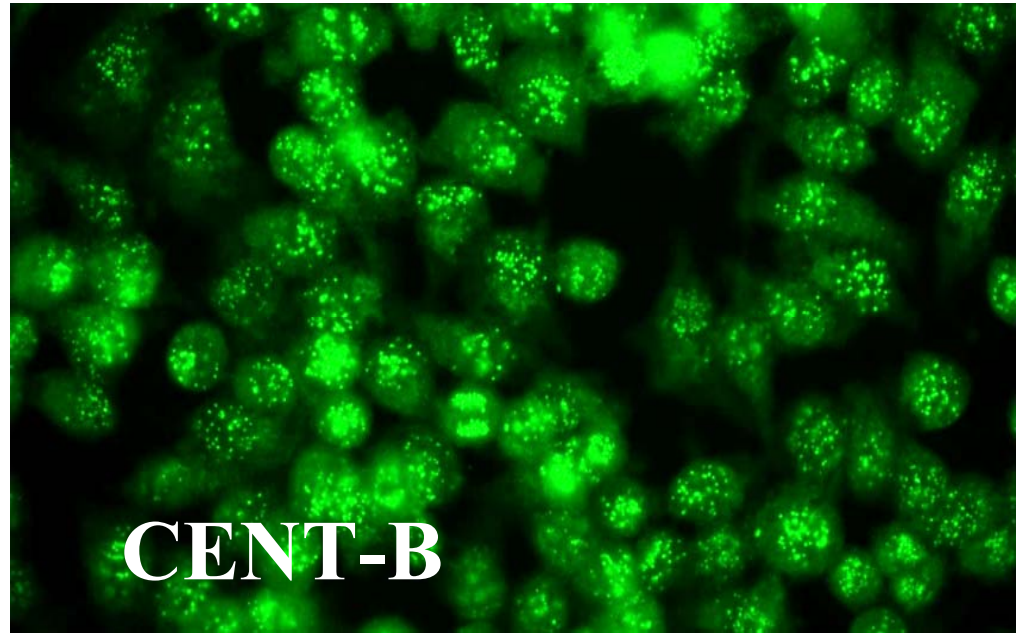
Билатеральный
симметричный
фиброз кожи
лица,
проксимальных
и
дистальных
частей
конечностей

Склеродермия и CREST-синдром

C Кальциноз
R Феномен Рейно
E Эзофагит
S Склеродактилия
T Телеангиоэктазии



ScI-70



CENT-B

Дерматомиозит/Полиммиозит



Симметричная слабость проксимальных мышц верхних и нижних конечностей
Поражение мышц глотки, гортани, пищевода
Миалгии, отек мышц
Кожные проявления

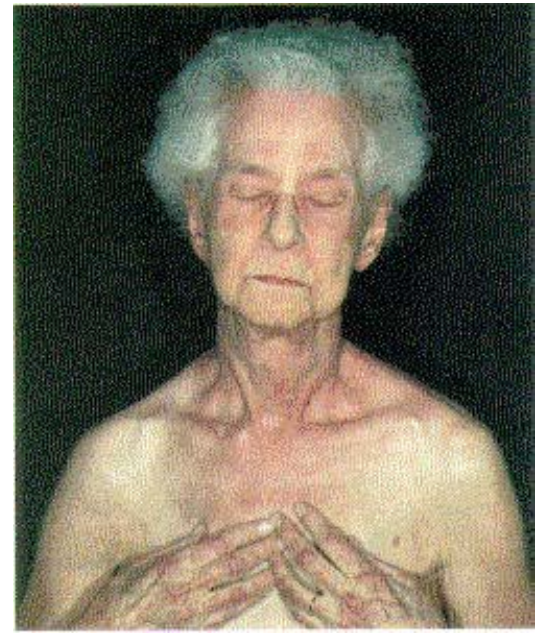
Повышение мышечных ферментов: КФК, ЛДГ, альдолазы

Данные ЭНМГ



АНФ с диффузным цитоплазматическим свечением,

Иммуноблот АНА при полимиозите: антитела Jo-1, SRP, Mi-2



Дальнейшее обследование больной СКВ при обнаружении АНФ

Высокий АНФ с
гомогенным типом
свечения

Высокий АНФ с
гранулярным
типом свечения

Антитела к ДНК
(двуспиральной)

Более 50 IU/ml

Антитела к
кардиолипину
классов IgG, IgM
(<20 GPL или
<20 MLP)

Иммуноблот
АНА

Нефрит,
цитопения

Вторичный АФС
(при соответствующей клинике)

Поражение
КОЖИ

Ревматоидный артрит

- В дебюте РА клинические проявления часто неспецифичны: артрит мелких суставов и утренняя скованность
- «Дорентгенологические стадии» РА
- **РФ отмечается только у 20% больных**



- ~~Распространенная деструкция суставов~~
- ~~Инвалидизация~~
- ~~Преждевременная смерть~~

Оптимальные результаты базисной терапии

“Ранний” РА

Развернутая стадия

Конечная стадия

ВАЖНОСТЬ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ!!!!



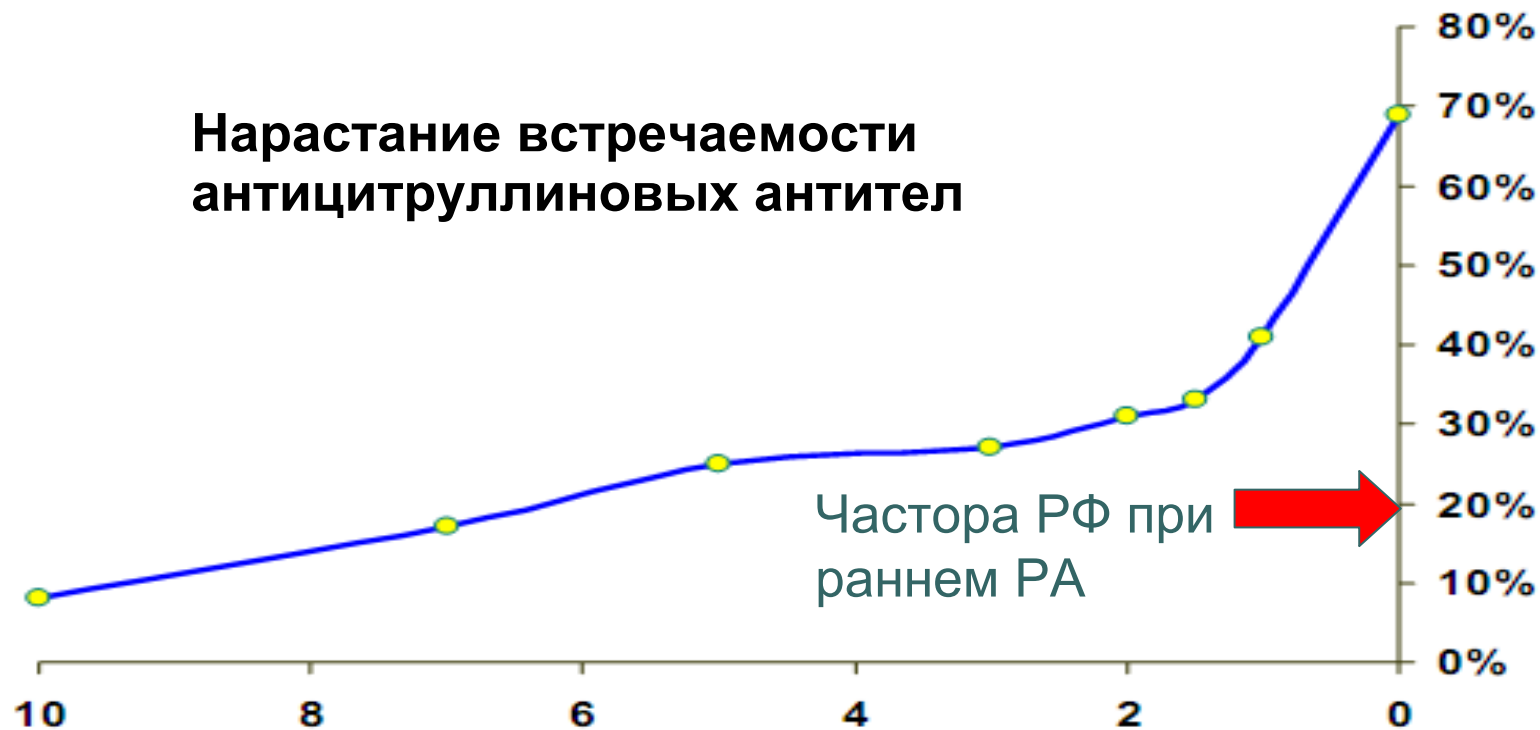
Серологические маркеры ревматоидного артрита

Аутоантитело	Описание	Частота
Ревматоидный фактор	<i>Waalder, 1940</i>	80%
Антинуклеарные антитела	<i>Beck, 1964</i>	30%
Антитела к RA-33	<i>Hassfeld et al. 1989</i>	50%
Антиперинуклеарный фактор	<i>Nienhuis et al. 1964</i>	50%
Антикератиновые антитела	<i>Young et al. 1979</i>	40%
Антитела к виментину (Sa-антиген)	<i>Despres N et al 1994</i>	30%
Антитела к циклическому цитруллиновому пептиду	<i>Schellekens GA et al. 1998, van Venrooij et al. 2000</i>	70%
Антитела к модифицированному цитруллиновому виментину	<i>Bang et al. 2006</i>	80%
Другие антицитруллиновые антитела (цитруллинированные филаггрин, цитруллинированный IgG, пептиды ВЭБ) – 2005-2008		50-80%

Выявление аутоантител в диагностике раннего ревматоидного артрита



Нарастание встречаемости антицитруллиновых антител



годы до начала РА

Rantapaa-Dahlqvist et al, Arthritis Reum 2003

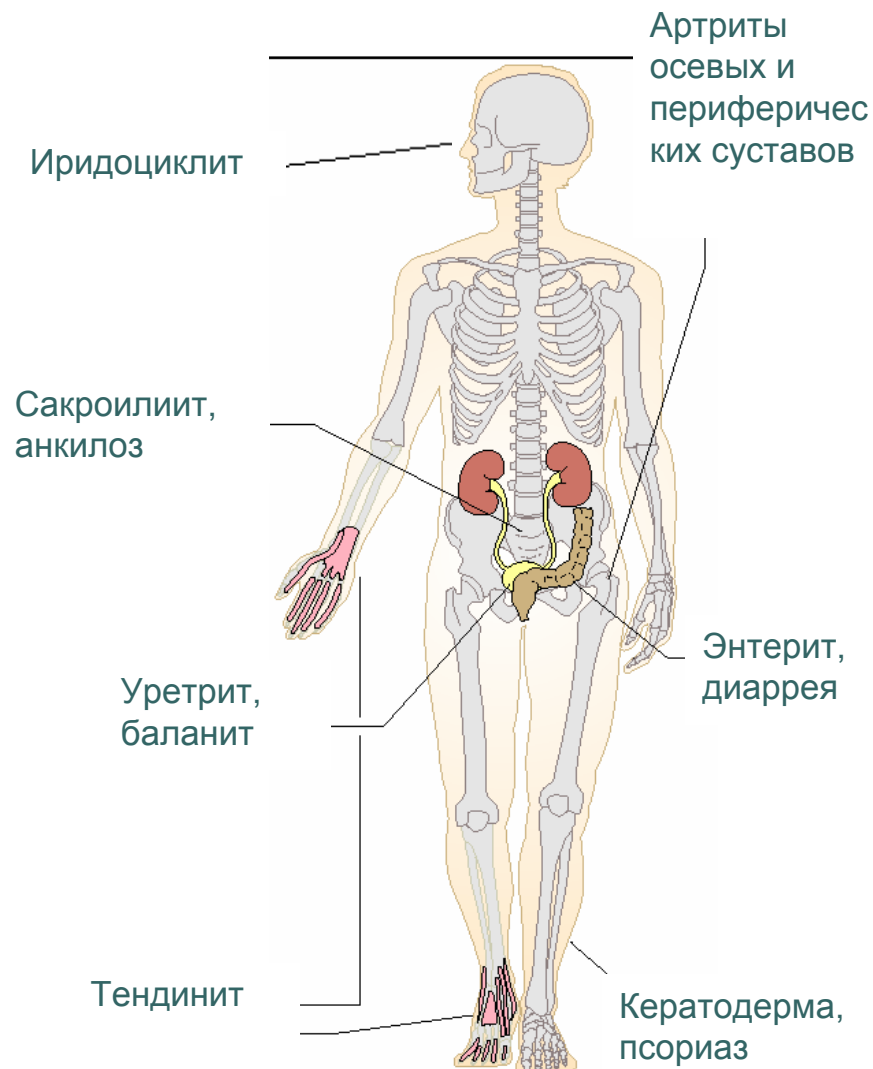


Значение антител при РА

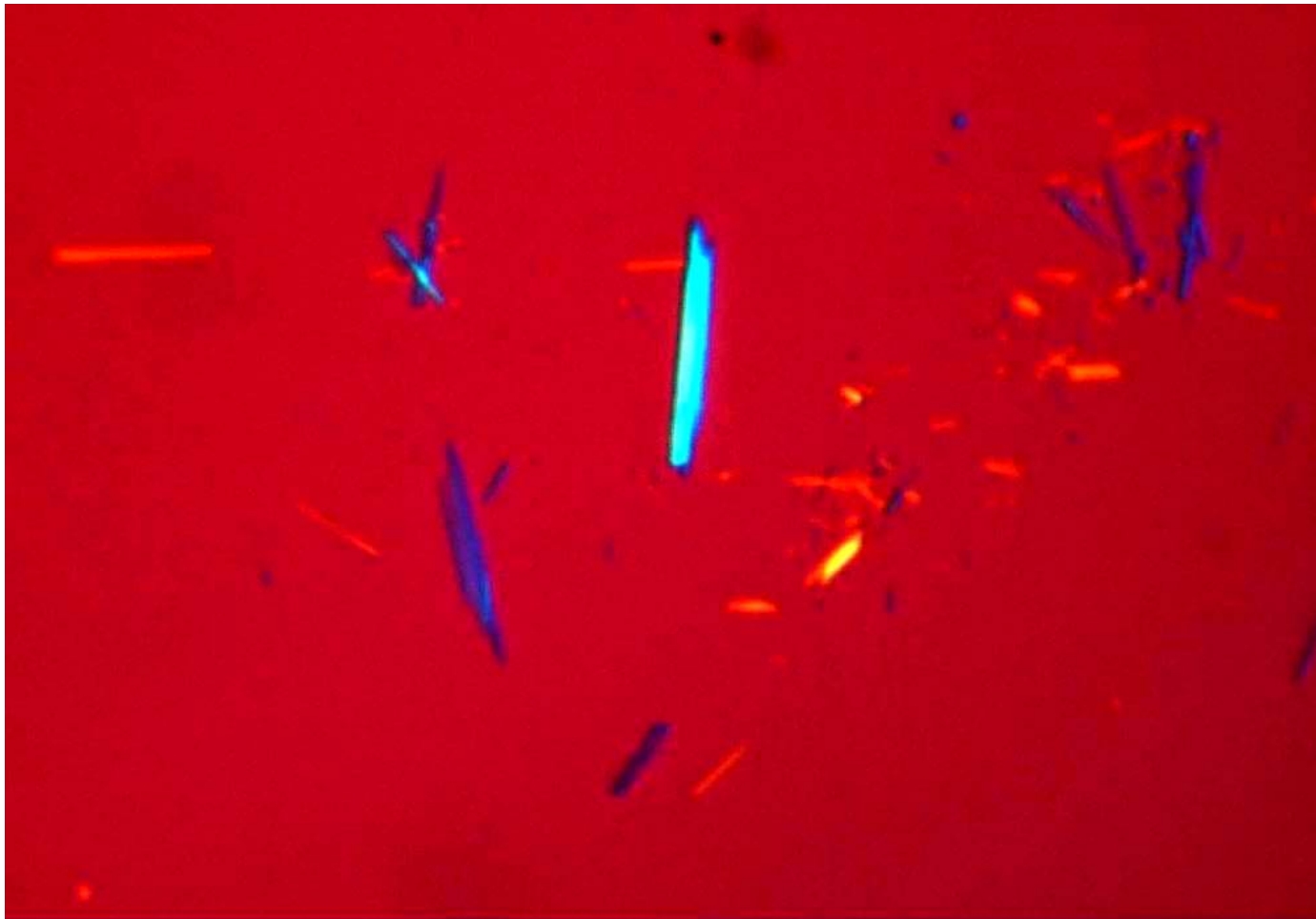
Ауто АТ	Чувст- сть	Специ- сть	Комментарий
Ревматоидный фактор	80%	70%	Отсутствует в дебюте
Антикератиновые антитела	30%	98%	Очень специфичны, агрессивное течение
Антиперинуклеар ный фактор	50%	90%	Высокая чувствительность
Анти МСV	75%	70%	Высокая чувствительность
АЦЦП	70%	95%	Верификация раннего ревматоидного артрита

HLA-B27 при серонегативных спондилоартропатиях

Анкилозирующий спондилит	95%
Синдром Рейтера	80%
Недифференцированная спондилоартропатия	70%
Артрит при воспалительных заболеваниях кишечника	25%
Псориатический артрит	25%
Реактивный артрит	20-80%
Норма	8-10%



● ● ● | Кристаллы моноурата натрия в синовиальной жидкости при подагрическом артрите (поляризационная микроскопия)





Номенклатура васкулитов Чапелл-Хилл* 1994

Васкулиты крупных сосудов

Гигантоклеточный артериит

Артериит Такаясу

Васкулиты средних сосудов

Узелковый полиартериит

Болезнь Кавасаки

Васкулиты мелких сосудов

Гранулематоз Вегенера

Синдром Черджа-Стросса

Микроскопический полиангиит

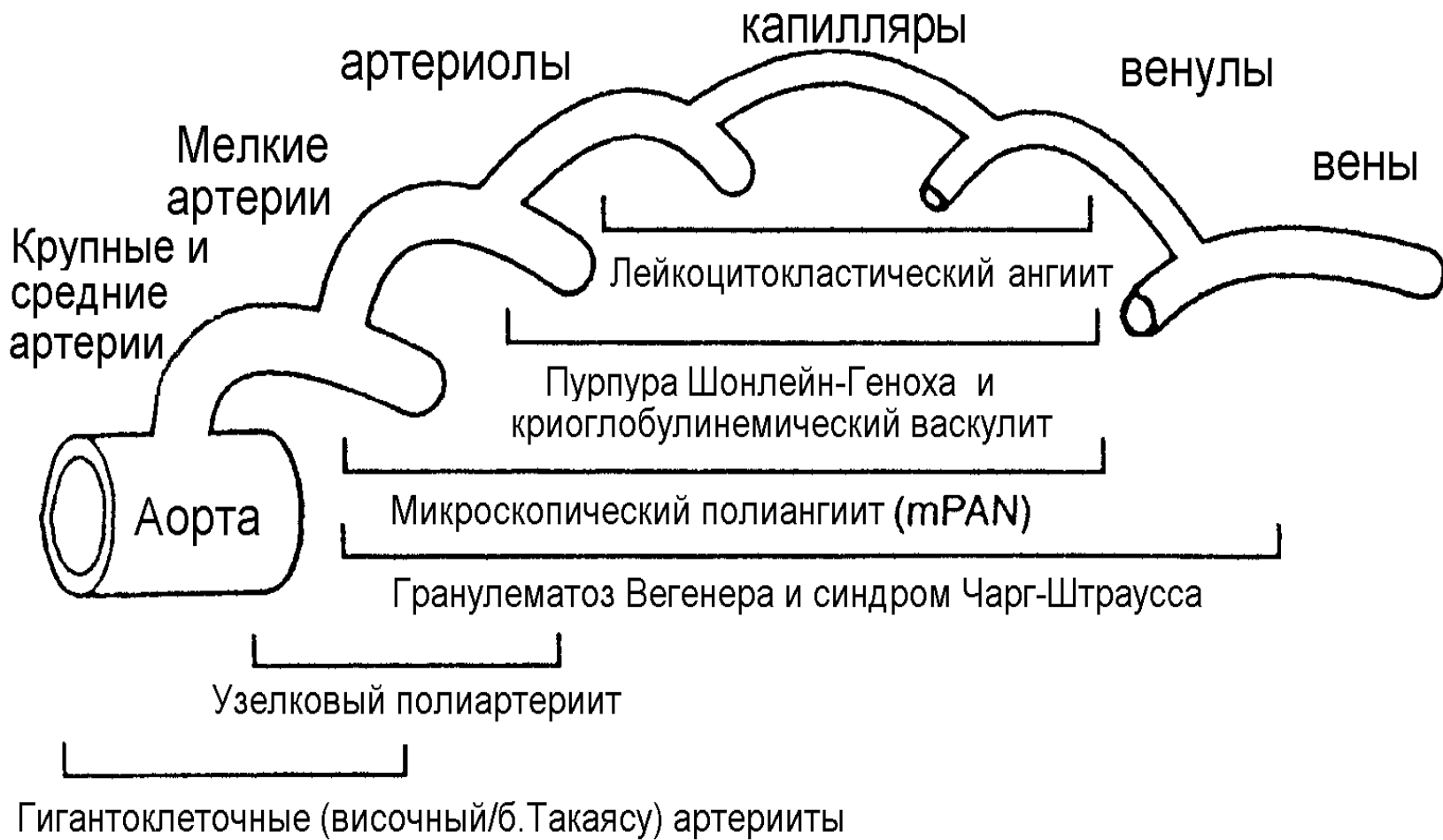
Пурпура Шонлейн-Геноха

Криоглобулинемический васкулит

Лейкоцитокластический васкулит

* Arthritis Rheum 1994;37:187-192

Уровень поражения сосудов при разных васкулитах

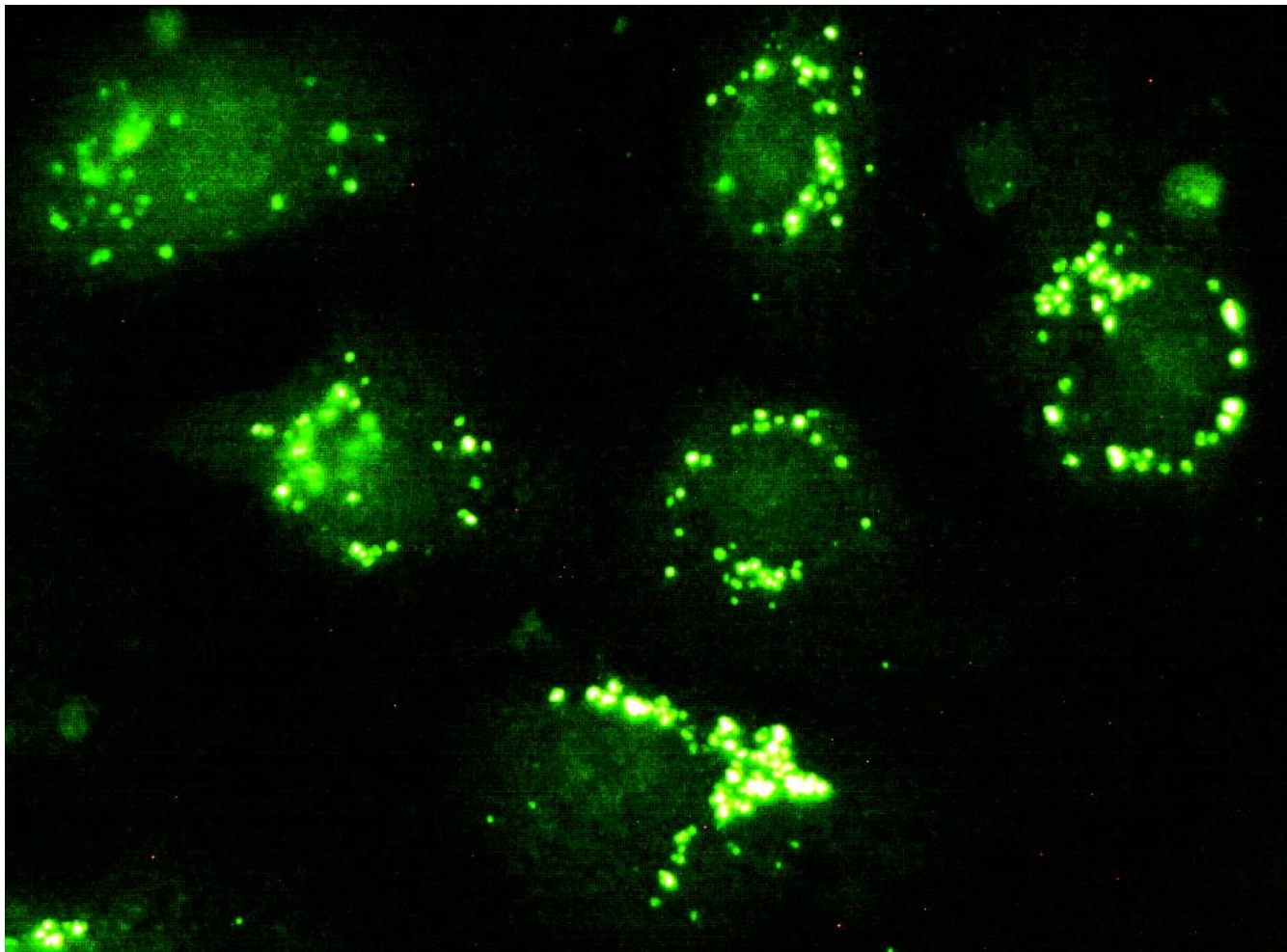




Диагностика васкулитов

Крупных сосудов (воспалительные)	СОЭ, СРБ (колич.), антитела к эндотелию
Средних сосудов (гранулематозные)	Антинейтрофильные антитела (АНЦА)
Мелких сосудов (иммунокомплексные)	Криоглобулины, антитела к С1q, ЦИК, РФ, С3, С4

Антитела к эндотелию на клетках
эндотелию пупочной вены (HUVES)





СОЭ – плохой тест

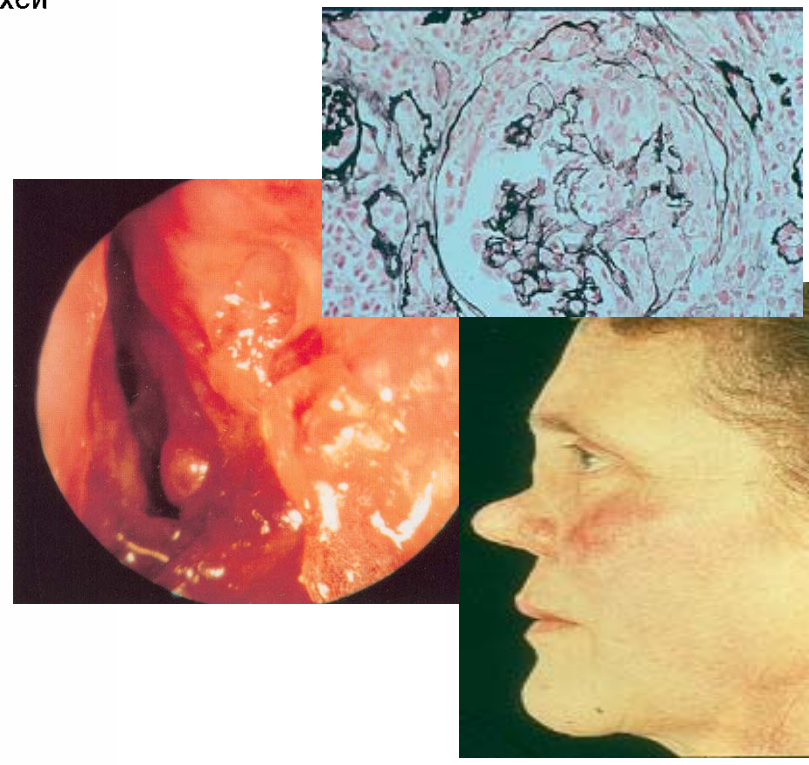
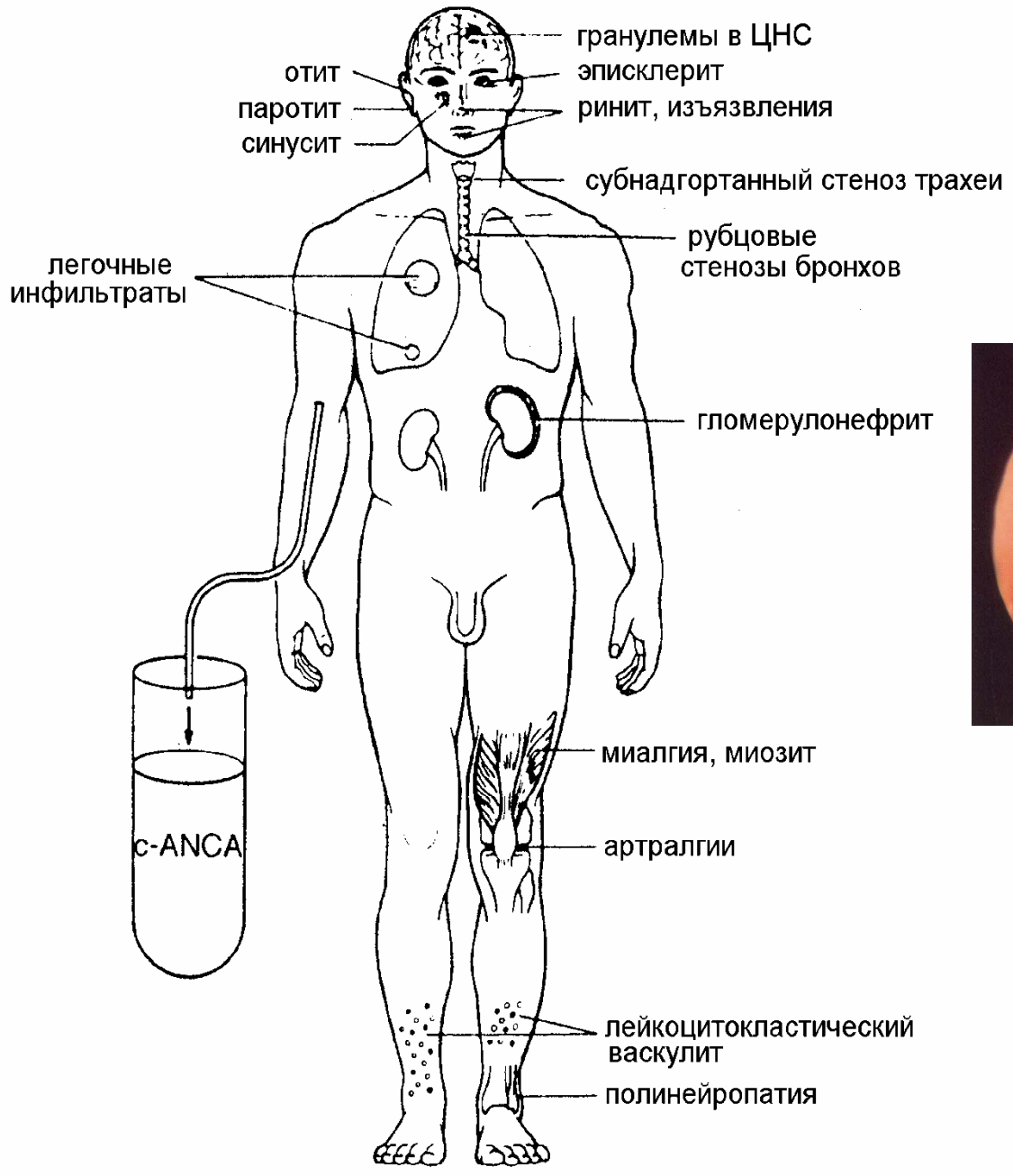
- Результаты зависят от многих факторов (анемия, воспаление, парапротеин)
- При воспалениях СОЭ значительно коррелирует с уровнем фибриногена
- Капиллярная кровь – метод Панченкова
- Венозная кровь – метод Вестергрена



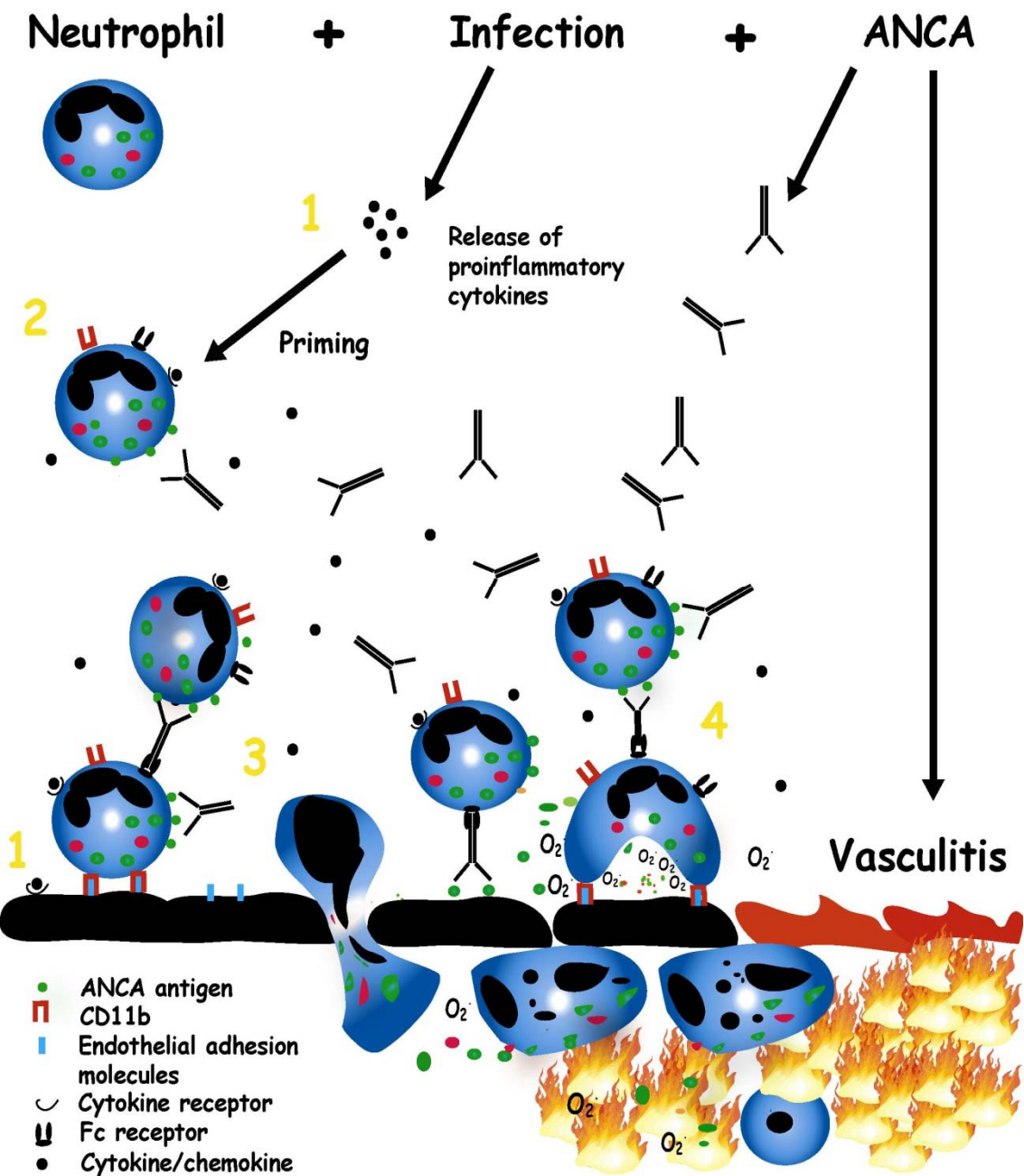
Границы увеличения СРБ

Норма, незначительное увеличение (4-10 мг/л)	Умеренное повышение (10-100 мг/л)	Выраженное повышение (>100 мг/л, до 300 мг/л)
Физическая нагрузка Простуда Беременность Нестабильная стенокардия	Инфаркт миокарда Опухоли Панкреатит ДБСТ, Ревматоидный артрит	Острые бактериальные инфекции (сепсис) Значительная травма Системные васкулиты

Гранулематоз Вегенера и АНЦА-ассоциированные васкулиты



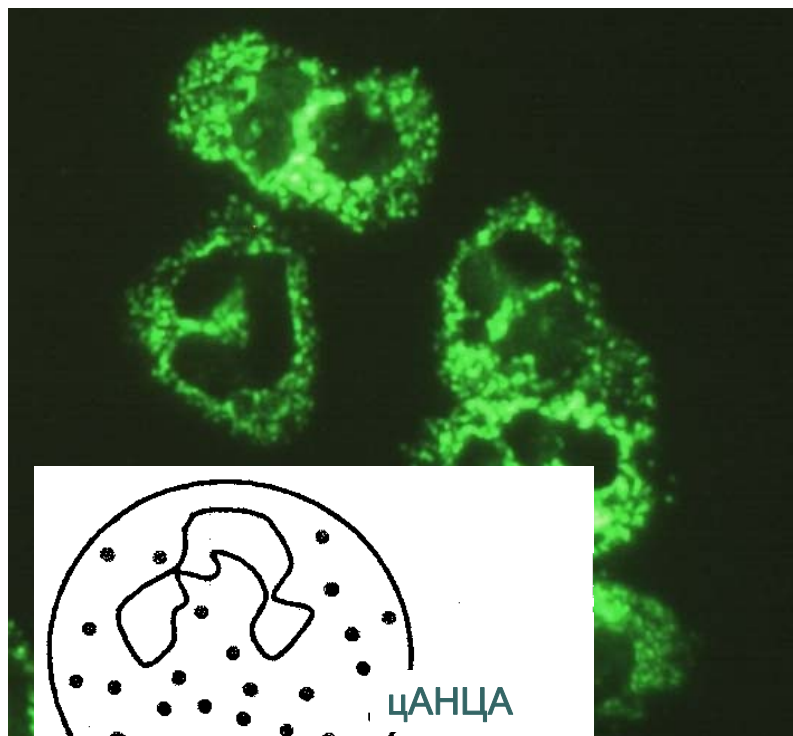
Гранулематоз Вегенера
 Синдром Шарг-Штраусса
 Микроскопический полиангиит
 Быстропрогрессирующий
 гломерулонефрит



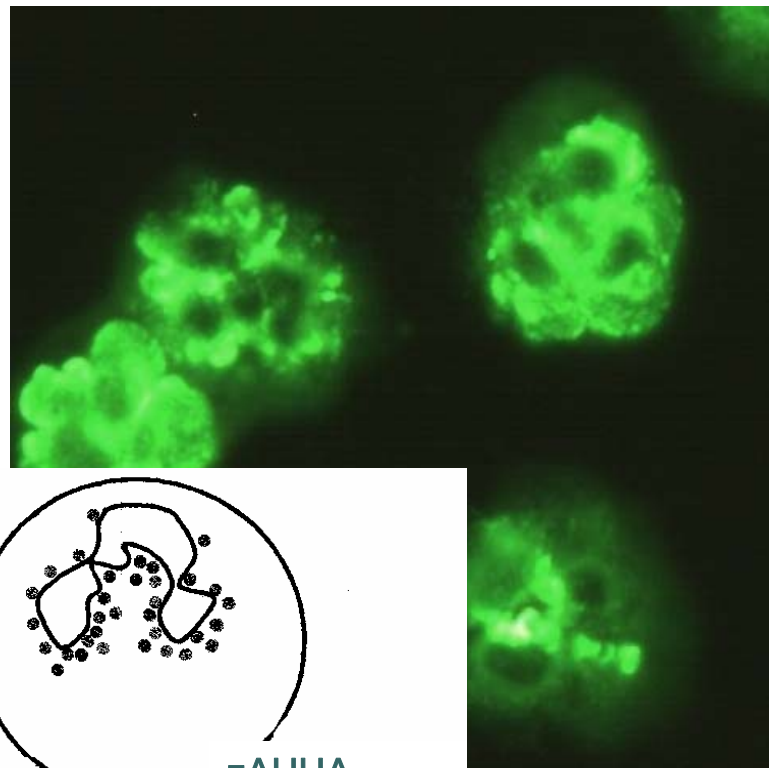
АНЦА участвуют патогенезе васкулитов

1. Индукция АНЦА (Staph. aureus)
2. Инфекционный агент увеличивает синтез цитокинов
3. Антитела связываются с антигенами на поверхности НФ и приводят к их дегрануляции
4. Формируется гранулема

Семейство антинейтрофильных цитоплазматических антител (АНЦА)



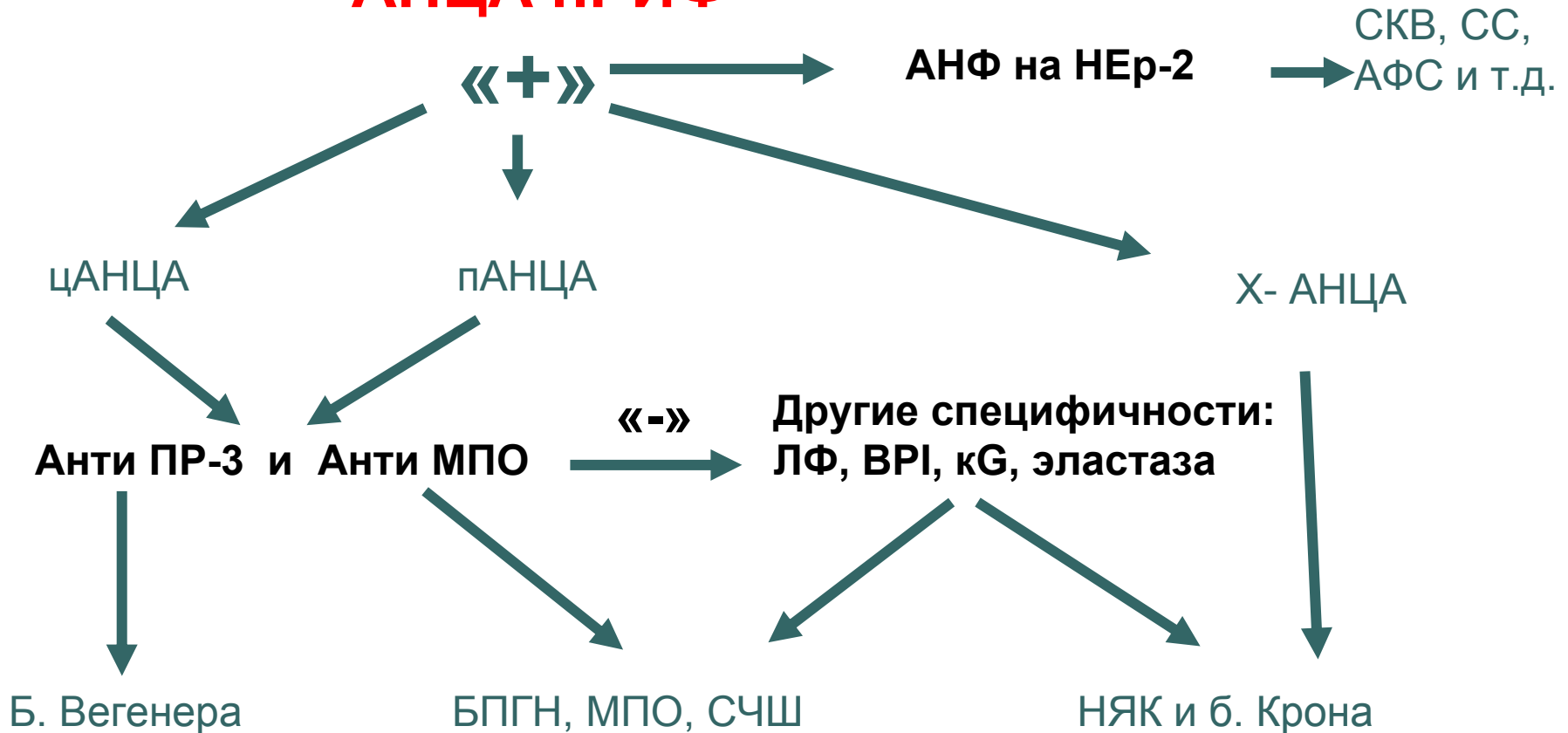
цАНЦА



пАНЦА

Подозрение на
гранулематозный васкулит/ВЗК

АНЦА нРИФ

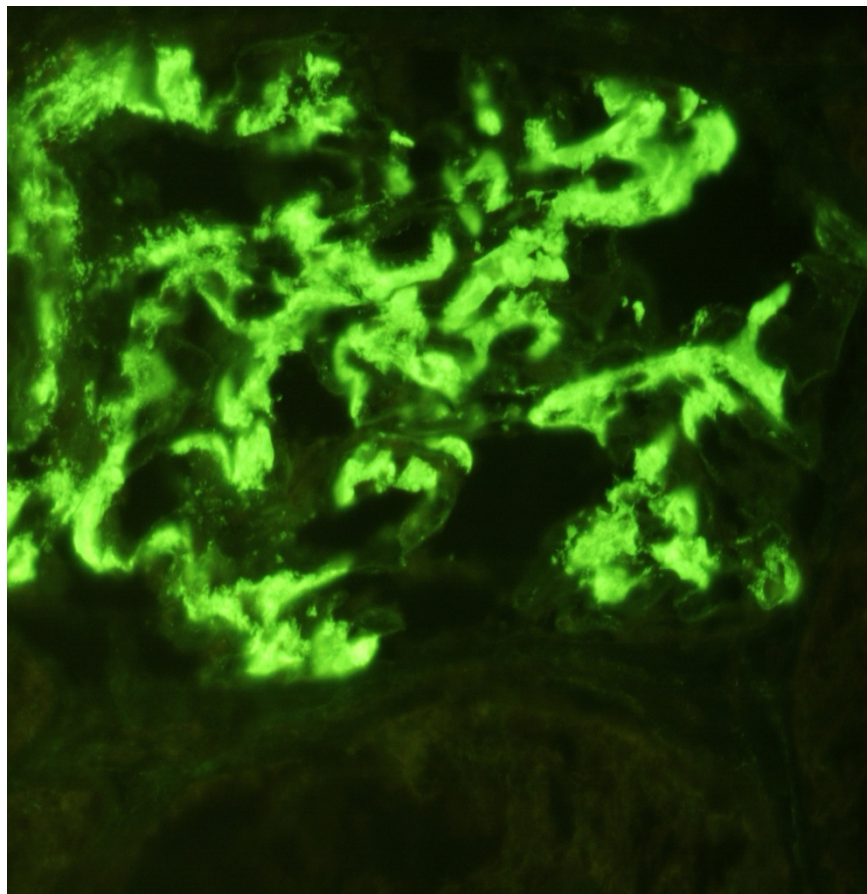
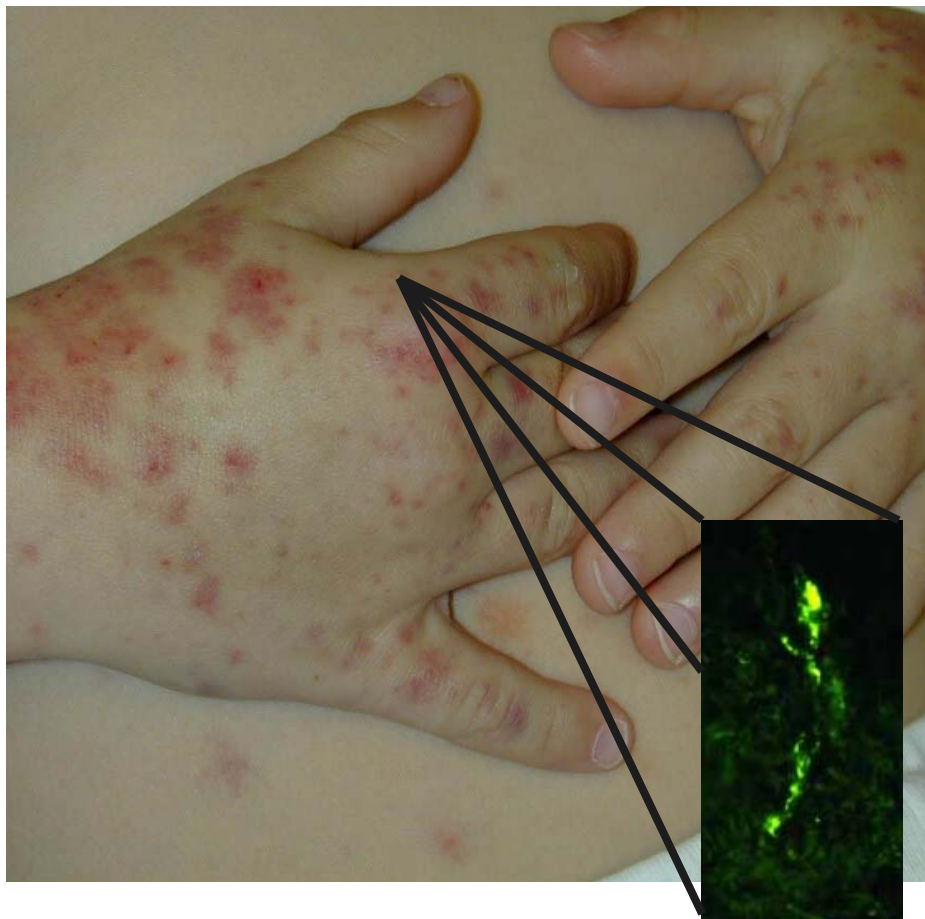




Основные причины иммунокомплексных васкулитов

- Лекарственные васкулиты (пенициллины, сульфонамиды, аллопуринол, тиазиды, пиразолоны, ретиноиды, аминохинолины)
- Сывороточная болезнь (сыворотки, моноклональные антитела, цитокины, стрептокиназа) и пересадки органов
- Инфекции (*N. meningitidis*, вирусные гепатиты, CMV)
- Паранеопластические процессы
- Системные заболевания соединительной ткани
- Пурпура Геноха-Шонлейна и IgA нефропатия
- Эссенциальная криоглобулинемия

Отложения IgA в коже и мезангии клубочка при ПГШ метод пРИФ

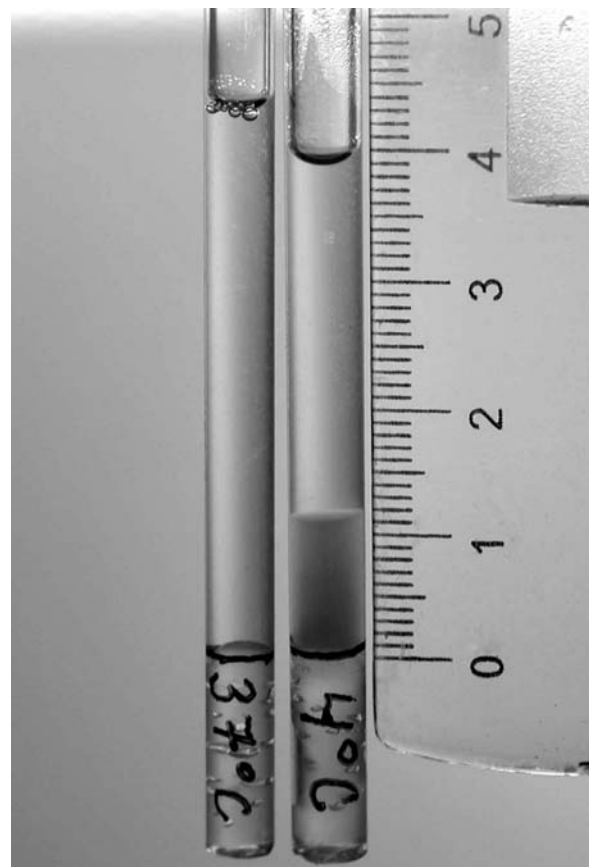
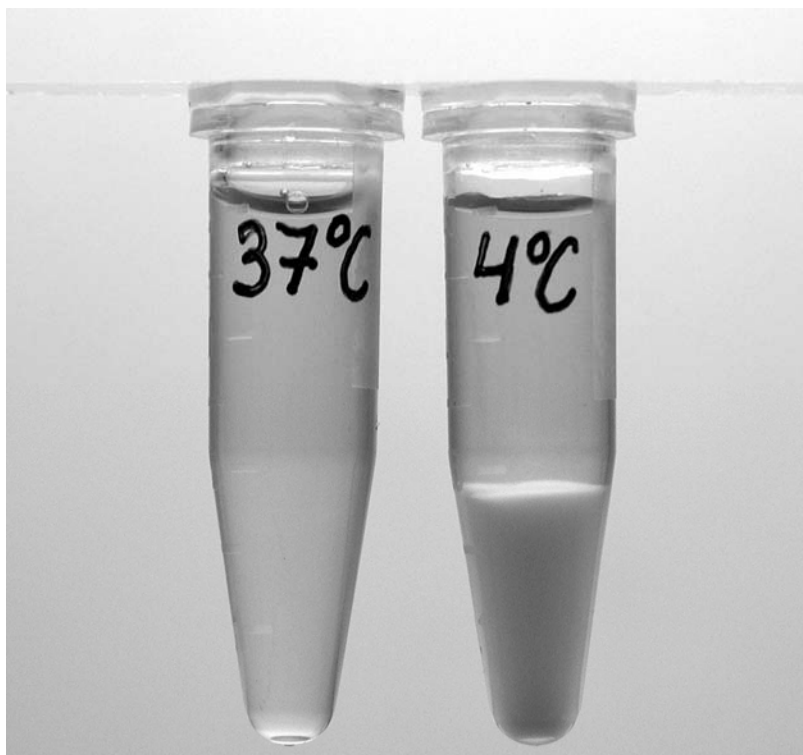




Криоглобулинемия

- ЦИК, агрегирующие при низкой t°
- Состав: моноклональные Ig и РФ
- Клиника: пурпура, полиневрит и артрит
- Обычно на фоне вирусного гепатита С
- Другие причины: парапротеины, ревматические заболевания, эссенциальные формы

Выявление криоглобулинов





Аутоиммунные заболевания печени

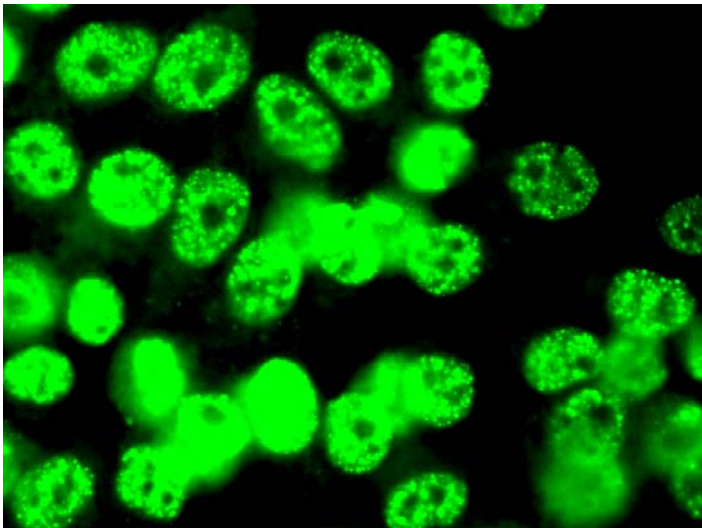
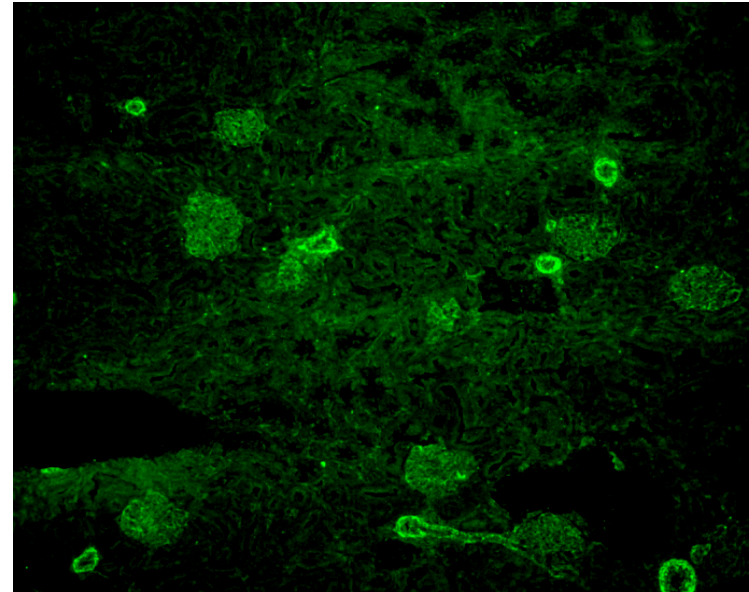
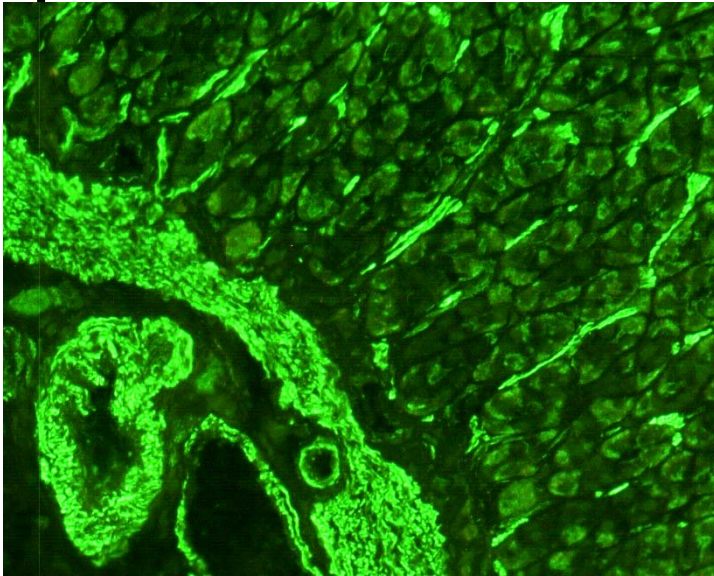
Аутоиммунный гепатит 1 типа

Аутоиммунный гепатит 2 и 3 типа

Первичный билиарный цирроз

Первичный склерозирующий холангит

Аутоиммунный гепатит 1 типа

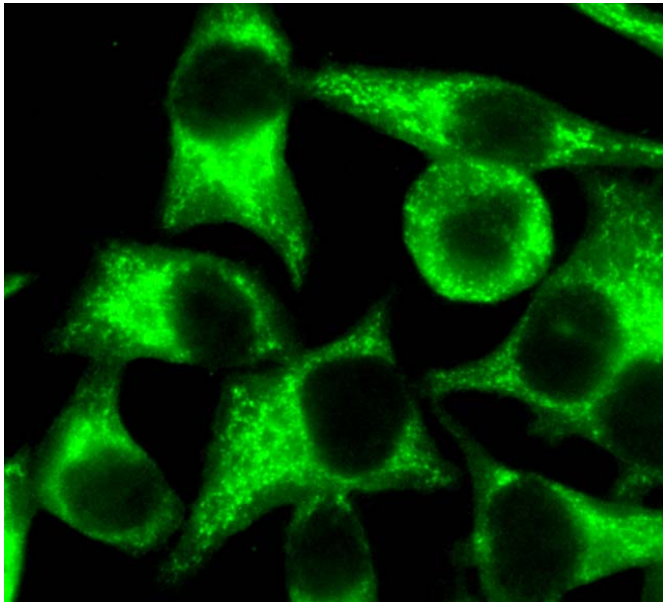
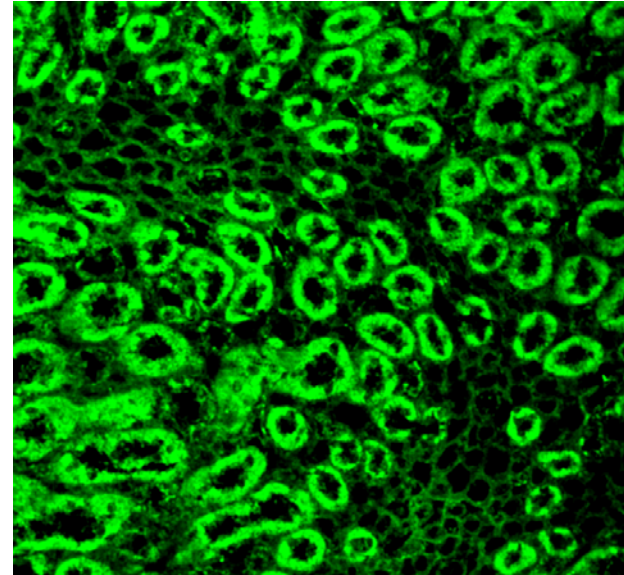
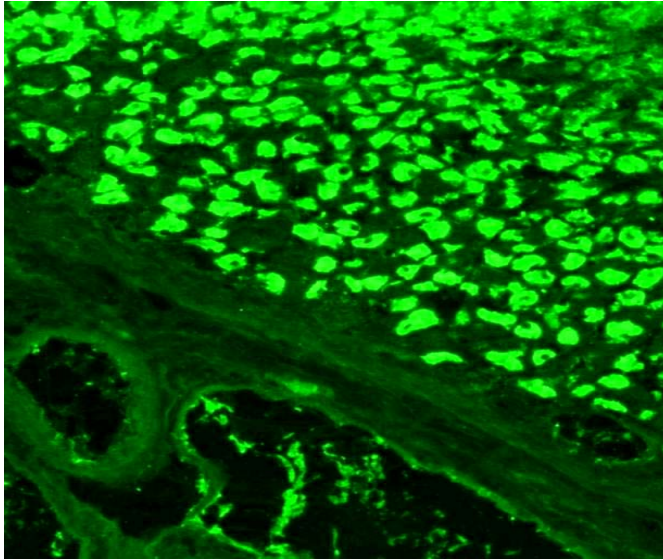


Антитела к гладким мышцам

Антинуклеарный фактор

Гипергаммаглобулинемия

Первичный билиарный цирроз



**Антимитохондриальные
антитела против пируват-
декарбоксилазного
комплекса (PDC)**



Серологическая диагностика заболеваний ЖКТ

- Гастриты А и В
- Целиакия
- Воспалительные заболевания кишечника



Диагностика гастрита типа В

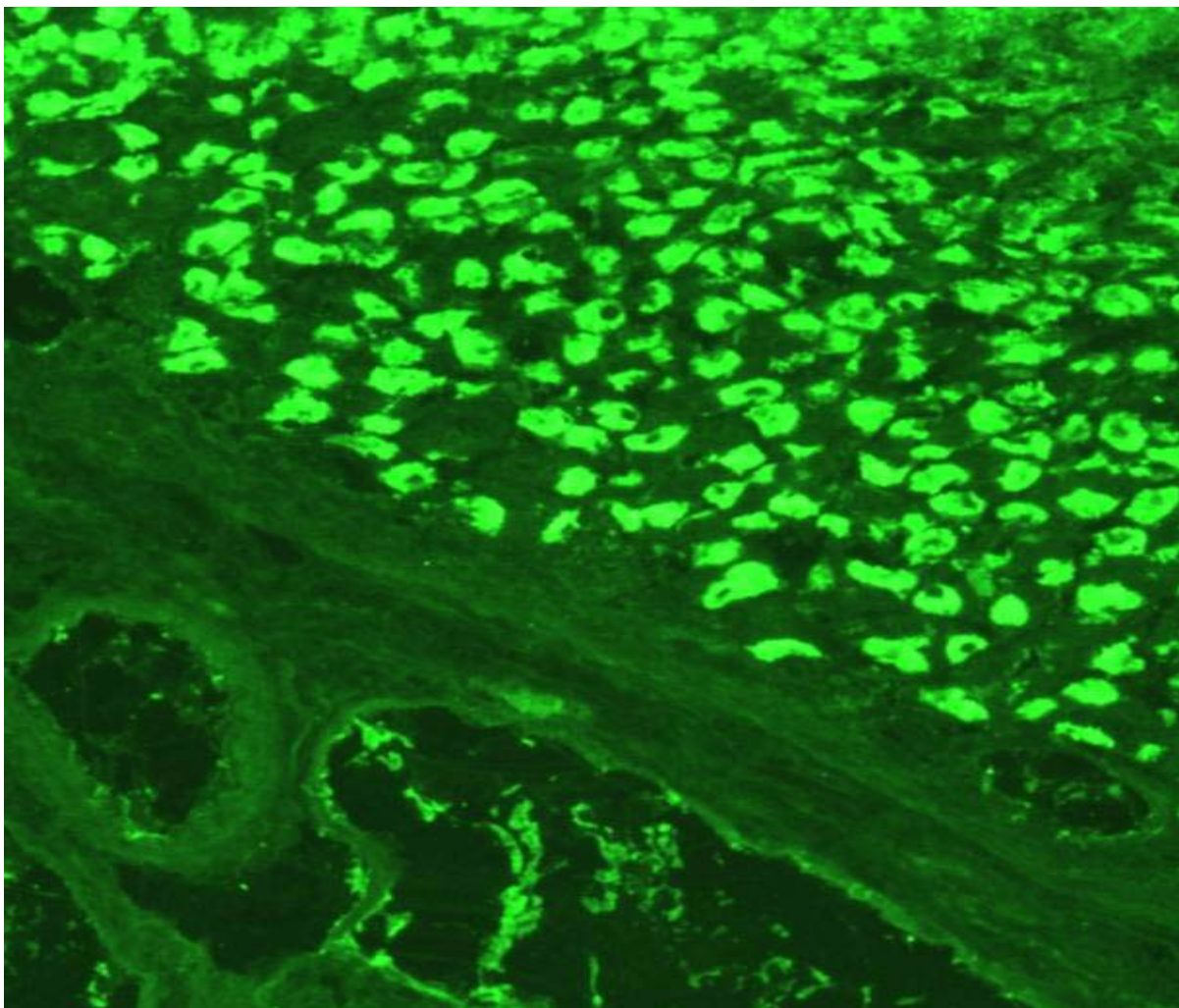
- **Антитела к *H. pylori*** класса IgG отмечаются у 30% населения США/Европы, в СПб у 60% населения
- Указывают на эпидемический контакт
- Титр антител нестойк, снижение через 6 мес. после эрадикации возбудителя
- По данным Harrison's PIM 2005 (p.1749) *H.pilory* может быть обнаружен только у 40% больных с язвой желудка и у 60-70% больных с язвой ДПК




Диагностика гастрита типа А

- Основной серологический маркер – **антитела обкладочным (париетальным) клеткам желудка**
- Сопровождаются клиникой атрофическим гастритом, снижением кислотности, недостаточностью кардиального жома, В-12 дефицитной анемией, фуникулярным миелозом
- Часто отмечаются на фоне эндокринной патологии (тиреоидит Хашимото)

Антитела к обкладочным клеткам желудка

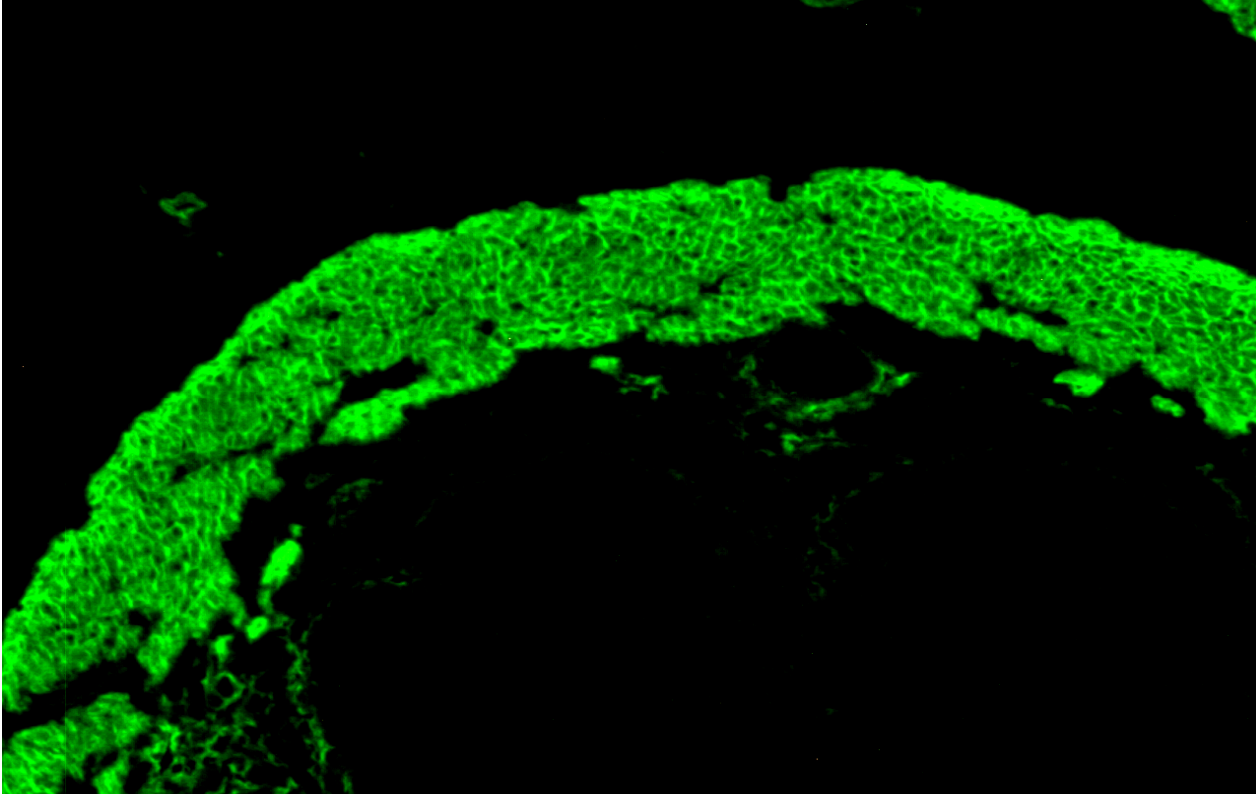




Образование аутоантител при целиакии

- Патологический иммунный ответ в отношении **альфа-глиадина** (глютен/глутенопектин злаковых)
- Альфа-глиадин на 60% состоит из аминокислоты глутамина
- **Тканевая трансглутаминаза** дезаминирует глутамин в глутамат в составе глиадина, а также белков матрикса соединительной ткани (**эндомизий и ретикулин**)

Антитела к эндомизию



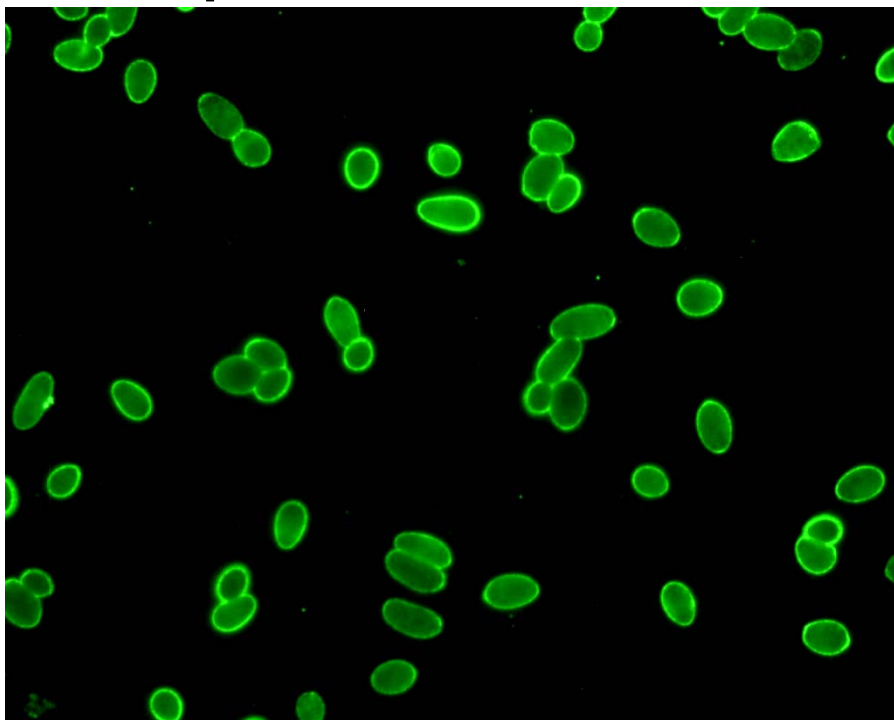


Серологические маркеры воспалительных заболеваний кишечника

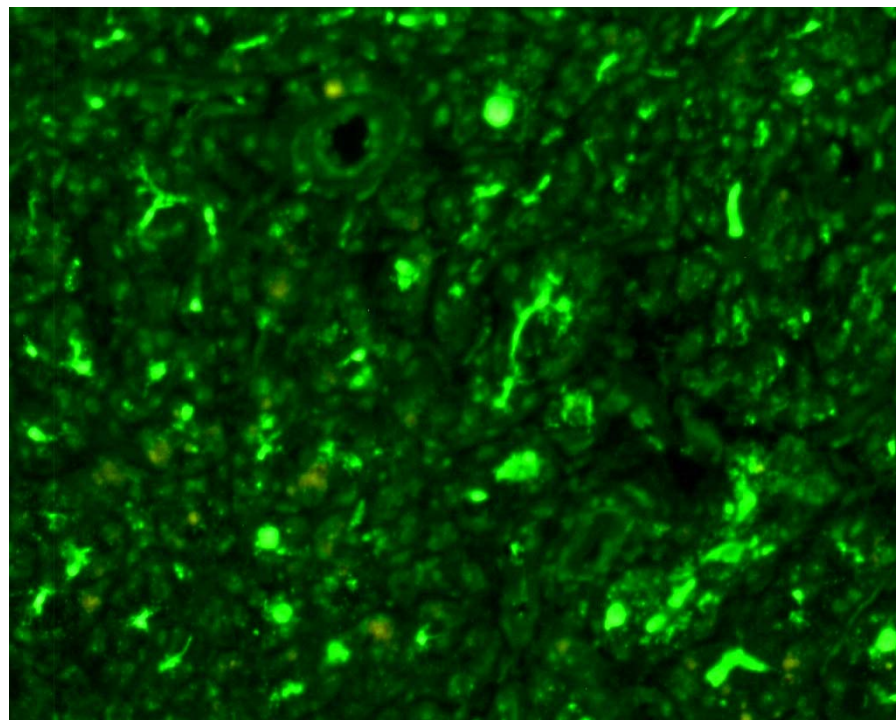
- **Антитела к полисахаридам *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA)** – компонент ответа против кишечной флоры при болезни Крона
- **Антитела к центроацинарным клеткам** поджелудочной железы – характерны для б.Крона
- **Антитела к бокаловидным клеткам** кишки при НЯК являются комплемент-фиксирующими, развитие нейтрофильных инфильтратов
- **Антитела к цитоплазме нейтрофилов (АНЦА)** встречаются при НЯК и склерозирующем холангите, однако не реагируют с MPO и PR3

Метод выявления – комбинация субстратов для ИРИФ

Аутоантитела при болезни Крона

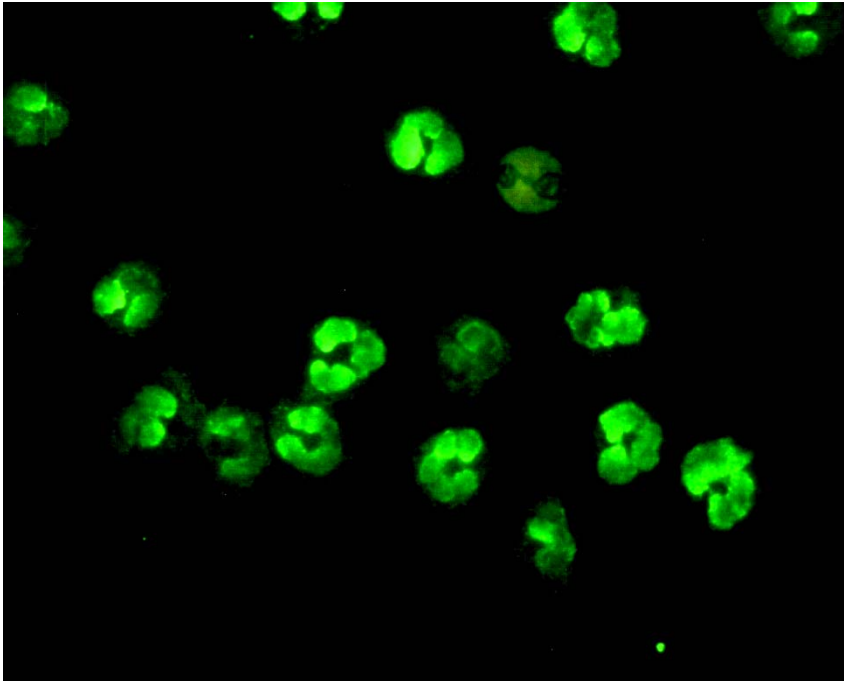


Антитела к *Saccharomyces cerevisiae*, пекарские дрожжи, 1:100, x40, анти-IgA-FITC

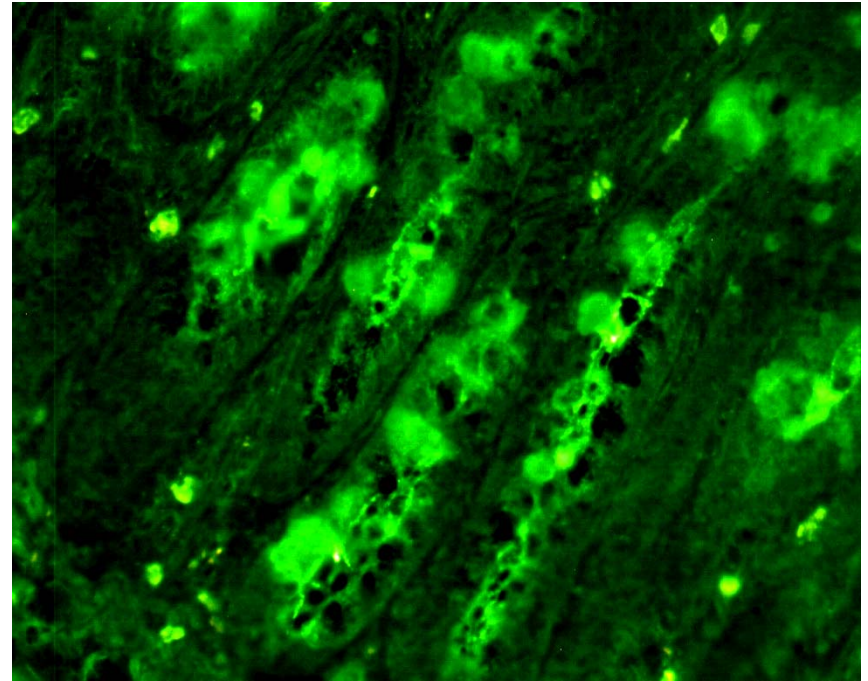


Антитела к центроацинарным клеткам поджелудочной железы, поджелудочная железа обьзьяны, 1:10, x20, анти-IgG- FITC

Аутоантитела при неспецифическом язвенном колите



Антитела к цитоплазме
нейтрофилов, пАНЦА, нейтрофилы
донора, 1:100, x40, анти-IgG- FITC



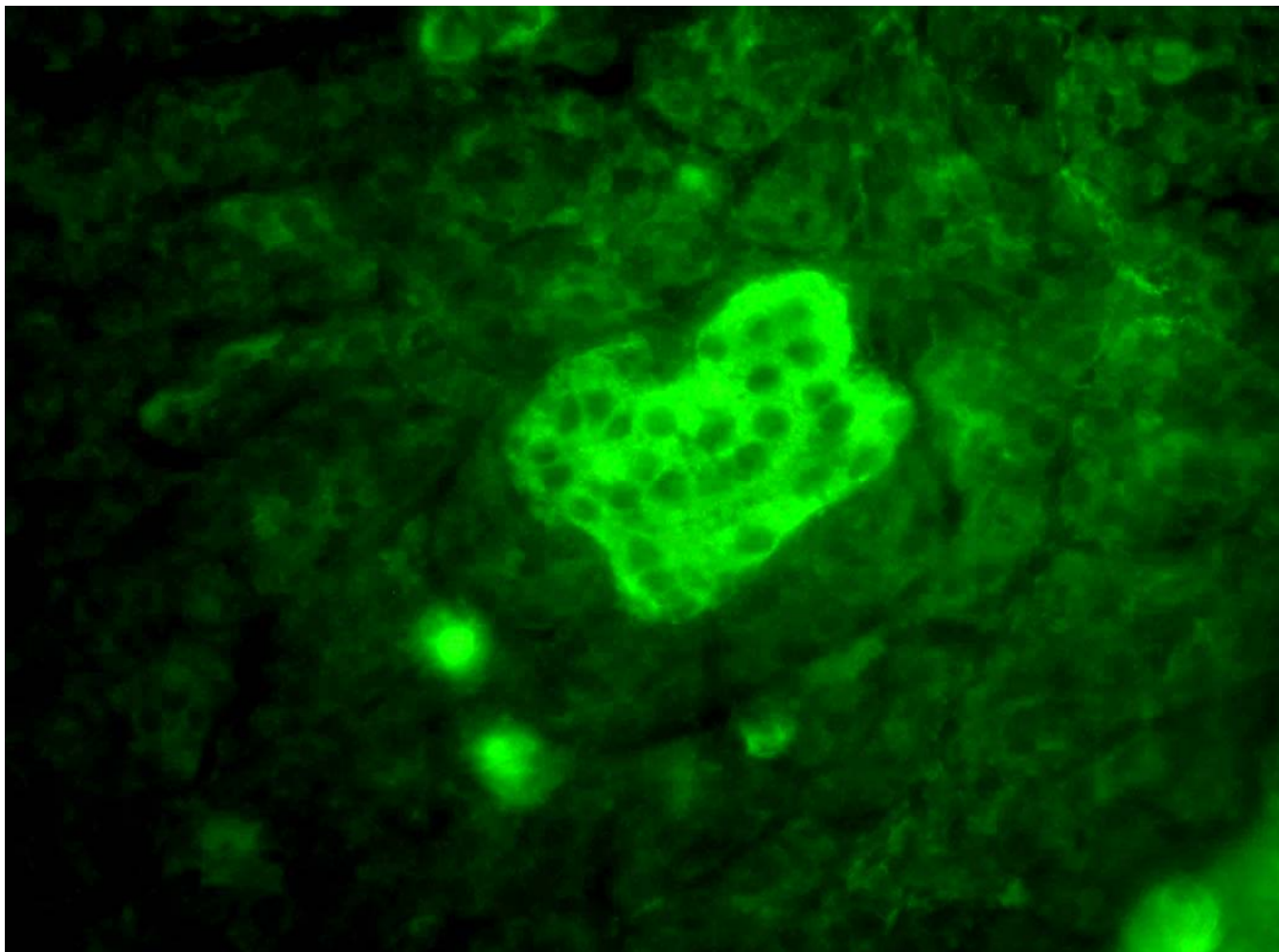
Антитела к бокаловидным клеткам,
тонкая кишка обезьяны, 1:100, x40,
анти-IgG- FITC

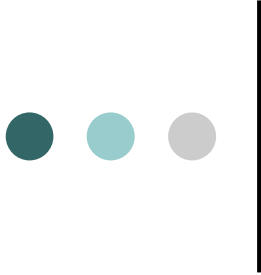


Эндокринные заболевания

Щитовидная железа	Т3, Т4, ТТГ Антитела к ТПО, ТГ, рецептору ТТГ
Сахарный диабет 1 типа	Снижение толерантности к глюкозе С-пептид Антитела к островкам Лангерганса
Болезнь Аддисона	АКТГ, Альдостерон Антител к клеткам надпочечника

● ● ● | Антитела к островковым
клеткам поджелудочной (ICA)





Диагностика неврологических заболеваний

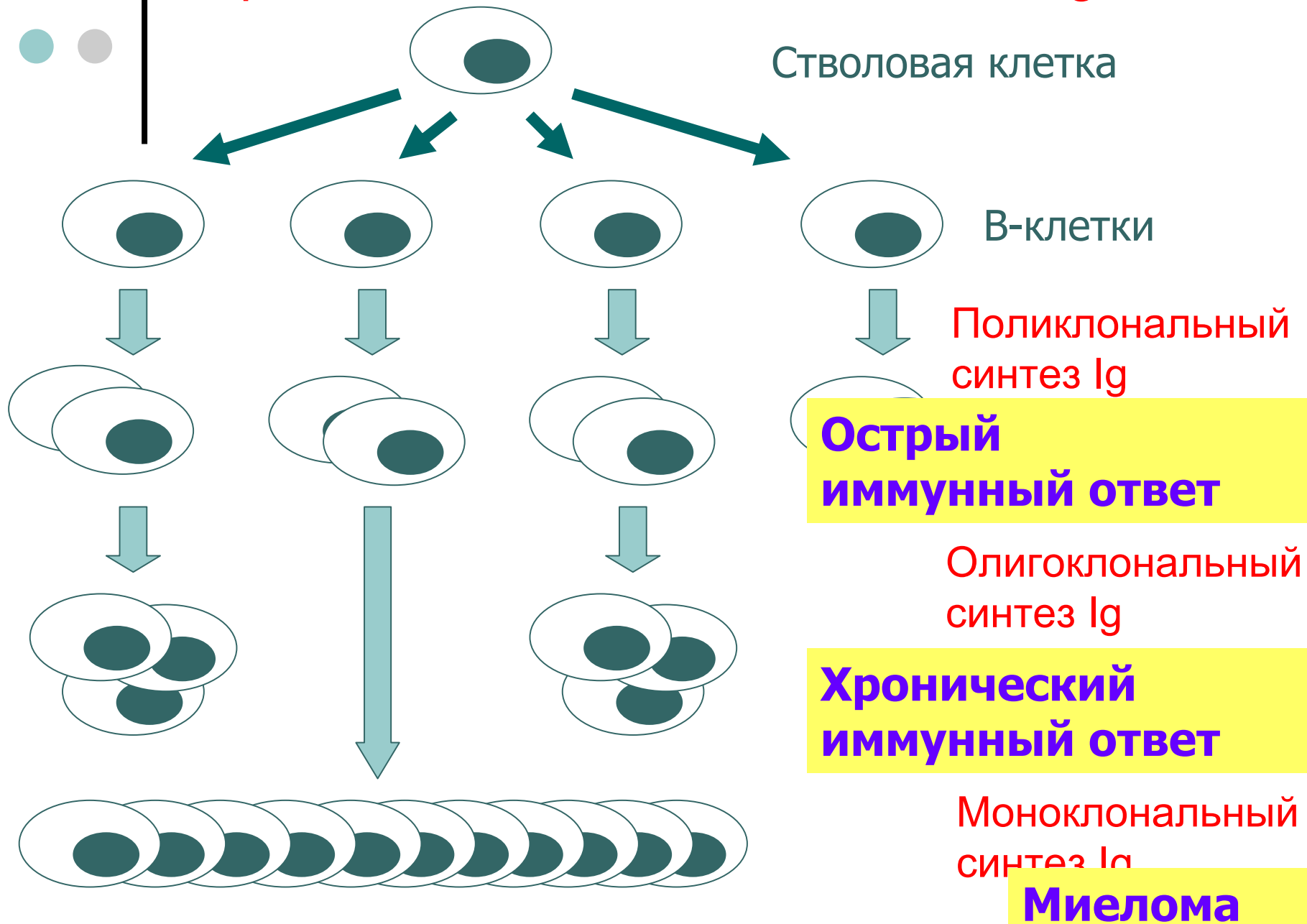
Демиелинизирующие поражения ЦНС	Олигоклональный IgG в ликворе и сыворотке, Каппа/лямбда легкие цепи в ликворе
Демиелинизирующие поражения нервов	Антитела к ганглиозидам
Полиммиозит	АНФ, анти-Jo1, RNP, PM-ScI, Mi-2, Ku
Миастения	Антитела к скелетным мышцам



Исследование ликвора при РС

- Белково-клеточная диссоциация
- Определение индекса проницаемости ГЭБ (альбуминовый коэфф. – Q_{alb})
- Определение местного синтеза Ig (индекс IgG), содержание легких цепей в ликворе и сыворотке крови
- Обнаружение **олигоклонального IgG**

Варианты клональности и синтеза Ig's



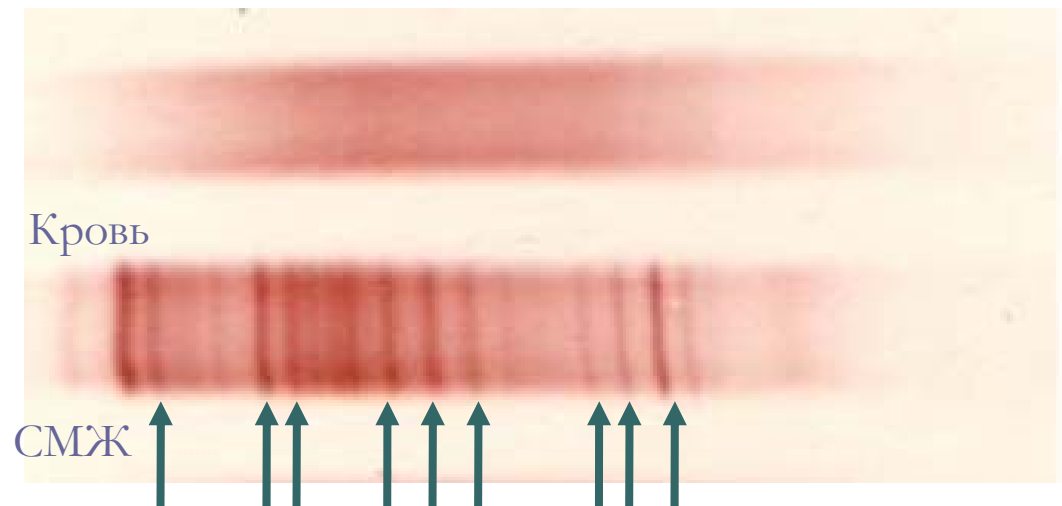
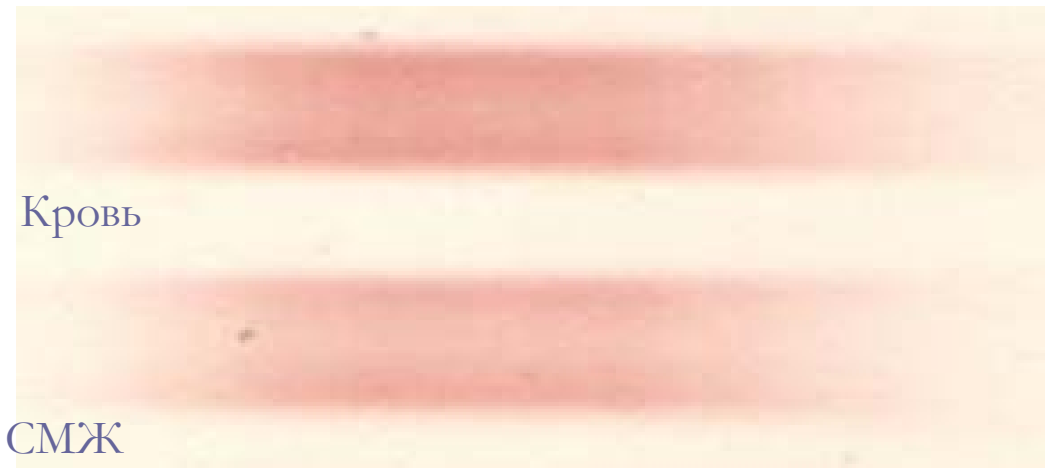
Варианты иммунного ответа в СМЖ (изоэлектрофокусирование IgG)

- Норма

(поликлональный ответ
в крови и в ликворе)

- Рассеянный склероз

(олигоклональный ответ
только в ликворе)



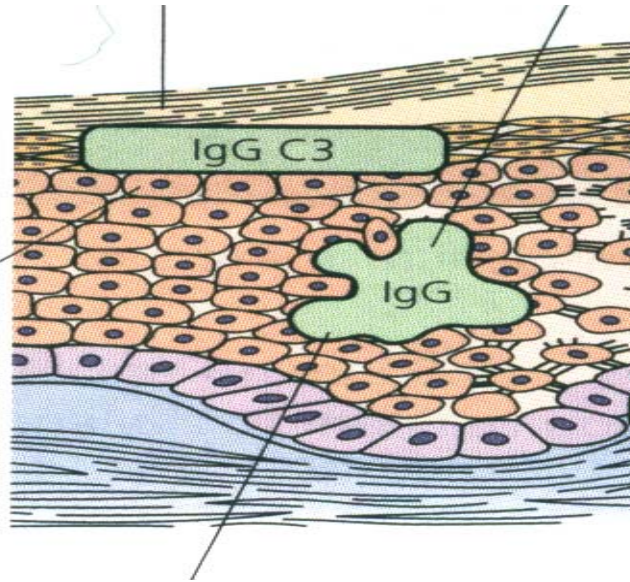
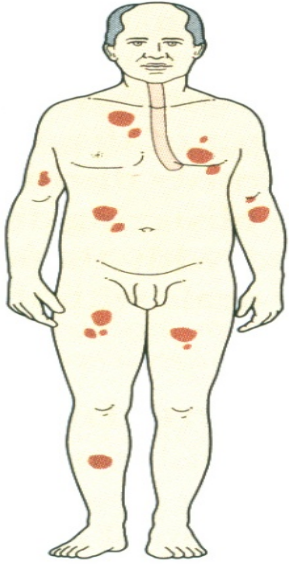


Диагностика пузырных дерматозов

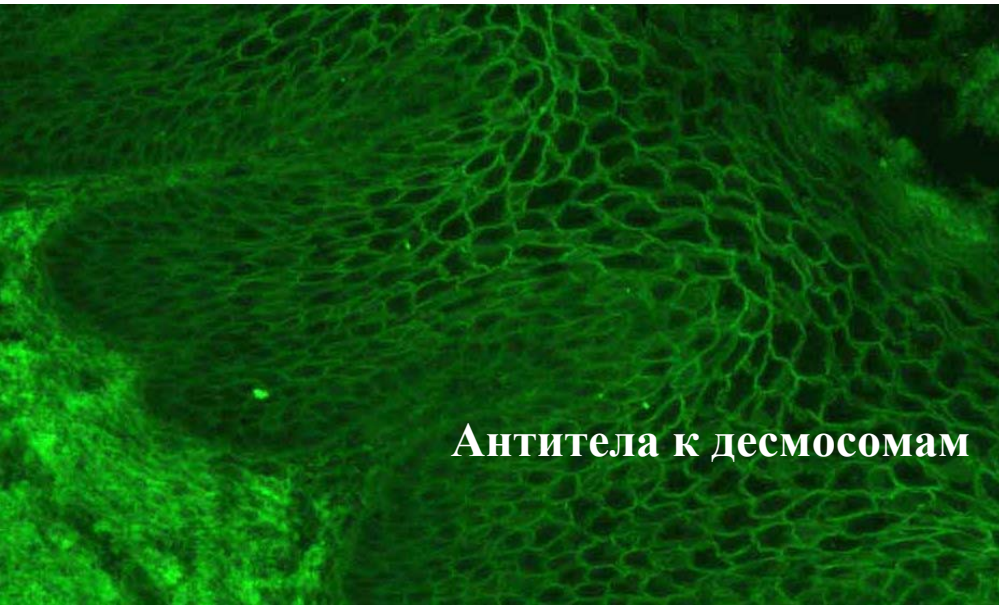
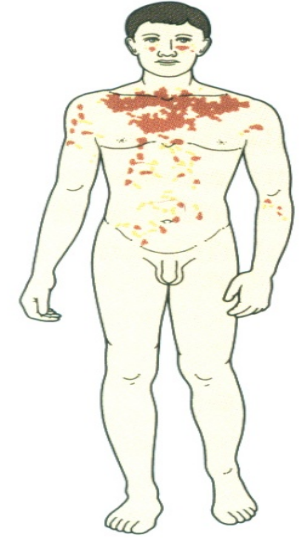
- Возникают аутоантитела к эпителиальным клеткам кожи
- Пузырчатка – антитела к десмосомам
- Пемфигоид – антитела к гемидесмосомам
- Первый этап – серология нРИФ
- Второй этап – пРИФ биопсий кожи
- Титры аутоантител коррелируют с тяжестью заболевания

Антитела к десмосомам кожи при пузырчатке

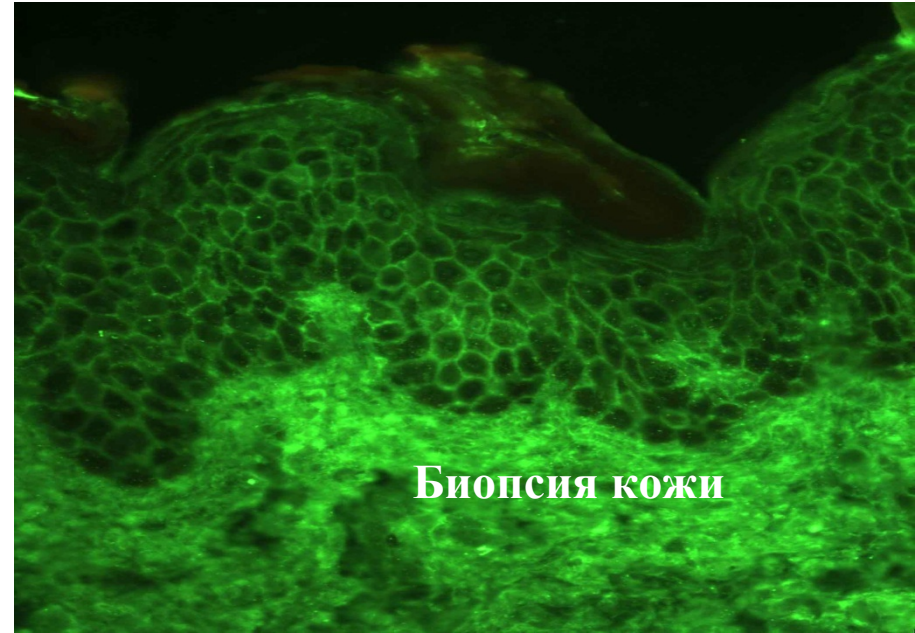
Pemphigus



Pemphigus foliaceus

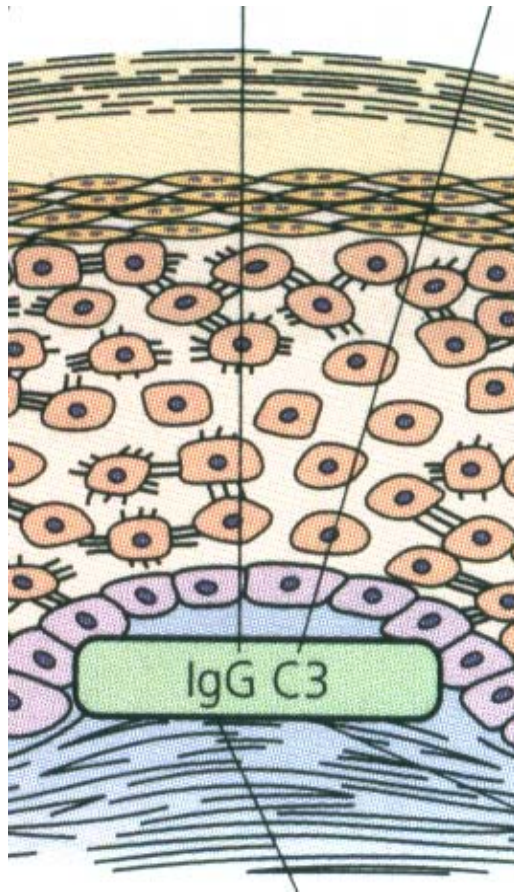
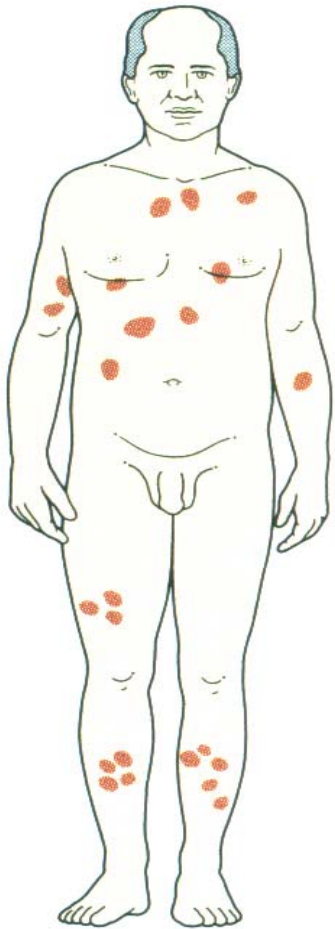


Антитела к десмосомам

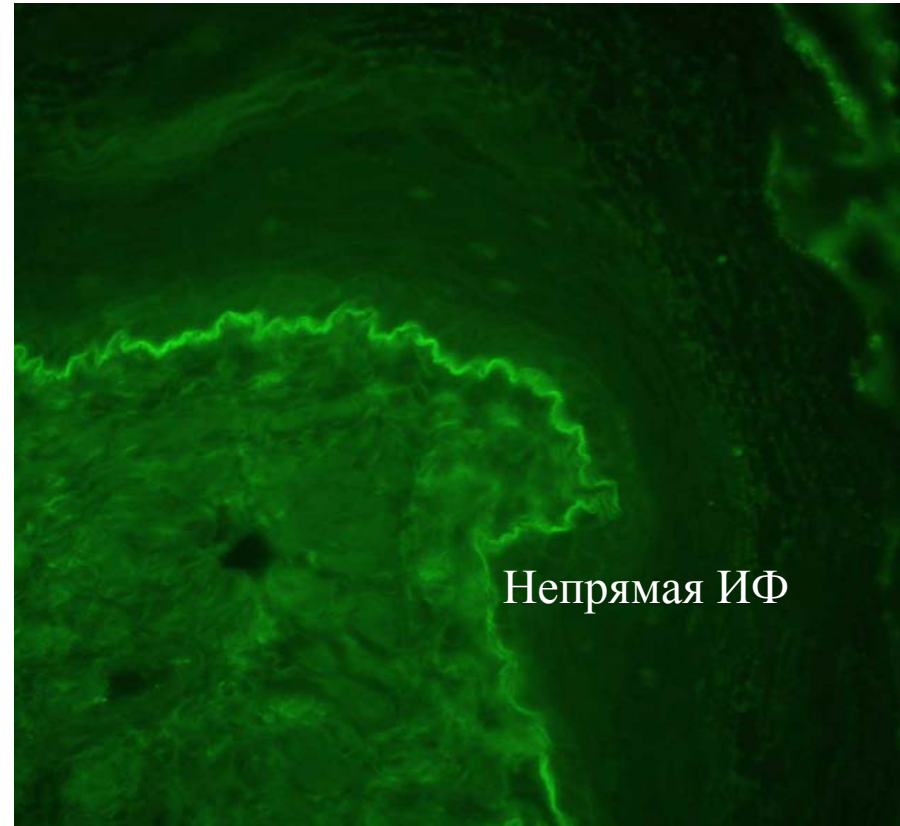


Биопсия кожи

Pemphigoid



Антитела к десмоглеинам при пемфигоиде



Непрямая ИФ