

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ
ПОСЛЕДИПЛОМНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
КАФЕДРА КАРДИОЛОГИИ И РЕВМАТОЛОГИИ

**ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА
РЕВМАТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

Учебно-методическое пособие

МИНСК БелМАПО
2013

УДК 616-002.77-074(075.9)

ББК 55.5_я73

Л 12

Рекомендовано в качестве учебно-методического пособия
УМС Белорусской медицинской академии последипломного образования
протокол № 7 от 11.12. 2013

Авторы:

д.м.н., доцент *Кундер Е.В.*,
д.м.н., профессор *Тябут Т.Д.*,
к.м.н., доцент *Буглова А.Е.*,
д.м.н., доцент *Пристром А.М.*,
к.м.н., доцент *Руцкая Т.А.*,
к.м.н., доцент *Рачок С.М.*,
к.м.н., доцент *Казаков С.А.*,
к.м.н., ассистент *Михно М.М.*,
к.м.н., ассистент *Пырочкин А.В.*,
аспирант *Баилакова Н.А.*

Рецензенты:

доцент 3-ей кафедры внутренних болезней БГМУ, к.м.н.,
доцент Мартусевич Н.А.
2-ая кафедра терапии ФПК и ПК УО «Витебский государственный медицинский университет»

Л 12

Лабораторная диагностика ревматических заболеваний /Е.В. Кундер, Т.Д. Тябут, А.Е. Буглова, [и др.] – Минск: БелМАПО, 2013. – 54 с.

ISBN 978-985-499-706-3

В данном учебно-методическом пособии приведены современные сведения о состоянии системы лабораторной диагностики заболеваний ревматологического профиля. Охарактеризованы основные требования к методам лабораторной диагностики. Изложены современные рекомендации по диагностике ревматоидного артрита, спондилоартритов, системных заболеваний соединительной ткани, системных васкулитов.

Учебно-методическое пособие предназначено для практических врачей терапевтического профиля (ревматологов, кардиологов, терапевтов и др.), студентов медицинских вузов, клинических ординаторов.

УДК 616-002.77-074(075.9)

ББК 55.5_я73

ISBN 978-985-499-706-3

© Кундер Е.В., [и др.], 2013

© Оформление БелМАПО, 2013

СОДЕРЖАНИЕ

Основные принципы лабораторной диагностики в ревматологии.	
Оценка точности лабораторных тестов.....	4
Интерпретация результатов серологического обследования при ревматических заболеваниях. Алгоритм лабораторной диагностики ревматических заболеваний.....	13
Иммунологические методы исследования в ревматологии.....	18
Лабораторные показатели. Аутоантитела. Иммунологическая диагностика ревматоидного артрита и системных заболеваний соединительной ткани.....	24
Лабораторная диагностика васкулитов	31
Лабораторная диагностика воспаления.....	37
Лабораторная диагностика спондилоартритов.....	40
Литература.....	54

Основные принципы лабораторной диагностики в ревматологии. Оценка точности лабораторных тестов

Лабораторное обследование пациента является важнейшим инструментом в практике ревматолога. В ходе лабораторного обследования определяется текущее состояние организма, наличие или отсутствие патологического процесса. Однако необходимо помнить, что не все отличающиеся от нормы изменения в состоянии пациента являются клинически значимыми и требуют терапии. Кроме того, существует некоторый предел возможностей лабораторного обследования пациента, связанный, например, с техническими сложностями выполнения того или иного метода диагностики, а также неоправданными материальными затратами на их выполнение или даже возможностью нанесения вреда организму обследуемого.

Таким образом, при выборе методов обследования пациента необходимо руководствоваться принципами целесообразности, а также учитывать всевозможные ограничения и затраты.

Каждый **лабораторный метод** представляет собой в некотором роде искусственную модель, в которой в ходе определенных измерений исследователь получает искомый результат. Данный результат (показатель) может зависеть как от условий проведения исследования, так и от состояния самого обследуемого.

К любому диагностическому тесту, предлагаемому для использования в практической деятельности врача любой специальности, предъявляются жесткие требования.

Прежде всего, лабораторный тест должен иметь стандартное качество, высокую точность и хорошую воспроизводимость.

Любой метод исследования периодически должен проходить внутренний и внешний контроль качества.

Большое значение имеет и время, затрачиваемое на выполнение исследования. Например, если от результатов теста зависит оказание ургентной терапии, то длительный период выполнения теста является неприемлемым.

Качество обследования пациента зависит также от квалификации исследователя и его добросовестности.

Большое значение имеет правильный забор биологического материала для исследования, методы его хранения, а также сроки и способы транспортировки в лабораторию.

Необходимо уделять внимание также и качеству реактивов, используемых в лабораторном методе, условиям протекания реакций (например, температуре воздуха).

Результаты каждого обследования сопоставляются с нормой. **Норма** – это величина (показатель) лабораторного теста, определяемая опытным путем у здоровых лиц. Для популяций, отличающихся по различным признакам (например, по полу, по возрасту и др.), характерны вариации нормы. Кроме того, существуют параметры, величины которых меняются в течение определенного времени, например, суток (циркадианно) или зависят от определенных состояний (беременность, фаза менструального цикла и др.).

Диагностический показатель – это биологический феномен, возникающий или изменяющийся при патологическом состоянии, который может быть обнаружен с помощью стандартизированного лабораторного метода [1]. Для выявления одного диагностического показателя может быть использовано несколько совершенно разных методов. В связи с этим необходимо понимать, что означает термин «диагностический тест» и чем он отличается от понятия «диагностический показатель».

Диагностический тест – это определение диагностического показателя с помощью конкретного лабораторного метода, аналитические параметры которого находятся на постоянном уровне при условии качества его выполнения [1].

Результаты тестов бывают качественными и количественными, а также положительными (превышающими норму) и отрицательными (находящимися в пределах границ нормы).

Возможность использования результатов тестов в клинической практике определяется как их **диагностическая ценность**.

В рамках доказательной медицины диагностическая ценность лабораторных тестов оценивается путем расчета операционных аналитических характеристик тестов.

Прежде чем приступить к описанию технологии расчета операционных характеристик необходимо привести определение следующих понятий: истинно положительный (отрицательный) результат и ложноположительный (отрицательный) результат.

Истинно положительный результат – результат теста положительный и болезнь присутствует.

Истинно отрицательный результат – результат теста отрицательный и болезнь отсутствует.

Ложноположительный результат – результат теста положительный, но болезнь отсутствует.

Ложноотрицательный результат – результат теста отрицательный, но болезнь присутствует.

Существуют следующие **аналитические операционные характеристики тестов**: диагностическая чувствительность, диагностическая специфичность, прогностическая ценность положительная (предсказательная ценность положительного результата теста), прогностическая ценность отрицательная (предсказательная ценность отрицательного результата теста), индекс точности (диагностическая эффективность теста), отношение правдоподобия положительного результата теста, отношение правдоподобия отрицательного результата теста.

Таблица 1.

Исходные параметры для расчета операционных характеристик тестов

Параметры	Болезнь присутствует	Болезнь отсутствует
Результат положительный	a – истинно положительный	b – ложноположительный
Результат отрицательный	c – ложноотрицательный	d – истинно отрицательный

Операционные характеристики тестов рассчитываются следующим образом:

1. Диагностическая чувствительность $a/(a+c)$;
2. Диагностическая специфичность $d/(b+d)$;
3. Прогностическая ценность положительная (предсказательная ценность положительного результата теста) $a/(a+d)$;
4. Прогностическая ценность отрицательная (предсказательная ценность отрицательного результата теста) $d/(d+c)$;
5. Индекс точности (диагностическая эффективность теста) $(a+d)/(a+b+c+d)$;
6. Отношение правдоподобия положительного результата теста (ОП+) $a/(a+c)/b/(b+d)$;
7. Отношение правдоподобия отрицательного результата теста (ОП-) $c/(a+c)/d/(b+d)$.

Диагностическая чувствительность представляется собой долю обследованных лиц с положительным результатом теста из числа лиц, имеющих определенное заболевание.

Диагностическая специфичность представляет собой долю лиц с отрицательным результатом теста из числа лиц, не имеющих определенного заболевания.

Выбор лабораторного теста для решения конкретной диагностической задачи зависит именно от величины показателей чувствительности и специфичности. Тесты с высокой диагностической чувствительностью используются при невысокой распространенности заболевания в популяции и называются скрининговыми. При высокой распространенности заболевания в популяции необходимо использовать тесты с высокой специфичностью, такие тесты называют подтверждающими.

Среднее значение между диагностической чувствительностью и диагностической специфичностью называется **диагностической эффективностью (индексом точности)** лабораторного теста.

Предсказательная ценность положительного результата теста – это вероятность наличия заболевания у пациента с положительным результатом теста.

Предсказательная ценность отрицательного результата теста – это вероятность отсутствия заболевания у пациента с отрицательным результатом теста.

Необходимо привести определение еще двух важных понятий лабораторной диагностики: претестовой вероятности заболевания и посттестовой вероятности заболевания.

Претестовая вероятность заболевания – вероятность наличия заболевания до проведения конкретного лабораторного теста, вычисляемая на основе распространенности заболевания в популяции.

Посттестовая вероятность заболевания (предсказательная ценность результата лабораторного теста) – вероятность наличия заболевания с учетом результатов конкретного лабораторного теста.

Для определения посттестовой вероятности заболевания предлагается использовать номограммы, учитывающие претестовую вероятность и отношение правдоподобия.

Посттестовую вероятность заболевания можно рассчитать также по формуле, основой расчета является статистическая теорема Байеса.

$$\text{Посттестовая вероятность заболевания} = \frac{\text{чувствительность (Ч)} \times \text{распространенность}}{\text{Ч} \times \text{распространенность} + (1-\text{Ч}) \times (1-\text{распространенность})}$$

В связи с данным расчетом возникает необходимость приведения способа оценки распространенности заболевания в популяции.

$$\text{Распространенность заболевания в популяции} = \frac{(a+c)}{(a+b+c+d)}$$

Необходимо отметить, что практическое использование формулы для расчета посттестовой вероятности заболевания крайне затруднено вследствие сложности оценки распространенности заболевания в популяции.

Одной из наиболее значимых и информативных операционных характеристик теста является отношение правдоподобия результатов теста.

Диапазон значений отношения правдоподобия результатов теста определяет, главным образом, возможность использования результатов теста для постановки диагноза. Если отношение правдоподобия (ОП) =1, претестовая вероятность заболевания равна посттестовой вероятности, а такой тест не имеет диагностического значения.

Наибольшую диагностическую ценность имеют тесты, у которых отношение правдоподобия положительного результата теста (ОП+) >10, а отношение правдоподобия отрицательного результата теста (ОП-) <0,1.

Интерпретация клинической значимости тестов в зависимости от величины отношения правдоподобия положительного и отрицательного результатов теста приведены в таблице 2.

Таблица 2.

Интерпретация клинической значимости тестов в зависимости от величины отношения правдоподобия теста

Клиническая значимость теста	ОП+	ОП-
Высокая	>10	<0,1
Умеренная	5-10	0,1-0,2
Низкая	2-5	0,5-0,2
Очень низкая	1-2	0,5-1
Бесполезный тест	1	1

В ревматологической практике используются рекомендации Американской коллегии ревматологов [2], согласно которым наиболее полезными для диагностики являются лабораторные тесты с ОП+>5 и ОП-<0,2; полезными – с ОП+>2 и ≤5, ОП->0,2 и ≤0,5; не имеющими пользы – с ОП+≤2 и ОП->0,5.

Максимальным значениям чувствительности и специфичности лабораторного теста соответствует **точка разделения (cut-off)** между нормальными и патологическими значениями.

Cut-off рассчитывается в ходе ROC-анализа, результатом которого является характеристическая **ROC (Receiver Operator Characteristic) -кривая**, отражающая зависимость чувствительности от (1-специфичность).

Кривая получается путем соединения нанесенных на плоскость точек, соответствующих величинам чувствительности и специфичности. Точка cut-off - это точка наиболее близкая к перегибу графика. Чем выше к углу, образованному осями лежит ROC-кривая, тем выше значимость (информативность) лабораторного теста.

При проведении ROC-анализа определяется также площадь под кривой. Чем ближе значение площади под кривой к 1, тем выше эффективность теста.

Пример ROC-кривой для теста, обладающего высокой диагностической эффективностью представлен на рисунке 1.

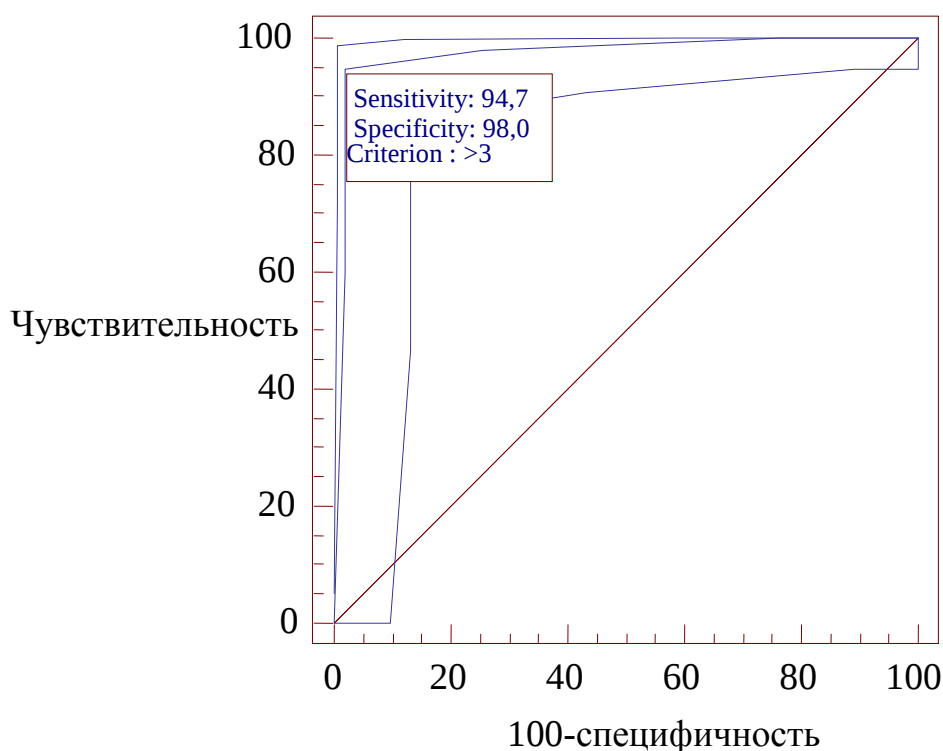


Рисунок 1 – ROC-кривая теста, обладающего высокой диагностической эффективностью

Показатели ROC-анализа теста, представленного на рисунке 1, представлены в таблице 3.

Таблица 3. Показатели ROC-анализа теста, обладающего высокой диагностической эффективностью

Показатели ROC-анализа	Значения
Площадь под ROC-кривой (AUC)	0,97
Стандартная ошибка	0,013
95% Доверительный интервал	93,10-99,20
Уровень значимости (p)	0,0001

Еще одним возможным способом оценки значимости теста является определение **отношения вероятностей (шансов)**. Данный показатель демонстрирует во сколько раз вероятность получить определенный результат теста у пациента с конкретным заболеванием выше (ниже), чем у здорового человека.

Отношение вероятностей = чувствительность / (1-специфичность)

К вновь разрабатываемым диагностическим способам обязаны предъявляться строгие, соответствующие международным стандартам, требования, касающиеся, в первую очередь, оценки аналитических характеристик разрабатываемых тестов. Также обязательным условием является сопоставление нового способа диагностики с **референтным («золотым стандартом»)** по их аналитическим характеристикам. Следует отметить, что референтный тест почти никогда не бывает абсолютным. При хронических воспалительных заболеваниях, к которым относится большинство ревматических заболеваний, в качестве референтного метода используются классификационные критерии заболеваний, основанные на наборе клинических, инструментальных и лабораторных данных. Учитывая, что для подтверждения диагноза требуются показатели с высокой специфичностью, в критерии зачастую искусственно вводятся данные, способствующие максимальному увеличению этого показателя.

В качестве примера можно четко проследить данную тенденцию в критериях спондилоартропатий. Например, критерии ESSG (European Spondyloarthropathy Study Group) (M. Dougados et al., 1991) включают в себя следующие показатели: воспалительная боль в позвоночнике (чувствительность 74,6%, специфичность 82,5%), асимметричный синовит (чувствительность 41,3%, специфичность 87,3%), синовит суставов нижних конечностей (чувствительность 35,3%, специфичность 89,1%), перемежающаяся боль в ягодицах (чувствительность 20,4%, специфичность 97,3%), энтезопатии (чувствительность 56,4%, специфичность 77,6%), сакроилеит не менее 2 стадии (чувствительность 54,4%, специфичность 98,7%), негонококковый уретрит (чувствительность 6,8%, специфичность 96,7%), псориаз (чувствительность 22,7%, специфичность 95,2%), воспалительные заболевания кишечника (чувствительность 9,6%, специфичность 97,3%) и т.д.

Следовательно, вполне реальной является ситуация, когда новый тест, отличающийся высокими показателями чувствительности, должен быть сопоставлен с референтным методом, уступающим ему по аналитическим характеристикам.

С другой стороны, даже классификационные критерии, отличающиеся высокими показателями чувствительности и специфичности зачастую могут быть использованы только на поздних стадиях заболеваний. Например, модифицированные критерии для диагностики анкилозирующего спондилита (S. Van der Linder, H.A. Valkenburg, A. Cats, 1984) с чувствительностью 83% и специфичностью 98% включают такие показатели, как ночная боль и скованность в позвоночнике не менее 3 месяцев, ограничение подвижности позвоночника, уменьшение экскурсии грудной клетки и двухсторонний сакроилеит 2-3 стадии либо односторонний – 3-4 стадии. Все перечисленные признаки характеризуют далеко зашедший патологический процесс.

В случае диагностики заболеваний на ранних стадиях «золотым стандартом» является длительное динамическое наблюдение за больным до развития клинических признаков болезни, которые будут соответствовать диагностическим критериям. В большинстве случаев это совершенно неприемлемо. В частности, при диагностике раннего ревматоидного артрита ждать развития типичной клинической картины совершенно неоправданно, поскольку необходимо назначить адекватную базисную терапию, которая обладает наибольшей эффективностью при назначении в первые 3-6 месяцев от развития клинических симптомов. Необходимо помнить и о том, что в ревматологической практике чрезвычайно много нетипичных проявлений заболе-

ваний, особенно на ранних стадиях, существуют также множественные перекрестные симптомокомплексы.

Имеется категория пациентов, отличающаяся низкой комплаентностью (приверженностью рекомендациям врача), за состоянием здоровья которой не удастся установить должное медицинское наблюдение. В связи с этим динамическое наблюдение в ревматологии не является рациональным, а руководствоваться им можно только при невозможности использования значимых диагностических мер.

Большое внимание уделяется **контролю качества диагностических тестов**. Существует **внутренний (внутрилабораторный) контроль качества**, осуществляемый на основе использования собственных стандартных сывороток, содержащих аттестованные контрольные материалы определенной специфичности в известной концентрации, периодического использования отрицательных и положительных контролей, построения калибровочных графиков.

Внешний контроль качества проводится в рамках региональных, республиканских, международных и других программ мониторингирования качества лабораторных исследований. В соответствии с европейскими рекомендациями качество тестов признается удовлетворительным, если результат находится в пределах M (среднее арифметическое) $\pm 10\%$ крупнейших референсных лабораторий [1].

На практике для решения конкретной диагностической задачи используются **комбинации тестов**. Комбинация тестов может быть параллельной и последовательной.

Параллельная комбинация тестов используется при первичном обследовании пациента, при разрешении urgentной диагностической задачи, при диспансеризации. В данных ситуациях целесообразно использовать тесты с высокой специфичностью, что позволит избежать гипердиагностики патологических состояний. В качестве примеров параллельной комбинации тестов можно привести обследование на ревматоидный фактор и антитела к циклическим цитруллинированным пептидам у пациентов с ревматоидным артритом, а также исследование уровня антител к двухспиральной ДНК и LE-клеток при диагностике системной красной волчанки.

При **последовательном назначении методов обследования** необходимо учитывать наличие скрининговых и подтверждающих тестов. Скрининговые тесты обладают высокими показателями чувствительности, а подтверждающие отличаются наибольшей специфичностью. При последовательной комбинации тестов последующие исследования назначаются только после

получения результатов предыдущих. Наиболее целесообразно в данном случае руководствоваться принципом «от простого к сложному», например, выявление хламидийной урогенитальной инфекции должно начинаться с иммунофлуоресцентного анализа, далее назначается ПЦР-исследование, а затем используется культуральный метод. Данный принцип позволяет значительно повысить специфичность обследования пациента, а также снижает в целом стоимость обследования.

Несмотря на наличие высокоточных методов лабораторной диагностики, огромное значение для правильной диагностики ревматических заболеваний имеет подробный сбор анамнеза, детальное физикальное обследование и наблюдение за пациентом.

Интерпретация результатов серологического обследования при ревматических заболеваниях

Алгоритм лабораторной диагностики ревматических заболеваний

Основными методами лабораторной диагностики в ревматологии являются определение аутоантител, иммуноглобулинов различных классов, циркулирующих иммунных комплексов, белков острой фазы воспаления, компонентов системы комплемента, маркеров клеточного иммунитета, маркеров генетической предрасположенности к различным заболеваниям, маркеров повреждения эндотелия, показателей костного метаболизма и т.д.

Серологическое обследование – это обнаружение антител и антигенов в сыворотке крови или другом биологическом материале с использованием реакций «антиген-антитело». При ревматических заболеваниях серологическое обследование подразумевает обнаружение циркулирующих аутоантител. Большинство ревматических заболеваний являются аутоиммунными, поэтому спектр аутоантител при данной патологии чрезвычайно разнообразен.

Аутоиммунные заболевания – это такие заболевания, при которых возникает реакция системы иммунитета на собственные антигены (белки, гликопротеиды, липопротеиды и др.), обусловленная нарушением распознавания «своих» молекул и восприятием их как «чужих», что приводит к разрушению данных молекул и развитию патологического процесса.

Определение различных аутоантител необходимо не только для диагностики заболеваний как таковых, но и для характеристики клинко-лабораторных вариантов их течения, оценки прогноза и эффективности проводимых терапевтических мероприятий.

Антитела – это иммуноглобулины классов М, G, А, D и E, продуцируемые В-лимфоцитами (плазматическими клетками) и специфично взаимодействующие с антигенами. Иммуноглобулины при электрофорезе сыворотки крови образуют γ -фракцию. Секреторные иммуноглобулины (IgA) выявляются в секреторных жидкостях (слезная жидкость, слизь из полости носа, слюна и т.д.).

В структуре молекулы иммуноглобулина различают 2 тяжелые (H - heavy) и 2 легкие (L - light) цепи, которые соединяются между собой дисульфидными связями. Тяжелые цепи определяют принадлежность иммуноглобулинов к соответствующему классу: IgG имеют тяжелую цепь – γ , IgA – тяжелую цепь α , IgM – тяжелую цепь μ , IgD – тяжелую цепь δ , IgE – тяжелую цепь ϵ .

В молекуле иммуноглобулинов имеются константные (C) и переменные (V) фрагменты. Замкнутые в виде сфер участки иммуноглобулиновых молекул называются домены. В константных фрагментах различают CL, CH1, CH2 и CH3 домены, а в IgM и IgE еще выделяют CH4 домены, в переменном фрагменте тяжелой цепи имеются VH домены, а в переменном фрагменте легкой цепи - VL домены. Гиперпеременные участки (участки, где наиболее часто происходят замены аминокислот) доменов тяжелой и легкой цепей иммуноглобулинов образуют активный центр молекулы иммуноглобулина (антитела).

Между CH1 и CH2 доменами тяжелой цепи находится так называемый шарнирный участок молекулы иммуноглобулина. Именно на данный участок направлено действие протеолитических ферментов, в частности, папаина, под действием которого молекула иммуноглобулина расщепляется на два Fab-фрагмента (Fragment antigen binding - фрагмент, связывающий антиген) и один Fc-фрагмент (Fragment crystallable - фрагмент кристаллизующийся).

IgG представляют собой основную фракцию иммуноглобулинов сыворотки крови (75-85%). Их концентрация в сыворотке крови здорового человека составляет 8-12 г/л. Различают четыре подкласса IgG: G1, G2, G3, G4 (по строению Fc-фрагмента).

Ig M в сыворотке крови находятся в виде пентамеров и имеют большую молекулярную массу (около 950 кДа). Их концентрация в сыворотке крови здорового человека составляет 0,8-1,5 г/л.

IgA присутствуют в сыворотке крови в виде мономеров, а в секреторных жидкостях – в виде димеров и тримеров. Их концентрация в сыворотке крови здорового человека составляет 1,5-3 г/л.

IgD присутствуют в сыворотке крови здоровых людей в концентрации 0,03-0,04 г/л.

IgE в сыворотке крови здоровых людей имеют концентрации 0-100 МЕ/мл. Их содержание в сыворотке крови значительно увеличивается при аллергии.

Содержание иммуноглобулинов G, M и A классов в сыворотке крови и различных биологических жидкостях определяют с помощью радиальной иммунодиффузии в агаре (реакции преципитации по Манчини).

Аутоантитела – это антитела, которые специфично связываются с эпитопами молекул человека. Установлено, что присутствие различных аутоантител характерно для совершенно здоровых людей, их количество может увеличиваться у лиц пожилого возраста, при инфекционных процессах вирусного и бактериального происхождения, при злокачественных новообразованиях, хронических интоксикациях, на фоне приема лекарственных препаратов, но наибольшие уровни аутоантител отмечены при аутоиммунных и аллергических заболеваниях.

Основными разновидностями аутоантител при ревматических заболеваниях являются следующие: антинуклеарные антитела (АНА), антинейтрофильные цитоплазматические антитела (АНЦА), антифосфолипидные антитела (АФЛ), ревматоидный фактор (РФ), антитела к циклическому цитруллинированному пептиду (АЦЦП).

Без определения перечисленных аутоантител совершенно невозможно представить себе современную диагностику таких заболеваний как системная красная волчанка, системная склеродермия, дерматомиозит (полимиозит), системные васкулиты, антифосфолипидный синдром, ревматоидный артрит.

Серологическими маркерами можно считать те аутоантитела, встречаемость которых при конкретном заболевании составляет более 60-70%, а в норме и при других заболеваниях менее 1%. Высокоспецифичными серологическими маркерами являются те разновидности аутоантител, которые встречаются исключительно при конкретном заболевании [1]. Примером является наличие антител к двухспиральной ДНК у пациентов с системной красной волчанкой. Некоторые высокоспецифичные аутоантитела могут быть предикторами развития аутоиммунных заболеваний. Например, антитела к циклическим цитруллинированным пептидам появляются за некоторое время до развития симптомов ревматоидного артрита.

При серологической диагностике имеет значения **титр** выявляемых аутоантител. Чем выше титр, тем больше специфичность и выраженность иммунного ответа. По поводу корреляции титров аутоантител с активностью

заболеваний имеются разноречивые суждения. Тем не менее, чрезмерно высокие титры антител к двухспиральной ДНК сопровождают системную красную волчанку с высокой активностью, а также наблюдаются при впервые выявленном заболевании. Другим примером может служить выявленная в наших исследованиях прямая зависимость между уровнем антител к циклическому цитруллинированному пептиду и активностью ревматоидного артрита.

Бесспорным является тот факт, что обнаружение определенных аутоантител может свидетельствовать о конкретном клиническом варианте течения того или иного заболевания. Например, у пациентов с системной красной волчанкой обнаружение антител к Ro/SS-A свидетельствует о маловероятном вовлечении почек в патологический процесс, в то время как предиктором развития гломерулонефрита при данном заболевании являются антитела к двухспиральной ДНК.

Поскольку большинство тестов для выявления антител основаны на связывании аутоантитела и антигена, то результат исследования зависит не только от реальной концентрации аутоантител в исследуемом материале, но и от аффинности антител.

Аффинность антител - это степень сродства антител к антигенам, основанная на силе связи антигенсвязывающего центра антитела с эпитопом антигена.

Для выявления одних и тех же аутоантител предлагаются разнообразные методы. При их использовании можно получить качественный результат (есть или нет), а также количественный (титр или уровень). Обычно вначале назначаются более простые методы детекции аутоантител, обладающие более высокой чувствительностью, чем специфичностью (скрининг), а в дальнейшем для подтверждения наличия определенной разновидности аутоантител уже используются методы, обладающие высокими показателями специфичности.

В ревматологии существует **алгоритм лабораторной диагностики основных заболеваний, разработанный международным комитетом по стандартизации методов определения аутоантител** (A.S. Wiilk, 2004). Основные подходы к диагностике ревматических заболеваний в соответствии с данным алгоритмом изложены ниже.

Для диагностики **системной красной волчанки** в качестве первичного скринингового метода исследования используется определение АНА методом НИФ, далее для подтверждения заболевания рекомендуют применять тесты по выявлению анДНК, антител экстрагируемым ядерным антигенам (ан-

тител к Sm (Smith) антител к SS-A/Ro (Robert), антител к SS-B/La (Lane)) методом НИФ, антител к рибонуклеопротеинам методом ИФА, двойной иммунодиффузии по Оухтерлони, контриммуноэлектрофореза и иммуноблотинга., а также антифосфолипидных (АФЛ) антител (антител к кардиолипину (АКЛ)) методом ИФА.

Основным скрининговым методом диагностики **системной склеродермии** является определение АНА методом НИФ, подтверждают диагноз результаты обследования на наличие антител к экстрагируемым ядерным антигенам, среди которых при данном заболевании наибольшее значение имеют антитела U1РНП и Scl-70. Для данного исследования могут быть использованы методы ИФА, двойной иммунодиффузии по Оухтерлони, контриммуноэлектрофореза и иммуноблотинг. В качестве дополнительного метода обследования при системной склеродермии рекомендуют определять АФЛ антитела (АКЛ) с помощью ИФА.

У пациентов с **дерматомиозитом (полимиозитом)** в качестве скринингового теста рассматривается определение АНА методом НИФ, подтверждающими методами обследования является обнаружение антител к экстрагируемым ядерным антигенам, а именно U1РНП и Jo-1 методами ИФА, двойной иммунодиффузии по Оухтерлони, контриммуноэлектрофореза и иммуноблотинга.

При **смешанном заболевании соединительной ткани** скрининговым тестом является определение АНА методом НИФ, а подтверждение диагноза возможно на основании выявления антител к экстрагируемым ядерным антигенам (Sm (Smith), U1РНП) вышеуказанными методами. Для дифференциальной диагностики с ревматоидным артритом проводится обследование на РФ методом ИФА, нефелометрии или агглютинации, а для исключения антифосфолипидного синдрома необходимо исследовать уровень АФЛ (АКЛ) методом ИФА.

Для диагностики **антифосфолипидного синдрома** используется определение АНА методом НИФ, а обнаружение АФЛ антител (АКЛ, антител к β_2 гликопротеиду I ($\alpha\beta_2$ -ГП I)) методом ИФА является подтверждающим методом обследования при данном заболевании.

Определяющими методами диагностики **ревматоидного артрита** является определение РФ методом ИФА, нефелометрии или агглютинации, а также АЦЦП методом ИФА.

При **системных васкулитах** скрининговым методом является обнаружение АНЦА методом НИФ, а для диагностики определенных вариантов васкулитов необходимо определять разновидности данной популяции ауто-

антител (цитоплазматические АНЦА к протеиназе 3 (цАНЦА/ПР3) и перинуклеарные АНЦА к миелопероксидазе (пАНЦА/МПО)) методом НИФ и ИФА.

Качество серологического обследования при выявлении ревматического заболевания существенно повышается при комбинированном использовании различных тестов. Например, при установлении диагноза ревматоидный артрит необходимо исследовать как ревматоидный фактор, так и антитела к циклическим цитруллинированным пептидам, а при подозрении на системную красную волчанку необходимо определить не только уровень антител к двухспиральной ДНК, но и другие варианты АНА, а также антифосфолипидные антитела.

Иммунологические методы исследования в ревматологии

В ревматологии иммунодиагностика является основным инструментом лабораторного обследования пациентов.

Все методы иммунодиагностики можно разделить на **неспецифические** (направленные на характеристику состояния различных компонентов системы иммунитета: макрофагов, комплемента, гранулоцитов и др.) и **специфические** (направленные на выявление иммунных Т-лимфоцитов, различных аутоантител и антигенов). Для ревматологии наибольшее значение имеют специфические иммунологические методы.

Существует также деление иммунологических тестов на **«функциональные»**, когда количественный подсчет антител основан на их биологической активности, и **иммунометрические**, основанные на количественном определении антител в составе иммунных комплексов. Недостаток функциональных тестов состоит в их низкой воспроизводимости, достаточной трудоемкости и сложности стандартизации. Примером функционального теста является определение АНА с помощью обнаружения LE-клеток («волчаночных» клеток). Данный метод, безусловно, уступает по аналитическим характеристикам и воспроизводимости методу определения АНА путем непрямо́й иммунофлуоресценции (НИФ) (иммунометрический тест).

Широко употребляемым термином в клинической практике является **«иммунный статус»**, который необходимо понимать как состояние системы иммунитета обследуемого пациента (здорового человека) в конкретных окружающих его условиях.

Оценка иммунного статуса проводится на основании комплекса показателей, характеризующих состояние системы иммунитета. Оценка иммунного статуса включает характеристику клеточного и гуморального иммунитета.

Первым этапом обследования является общий анализ крови, в котором обращают внимание на количество форменных элементов (лейкоцитов разных типов: нейтрофилов, базофилов, эозинофилов, моноцитов и лимфоцитов). Нормальное содержание лейкоцитов составляет $4-9 \times 10^9/\text{л}$. При аутоиммунной патологии определяющим фактором является характеристика лимфоцитов. Общее количество лимфоцитов составляет 20-36% от всех лейкоцитов, а в абсолютном выражении примерно 2000 клеток в 1 мм^3 крови. Содержание Т-лимфоцитов составляет 50-70% от общего количества лимфоцитов или 1000-1400 клеток в 1 мм^3 крови. Самым простым методом подсчета количества Т-лимфоцитов является реакция розеткообразования с эритроцитами барана. Более точные результаты получают при проведении РИФ с использованием меченных моноклональных антител к CD-антигенам (CD2, CD3). Далее оценивают содержание Т-хелперов и Т-супрессоров с помощью моноклональных антител к CD4 (Тх) и CD8 (Тс) антигенам. Содержание Т-хелперов в норме составляет 33-45%, Т-супрессоров – 17-25%. Определяется также иммунорегуляторный индекс (ИРИ), представляющий собой соотношение Тх/Тс. У здорового человека ИРИ составляет 14-2,0. При ревматических заболеваниях, как правило, наблюдается увеличение ИРИ. Одной из характеристик Т-лимфоцитов является их способность к синтезу различных цитокинов (интерлейкинов), содержание которых в биологических жидкостях оценивают методом ИФА. Функциональными характеристиками Т-лимфоцитов являются также пролиферативная активность (оценивается с помощью реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ)) и цитотоксическая активность.

Для оценки содержания В-лимфоцитов используют моноклональные антитела к антигенам CD19-CD22, CD72. У здорового человека В-лимфоциты составляют 17-25% от количества всех лимфоцитов или в абсолютном выражении 600-800 клеток в 1 мм^3 крови. К функциональной характеристике В-лимфоцитов относится продукция ими иммуноглобулинов. Характеристика системы гранулоцитов и моноцитов подразумевает определение количества различных лейкоцитов, оценку поглотительной (фагоцитарное число и фагоцитарный индекс), переваривающей способности фагоцитов (по количеству выросших колоний из лизатов лейкоцитов, участвовавших в

фагоцитозе), метаболической активности (в реакции с нитросиним тетразолием).

Фагоцитарное число представляет собой среднее количество частиц (микроорганизмов) в одном фагоците. Нормальное значение для одного стафилококка составляет 6-12 частиц (микроорганизмов).

Фагоцитарный индекс – это количество фагоцитов, участвующих в фагоцитозе (имеющих поглощенные частицы (микроорганизмы)). У здорового человека фагоцитарный индекс равняется 60-80%.

На гранулоцитах и моноцитах возможно определение антигенов CD14, CD11, CD18, HLA-DR и др., выявление рецепторов к иммуноглобулинам и компонентам комплемента. Оценивается их способность к синтезу цитокинов, к хемотаксису.

Специфические методы иммунодиагностики базируются на методах выявления антител (иммуноглобулинов), иммунных Т-лимфоцитов и методах выявления антигенов.

Реакция иммунофлуоресценции (РИФ) используется для выявления АНА, АНЦА, антител к ДНК, антител к центромере, АФЛ, антиперинуклеарных антител, антител к митохондриям и др. Данный метод подразделяется на прямую и непрямую (НИФ) иммунофлуоресценцию. Прямой метод РИФ основан на свечении антигенов, обработанных сывороткой, содержащей определенные антитела, меченные флуорохромами, или на свечении антигенов при связывании с антителами, мечеными флуорохромом, в люминесцентном микроскопе. В качестве флуорохрома чаще всего используют флуоресцеин изотиоционат (ФИТЦ). Прямая иммунофлуоресценция наиболее широко применяется в морфологических исследованиях биопсийного материала (биопсия кожи, почек и др.), цитологических, микробиологических исследованиях.

НИФ заключается в выявлении комплекса антиген-антитело с помощью сыворотки против первично связанных антигеном антител, меченной флуорохромом.

НИФ может использоваться для выявления, как антигенов, так и антител, т.е. является серологическим методом иммунодиагностики. Поскольку аутоантитела могут связываться с различными структурами субстрата (например, к антигенам хроматина, ядрышка, митохондрий и т.д.), то и типы свечения в люминесцентном микроскопе могут быть разные. Возможны ситуации, когда одновременно выявляются несколько типов свечения, что свидетельствует о наличии нескольких разновидностей антител одновременно. Основным субстратом для проведения НИФ является перевиваемая клеточ-

ная линия НEr-2. Метод иммунофлюоресценции является важным в ревматологии, он может быть использован как скрининговый, позволяет выявлять одновременное присутствие нескольких разновидностей антител. Однако существует определенная субъективность учета результатов теста, напрямую зависящая от квалификации исследователя.

Реакция агглютинации основана на склеивании антигенов в виде частиц (микробные клетки, эритроциты и другие корпускулярные антигены), с антителами и выпадении образовавшегося комплекса в осадок.

Различают микробную агглютинацию (если в качестве диагностикума используют микробы), гемагглютинацию (с эритроцитами), латекс-агглютинацию (с частицами латекса) и др. Агглютинация может быть прямой, когда в реакции антитела агглютинируют антигены непосредственно. Реакция прямой агглютинации используется для выявления микробных антигенов, а также для определения групп крови. При проведении реакции непрямой (пассивной) агглютинации антиген адсорбируется на носителе (латекс, полистерол и др.). В реакции пассивной гемагглютинации в качестве антигенного носителя выступают эритроциты.

В ревматологии реакция непрямой агглютинации чаще всего используется для обнаружения РФ. Данная реакция основана на выявлении антител сыворотки крови пациента с использованием антигенного диагностикума (эритроциты или частицы латекса с адсорбированными на них антигенами). Результатом взаимодействия антител с антигенами является выпадение осадка. В ходе данного исследования наличие антител можно определить качественно или указать их титр. В последнем случае необходимо добавлять диагностикум в пробирки с разведениями сыворотки крови пациента. Для обнаружения РФ могут использоваться также методы нефелометрии и турбидиметрии. Чаще всего при этом определяют IgM РФ. Однако перечисленные методы по аналитическим характеристикам уступают ИФА.

Реакция преципитации используется для выявления антител к экстрагируемым ядерным антигенам (антитела к Sm, U1-рибонуклеопротеинам, Ro/SSA, La/SSB, Scl-70, Jo-1), склеродермических антител (антител к Scl-70), антинуклеолярных антител (антитела к PM-Scl, U3-рибонуклеопротеинам, Th/To и др.), миозит-специфических антител (антител к аминоксилсинтетазам t-RНК (Jo-1), Mi-2, PM-Scl, KJ и др.). В реакции участвуют растворимые антигены - преципитиногены (продукты микроорганизмов, тканей, химические вещества и лекарства). Антитела (преципитины), соединяясь с растворимыми антигенами, вызывают их агрегацию, что проявляется в помутнении прозрачных жидкостей или выпадении осадка (преципитата). Диагностиче-

ские преципитирующие сыворотки выпускают с высоким титром антител. Их получают путем иммунизации лабораторных животных соответствующим антигеном. Титром преципитирующей сыворотки является минимальное количество антигена, которое данная сыворотка может преципитировать.

Наиболее часто используются такие варианты реакции преципитации как двойная иммунодиффузия по Оухтерлони в геле и иммуноэлектрофорез (комбинация метода электрофореза и иммунопреципитации).

Реакция преципитации по Манчини основана на иммунодиффузии в геле и используется для определения содержания различных классов иммуноглобулинов в сыворотке крови. Метод двойной иммунодиффузии в геле и иммуноэлектрофорез отличаются простой и экономичностью, но обладают невысокой чувствительностью. На преципитации основаны методы нефелометрии и турбидиметрии.

Радиоиммунный анализ используется для определения АНА, антител к дезоксирибонуклеопротейну, антител к гистонам. Этот метод основан на реакции антиген-антитело, при этом один из компонентов взаимодействия метится радионуклидом. В качестве радиоактивного изотопа чаще всего используются изотопы йода (^{125}I или ^{131}I). Радиоактивность образовавшегося комплекса, определяемая при помощи счетчика, прямо пропорциональна количеству связавшихся антигенов и антител.

Иммуноферментный анализ (ИФА) используется для обнаружения антител к двухспиральной ДНК, антител к гистонам, антихроматиновых антител, антител к дезоксирибонуклеопротейну, антител к Sm (Smith) антигену, антител к рибонуклеопротейнам, антител к SS-A/Ro (Robert), антител к SS-B/La (Lane), антител к Scl-70, миозит-специфических антител, РФ, антител к циклическому цитруллинированному пептиду (АЦЦП антител), АФЛ антител, АНЦА и др.

Как видно, ИФА является одним из самых востребованных методов иммунологической лабораторной диагностики ревматических заболеваний. ИФА основан на выявлении антигенов или антител с помощью ферментов – меток (чаще используется пероксидаза хрена, бета-галактозидаза, щелочная фосфатаза). После того как произойдет взаимодействие между антигеном и антителом, меченым ферментом, в реакционную смесь добавляется смесь субстрата с хромогеном (например, перекись водорода + тетраметилбензидин), при этом происходит расщепление субстрата ферментом, приводящее к изменению окраски реакционной смеси. Интенсивность окраски прямо пропорциональна количеству прореагировавших антигенов и антител. ИФА является одним из основных методов иммунодиагностики, используемых в

ревматологии. Претензии к данному методу чаще всего связаны с его недостаточно высокой специфичностью при удовлетворительных показателях чувствительности. В сыворотке крови параллельно с высокоаффинными антителами присутствуют полиспецифичные антитела, конкурирующие с высокоспецифичными за связывание с антигеном. Необходимо учитывать также, что уровень антител к биологическим жидкостям зависит от многих факторов как самого организма, так и от внешних воздействий. При неудовлетворительном качестве субстрата – антигена, иммобилизованного на полистирол (например, при присутствии бактериальных компонентов), создаются условия для взаимодействия антител с примесями к субстрату, что приводит к ложноположительным результатам реакции. В то же время при очистке антигена может произойти изменение его белковой структуры, что приводит к взаимодействию с неспецифичными антителами.

Наибольшую эффективность ИФА имеет при использовании тест-систем на основе сэндвич-технологии (ELISA). В данном случае на полистироле планшеты антигены фиксируются с помощью моноклональных антител.

Иммуноблотинг может использоваться для выявления антител к Sm (Smith), антител к рибонуклеопротеину, антител к Scl-70, антител к центромере, антител к SS-A/Ro (Robert), антител к SS-B/La (Lane), антинуклеоларных антител (aPM/Scl), миозит-специфических антител. Иммуноблотинг основан на сочетании электрофореза и ИФА. Данный метод является наиболее чувствительным и специфичным для анализа антигенной специфичности антител. В основе метода лежит электрофорез антигенов в полиакриламидном геле с последующим перенесением (блоттингом) на нитроцеллюлозную мембрану белкового материала, фракционированного в соответствии с зарядом и массой антигенов. После этого мембрана блокируется индифферентным белком для предотвращения неспецифического связывания антител. Далее мембрана с нанесенными белками инкубируется с сывороткой, содержащей антитела. После связывания антител с соответствующими мишенями, комплексы антиген-антитело выявляются с помощью античеловеческой сыворотки, меченной ферментом. На последнем этапе фермент-содержащие комплексы визуализируют с помощью ферментного субстрата, окисление которого приводит к образованию нерастворимых, окрашенных продуктов ферментативной реакции в месте расположения комплексов.

Иммунологическое обследование является неотъемлемым компонентом диагностического процесса в ревматологии. Избранные для каждого конкретного пациента методы иммунодиагностики должны быть адекватными, а качество их выполнения безупречным. Только при выполнении данных

условий будет обеспечена высокая диагностическая эффективность иммунологического обследования.

Лабораторные показатели. Аутоантитела.

Иммунологическая диагностика ревматоидного артрита и системных заболеваний соединительной ткани

Аутоантитела являются важнейшими лабораторными маркерами аутоиммунных ревматических заболеваний.

Антинуклеарные антитела (АНА) – группа антител к различным компонентам ядра. АНА определяют методом НИФ (называя при этом выявляемые антитела антинуклеарным фактором (АНФ)). Субстратом для реакции являются криостатные срезы печени или почек мышей (крыс) или клетки эпителиальной линии НЕР-2 (эпителиальные клетки рака гортани). При НИФ определяется титр АНФ, характер и интенсивность свечения. Для различных заболеваний характерны определенные типы свечения.

Гомогенное свечение имеют антитела к ДНК, гистонам и дезоксирибонуклеопротеинам (ДНП). Присутствие данных антител характерно для системной красной волчанки, лекарственной волчанки, но также встречается при других заболеваниях, прежде всего, аутоиммунных (например, аутоиммунном тиреоидите), у пожилых лиц, у родственников пациентов с аутоиммунными заболеваниями.

Периферическое свечение имеют антитела к двухспиральной ДНК, являющиеся маркером системной красной волчанки.

Крапчатое свечение дают антитела к экстрагируемым ядерным антигенам (антиSm, SS-A/Ro, SS-B/La, Jo-1 и др.), характерные для системных заболеваний соединительной ткани.

Особые типы свечения могут выявляться при системной склеродермии: сетчатое крапчатое (антитела к Scl-70), дискретное крапчатое (антитела к центромере), нуклеолярное (антитела к РНК-полимеразе 1, РМ/Scl и др.).

Суммарная оценка содержания антител к различным ядерным антигенам возможна с использованием ИФА для определения АНА. Метод ИФА в настоящее время рекомендуют использовать как скрининговый на наличие АНА, а при получении положительных результатов необходимо выявлять специфические антитела к конкретным антигенам с помощью НИФ, иммунодиффузии, иммуноблотинга и др.

Нормальными титрами АНФ являются <1:40 (с использованием срезов тканей лабораторных животных) и <1:60 (при использовании линии НЕР-2).

Антитела к ДНК делятся на антитела к двухспиральной или нативной ДНК (dsDNA) и к односпиральной или денатурированной ДНК (ssDNA). Для диагностики системной красной волчанки наибольшее значение имеют антитела к двухспиральной ДНК, которые определяются методами ИФА, НИФ и Farr. Наибольшее значение имеют IgG антитела к dsDNA. Антитела к двухспиральной ДНК не только подтверждают диагноз СКВ, но также отражают активность заболевания и вероятность поражения почек. Метод ИФА является скрининговым, подтверждают диагноз НИФ и метод Farr. Для НИФ при выявлении антител к двухспиральной ДНК используется простейшее класса жгутиковых *Crithidia luciliae*, содержащее митохондрию с большим количеством молекул двухспиральной ДНК. Метод Farr основан на преципитации ДНК антителами в присутствии насыщенного раствора сульфата аммония.

Нормальный уровень антител к dsDNA при использовании ИФА <10-20 МЕ/мл, НИФ - <1:10, метод Farr - <7 МЕ/мл.

Антитела к гистонам (ядерным белкам) определяются методом ИФА, радиоиммунным методом и иммуноблотингом. Чаще всего определение антител к гистонам используют для диагностики СКВ и лекарственной волчанки. Нормальное содержание антител к гистонам составляет <40 ЕД/мл.

Антитела к нуклеосомам выявляются с помощью ИФА, иммуноблотинга, радиоиммунного анализа, в LE-клеточном тесте. Определение антител к нуклеосомам используется при диагностике СКВ и лекарственной волчанки. Нормальный уровень антител к нуклеосомам равен <20 ЕД/мл.

Антитела к экстрагируемым ядерным антигенам имеют различные разновидности: антитела к Sm (Smith) антигену, антитела к U1RNP, антитела к SS-A/Ro (Robert) антигену, антитела к SS-B/La (Lane) антигену, склеродермические антитела (антицентромерные, антинуклеолярные антитела к Scl-70), миозит-специфические (антитела к аминоксилсинтетазам т-РНК (Jo-1) и др.). В качестве скрининга тестом для определения антител к экстрагируемым ядерным антигенам выявляют АНФ методом НИФ, а затем используют ИФА, иммунодиффузию, иммуноэлектрофорез или иммуноблотинг.

Нормальное содержание антител к Sm (Smith) антигену, антител к U1RNP, антител к SS-A/Ro (Robert) антигену составляет <25 ЕД/мл. Наличие у пациента антител к Sm (Smith) антигену подтверждает диагноз системной красной волчанки. Антитела к U1RNP подтверждают наличие пациента системного заболевания соединительной ткани, но позволяет конкретизировать диагноз. Определение антител к SS-A/Ro (Robert) антигену используется при диагностике болезни и синдрома Шегрена. Если антитела к SS-A/Ro (Robert) антигену выявляются при системной красной волчанке, то заболева-

ние наиболее часто сопровождается фотосенсибилизацией, синдромом Шегрена и наличием РФ. Антитела к SS-B/La (Lane) антигену коррелируют с низкой частотой поражения почек при системной красной волчанке, используются для подтверждения диагноза болезни Шегрена.

Склеродермические антитела подтверждают наличие системной склеродермии. К ним относятся антицентромерные антитела (АЦА), антитела к Scl-70 и антинуклеолярные антитела. Обычно антицентромерные антитела определяют методом НИФ с использованием культуры HEp-2, при этом наблюдается дискретный крапчатый тип свечения. Нормальное содержание антицентромерных антител составляет $<1:160$. При системной склеродермии наличие антицентромерных антител указывает на возможность развития CREST-синдрома, а также у пациентов с повышенным содержанием данных аутоантител наблюдается более редкое поражение легких. Антитела к Scl-70 направлены против основного негистонового белка – топоизомеразы I. Для определения данной разновидности антител применяют иммуноэлектрофорез и иммунодиффузию, а также ИФА и иммуноблотинг. В норме содержание антител к Scl-70 <25 ЕД/мл. Наличие антител к Scl-70 не только подтверждает диагноз системной склеродермии, но также может использоваться для прогнозирования диффузного поражения кожи и развития пневмосклероза. Антинуклеолярные антитела представляют собой гетерогенную группу антител, дающих нуклеолярный тип свечения при НИФ. Антинуклеолярные антитела могут использоваться как подтверждающий тест для диагностики системной склеродермии.

Миозит-специфические антитела характерны для воспалительных заболеваний мышц (дерматомиозит и полимиозит). Методами выявления миозит-специфических антител (Jo-1, Mi-2, PM-Scl и др.) являются иммунодиффузия, иммунопреципитация, иммуноблотинг и ИФА. Данные антитела подтверждают диагноз дерматомиозит (полимиозит). Также наличие Jo-1 антител свидетельствует об остром начале заболевания, поражении легких, лихорадкой, артритом и феноменом Рейно.

Ревматоидные факторы (РФ) – аутоантитела различных классов (IgA, IgM, IgG), против Fc-фрагмента IgG. Наибольшее клиническое значение имеют IgM РФ. Определяют РФ в реакции агглютинации, нефелометрии и ИФА. При латекс агглютинации нормальное содержание РФ составляет $<1:40$, при нефелометрии - <15 МЕ/мл, при ИФА - <20 МЕ/мл. Наличие РФ в сыворотке крови является подтверждающим маркером ревматоидного артрита. При наличии РФ в сыворотке крови ревматоидный артрит называют серопозитивным, а при его отсутствии – серонегативным. Необходимо помнить,

что ревматоидный фактор недостаточно специфичный показатель (специфичность IgM РФ составляет 80-93% при чувствительности 50-90%). Ревматоидный фактор может обнаруживаться у лиц пожилого возраста, при заболеваниях легких, при тиреоидной патологии (аутоиммунном тиреоидите), при опухолях, а также при системных заболеваниях соединительной ткани и системных васкулитах.

В настоящее время проводится большое количество исследований, направленных на изучение роли **антител к циклическим цитруллинированным пептидам (АЦЦП)** в патогенезе аутоиммунных ревматологических заболеваний и возможностей использования данных антител в качестве их диагностического критерия. Анти-ЦЦП антитела представляют собой аутоантитела, относящиеся к классу IgG и направлены против белков, содержащих цитруллин, образующийся из аргинина в ходе метаболической конверсии. Патологически высокое образование L-цитруллина из L-аргинина в аминокислотной последовательности белков может быть связано с повышением экспрессии пептидиларгининдезимираз (PADI). Существует несколько типов данного фермента: PADI 1, PADI 2, PADI 3, PADI 4, PADI 5, PADI 6. Они относятся к группе энзимов, участвующих в посттрансляционной модификации белков, в результате чего происходит изменение их активности. PADI ко-локализованы с филаггрином и участвуют в его модификации.

Метаболические превращения, происходящие при участии PADI следующие: **протеин, содержащий L-аргинин + H₂O = протеин, содержащий L-цитруллин + NH₃**. Активация PADI происходит при участии ионов кальция. Концентрации ионов кальция, необходимые для активации дезимираз, не типичны для здоровых клеток, достигаются при развитии воспалительного процесса. Установлено, что транскрипция PADI увеличивается под влиянием гипоксии.

С ревматоидным артритом больше всего ассоциирован фермент PADI 4, ген которого локализован в первой хромосоме, в локусе 1p36. Установлено, что при ревматоидном артрите PADI 4 интенсивно экспрессируется в Т-клетках, В-клетках, макрофагах, нейтрофилах, фибробластоподобных клетках и клетках эндотелия. Он регулирует транскрипцию генов путём метилирования и цитруллинирования аргинина в гистонах. Потенциальным аутоантигеном, индуцирующим выработку антител к цитруллинированным белкам, является филаггрин, образующийся из профилаггрина.

В роли аутоантигенов могут выступать разнообразные белки человеческого организма, содержащие в своем составе цитруллин. В частности, доказано, что вне- и внутриклеточная экспрессия PADI 4 наблюдается в депози-

тах фибрина в синовиальной ткани, где происходит своеобразная деструктуризация тканей и запускается апоптоз. Цитруллинированные агрегаты фибрина вступают во взаимодействие с IgA и M. У здоровых лиц, а также у пациентов с остеоартрозом не было выявлено значительного цитруллинирования белков, в частности, фибрина. Одновременное присутствие данного фермента, цитруллинированных белков и апоптотических клеток в фибриновых депозитах подтверждает, что PADI 4 обеспечивает цитруллинирование фибрина и запускает апоптоз. Взаимодействие цитруллинированного фибрина с иммуноглобулинами в синовии при ревматоидном артрите подтверждает его аутоантигенные свойства при данном заболевании.

При ревматоидном артрите в больших количествах продуцируется также фибронектин – крупный гликопротеин, взаимодействующий с интегриновыми рецепторами и факторами роста на поверхности клеток. При артритах фибронектин формирует внеклеточные агрегаты, которые специфически цитруллинируются в синовиальной ткани. Высокие уровни цитруллинированного фибронектина выявлены в плазме больных ревматоидным артритом по сравнению со здоровыми и больными СКВ. Цитруллинирование фибронектина – специфическое событие для синовии при ревматоидном артрите, а цитруллинированный фибронектин по иному взаимодействует со своими рецепторами и факторами роста, что находит отражение в патогенетических механизмах ревматоидного артрита, таких как ангиогенез и апоптоз.

Определение антител к цитруллинированному фибриногену – растворимому предшественнику фибрина проводили в сопоставлении с определением IgM ревматоидного фактора и второй генерацией анти-ЦЦП антител. Чувствительность данного метода составила 55,8%, а специфичность – 92,6%, что сопоставимо с данными показателями вышеуказанных методик. Таким образом, тест на определение антител к цитруллинированному фибриногену также чувствителен, как и определение АЦЦП, и более чувствителен, чем ревмофактор. Большинство больных с серонегативными вариантами ревматоидного артрита демонстрировали повышенные уровни АЦЦП и АЦФ антител. Уровень данных антител коррелировал с рентгенологическим прогрессированием заболевания. Данный тест считается хорошим предиктором рентгенологической прогрессии и особенно рекомендуется к применению при серонегативных вариантах ревматоидного артрита.

Хотя выявление АЦЦП антител при ревматоидном артрите является высокочувствительным, и специфичным, циклические цитруллинированные пептиды не являются физиологической мишенью для аутоантител. На данную роль может претендовать цитруллинированный виментин, который яв-

ляется естественным человеческим белком, обнаруживается в синовиальной ткани и имеет до 45 доменов, способных цитруллинироваться. Виментин является важным цитоплазматическим белком, стабилизирующим пространственную архитектуру клетки. Кроме этого, макрофаги секретируют виментин во внеклеточное пространство. Секреция виментина увеличивает секрецию провоспалительных цитокинов, в частности фактора некроза опухоли- α , и уменьшает секрецию противовоспалительного цитокина – интерлейкина 10. По чувствительности и специфичности тест на определение антител к цитруллинированному виментину превышает аналогичные показатели методики анализа анти-ЦЦП антител. Уровни антител к виментину коррелируют с активностью воспалительного процесса при ревматоидном артрите. Возможно, цитруллинированный виментин более активно стимулирует секрецию ФНО- α . Аргинин – вторая по частоте (9,2%) незаменимая аминокислота и третья (вместе с серином) из всех аминокислот в виментине.

Синтезированы различные синтетические пептиды, содержащие цитруллин для определения уровней АЦЦП.

Доказано, что уровень данных антител при ревматоидном артрите является наибольшим по сравнению с другими заболеваниями суставов. По данным разных исследователей чувствительность метода составляет 68-82%, а специфичность для ревматоидного артрита равна 96%, что превышает аналогичные показатели в отношении ревматоидного фактора (IgM РФ, так и IgA РФ). При раннем ревматоидном артрите повышенный уровень данных аутоантител наблюдается в 90% случаев, причем даже при серонегативных вариантах болезни. Ряд исследователей подчеркивают, что диагностическая эффективность АЦЦП превышает значимость определения ревматоидного фактора при ревматоидном артрите. Дальнейшие работы продемонстрировали корреляцию уровней антител с эрозивным процессом в суставах. Рекомендуют включать определение антител к цитруллинированным пептидам в набор исследований, являющийся прогностическим маркером развития суставной деструкции при раннем ревматоидном артрите. Низкое содержание АЦЦП антител выявлено при СКВ, инфекционных артритов, псориатическом артрите, остеоартрозе, фибромиалгии, синдроме Шегрена. При ювенильном ревматоидном артрите лишь около 30% больных повышены уровни антител к цитруллинированным пептидам, причем все эти пациенты имеют тяжелый эрозивный артрит.

Высказывается мнение о том, что антитела к ЦЦП и изотипы ревматоидного фактора могут обнаруживаться за несколько лет до клинически выраженного артрита, т.е. могут являться прогностическим маркером развития

заболевания. Наибольшая прогностическая ценность присуща сочетанию выявления АЦЦП и IgA РФ. Для ранних и очень ранних вариантов ревматоидного артрита предлагают использовать диагностику с оценкой на первом этапе уровня ревматоидного фактора, затем антител к цитруллинированным белкам, а затем антиРА-33. Эта схема обеспечивает высокую чувствительность и является эффективной стратегией определения пациентов с ревматоидным артритом в группу высокого риска для неблагоприятного исхода.

Установлены две генерации АЦЦП: АЦЦП 1 и АЦЦП 2. При сравнении их диагностического значения и прогностического уровня обнаружено, что при одинаковой специфичности тест на анти-ЦЦП 2 имел большую чувствительность. Оба варианта исследований позволяют выделить когорту больных ревматоидным артритом с предрасположенностью к быстрой прогрессии поражения суставов. На степень прогрессии заболевания в большей степени указывают АЦЦП 2 антитела.

Проведены исследования уровней данных антител при псориатическом артрите по сравнению с больными, имеющими изолированный кожный псориаз. Диагностически значимые уровни анти-ЦЦП антител выявлялись у 0,7% больных с кожным псориазом, в группе пациентов с псориатическим артритом уровень анти-ЦЦП антител был повышен 6,9% случаев, а у здоровых доноров – в 2 %. Данный показатель не коррелировал с рентгенологическими изменениями и недостаточностью функции суставов.

Несмотря на достаточно низкие уровни АЦЦП при псориатическом артрите он оказался выше ожидаемого, учитывая высокую специфичность данного показателя для ревматоидного артрита. Необходимо отметить, однако, что у большинства больных псориатическим артритом, продемонстрировавших высокие величины АЦЦП в течение динамического наблюдения диагноз был изменен на ревматоидный артрит, поскольку все они продемонстрировали АСР-критерии данного заболевания. Также исследователи не исключают сосуществование у ряда пациентов ревматоидного артрита и псориатического поражения кожи.

В результате дальнейшего изучения был сделан вывод о том, что уровень определяемых АЦЦП позволяет разграничить такие заболевания как ревматоидный и псориатический артрит, что особенно актуально в связи с гетерогенностью клинического течения псориатического артрита, а также развитием в ряде случаев тяжелого деструктивного артрита с прогрессирующим течением заболевания. Таким образом, аутоантитела являются важными маркерами ревматических заболеваний. Их определение все шире внедряется в повседневную клиническую практику.

Перспективными и необходимыми следует признать исследования, направленные на поиск субстратов, которые будут охарактеризованы как специфические аутоантигены, определение антител к которым позволит разрешить сложные диагностические ситуации.

Лабораторная диагностика васкулитов

Системные васкулиты представляют собой гетерогенную группу заболеваний, при которых возникает воспаление сосудистой стенки. Клинические проявления системных васкулитов разнообразны и зависят, главным образом, от типа, размера и локализации пораженных сосудов.

Системные васкулиты подразделяются на первичные и вторичные (на фоне другого аутоиммунного заболевания).

По калибру пораженных сосудов в соответствии с классификацией Chapel Hill Consensus Conference, 1994 г. васкулиты можно разделить на васкулиты крупных сосудов (гигантоклеточный темпоральный артериит или болезнь Хортона, болезнь Такаясу), васкулиты сосудов среднего калибра (узелковый полиартериит, болезнь Кавасаки), васкулиты мелких сосудов (гранулематоз Вегенера, синдром Чарга-Стросса, микроскопический полиангиит, болезнь Шенлейн-Геноха, эссенциальный криоглобулинемический васкулит, кожный лейкокластический васкулит).

В зависимости от иммунопатогенетических особенностей выделяют васкулиты гранулематозные (гранулематоз Вегенера, микроскопический полиангиит, синдром Чарга-Стросса) и иммунокомплексные. Основным лабораторным маркером гранулематозных васкулитов являются антинейтрофильные цитоплазматические антитела (АНЦА).

Выявление при гранулематозном васкулите антинейтрофильных цитоплазматических антител позволяет определить такой васкулит как АНЦА-ассоциированный. К АНЦА-ассоциированным васкулитам, как правило, относятся следующие васкулиты: гранулематоз Вегенера, микроскопический полиангиит, синдром Чарга-Стросса и быстро прогрессирующий гломерулонефрит с полулуниями. Также возможно обнаружение АНЦА при синдроме Гудпасчера (примерно у 10-15% пациентов), однако основным лабораторным маркером данного заболевания являются антитела к базальной мембране клубочков (антитела к БМК). Для диагностики иммунокомплексных васкулитов имеет значение обнаружение в сыворотке крови циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК). Большей достоверностью обладают методы, доказывающие отложение иммунных комплексов непосредственно в тканях.

При криоглобулинемическом васкулите лабораторным маркером являются криоглобулины.

Антинейтрофильные цитоплазматические антитела (АНЦА) – гетерогенная группа аутоантител, реагирующих с ферментами, содержащимися в азурофильных гранулах нейтрофилов. Наибольшее значение для продукции АНЦА имеют такие антигены как протеиназа-3, миелопероксидаза, эластаза, лактоферрин, белок ВР1, катепсин G. Протеиназа -3 относится к семейству сериновых протеиназ, находится в ауурофильных гранулах нейтрофилов. Миелопероксидаза – основной микробицидный фермент азурофильных гранул, способный генерировать кислородные радикалы. Данный фермент обладает выраженным положительным зарядом, при фиксации нейтрофилов этанолом перераспределяется и сосредотачивается вокруг долей ядра.

АНЦА делятся на **цитоплазматические** (чаще к ним относят АНЦА, реагирующие с протеиназой 3) и **перинуклеарные** (реагирующие с миелопероксидазой). При гранулематозе Вегенера частота выявления АНЦА к протеиназе 3 составляет 80-90%, при микроскопическом васкулите с одинаковой частотой (40-50%) выявляются как АНЦА к протеиназе 3, так и АНЦА к миелопероксидазе, при синдроме Чарга-Стросса чаще (70-80%) обнаруживаются АНЦА к миелопероксидазе (Bartunkova J. et al. 2003).

Основным методом определения АНЦА является метод НИФ с использованием фиксированных этанолом нейтрофилов. Цитоплазматические АНЦА дают диффузное гранулярное свечение благодаря флюоресценции гранул, расположенных в цитоплазме клеток между долями ядра лейкоцита. Перинуклеарные АНЦА дают перинуклеарное свечение (вокруг долей ядра лейкоцита). Существуют варианты атипичного свечения, которые дают так называемые хАНЦА. Эта разновидность антител используется в диагностике воспалительных заболеваний кишечника (язвенном колите, болезни Крона), аутоиммунном гепатите, первичном склерозирующем холангите, первичном билиарном циррозе. АНЦА к ВР1 встречаются при муковисцидозе, АНЦА к лактоферрину и катепсину G – при вторичном васкулите на фоне ревматоидного артрита, при воспалительных заболеваниях кишечника, к лактоферрину – при заболеваниях печени. АНЦА к эластазе наблюдаются при СКВ, при РА и при воспалительных заболеваниях кишечника.

При получении положительных результатов обследования на АНЦА методом НИФ рекомендуют использовать ИФА в качестве подтверждающего теста. Нормальное содержание АНЦА методом НИФ составляет менее 1:16, а при ИФА – 5-20 ЕД/мл. Диагностически значимым является обнаружение

АНЦА при разведении сыворотки 1:40. При обострении гранулематозных васкулитов могут выявляться титры АНЦА 1:320 и выше.

Антиэндотелиальные антитела (АЭА) – гетерогенная группа антител, направленных к антигенным детерминантам эндотелиальных клеток. АЭА обнаруживаются при системной красной волчанке и васкулитах. Основными методами выявления АЭА являются НИФ, ИФА и иммуноблотинг. Наиболее часто АЭА обнаруживаются при болезни Kawasaki, гранулематозных васкулитах, пурпуре Шенлейна-Геноха и вторичных васкулопатиях (облитерирующем тромбангиите Виноградника-Бюргера, гемолитической тромбоцитопенической пурпуре, антифосфолипидном синдроме). Широкий спектр заболеваний, при которых встречаются повышенные уровни АЭА, указывает на низкую специфичность данного лабораторного маркера. Однако данные антитела могут играть патогенетическую роль при аутоиммунных заболеваниях, а их повышенное содержание может указывать на определенные клинические варианты патологических состояний. В частности, при пурпуре Шенлейна-Геноха высокие уровни АЭА могут свидетельствовать о поражении почек. У пациентов с системной красной волчанкой АЭА коррелируют с кожными проявлениями заболевания и синдромом Рейно, а также с развитием гломерулонефрита. В то же время при иммуносупрессивной терапии у пациентов с системной красной волчанкой отмечается снижение уровней АЭА. При системной склеродермии АЭА рассматриваются как возможный виновник микроангиопатии, а также свидетельствуют о высоком риске поражения легких. Наличие АЭА при антифосфолипидном синдроме ассоциируется с акушерской патологией. АЭА часто выявляются при вторичных васкулитах и ангиопатиях, например, при диабетической микроангиопатии.

Антитела к базальной мембране клубочка (антитела к БМК) являются маркерами синдрома Гудпасчера. Эти антитела направлены против неколлагеновых участков альфа-3-цепи коллагена IV типа антигена, расположенного в почках, легких, хрусталике, мозге и др. Поскольку коллаген IV типа находится в базальных мембранах клубочков и альвеол, то высока специфичность обнаружения антител к БМК при синдроме Гудпасчера. Основным методом выявления антител к БМК является ИФА.

Циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК) являются лабораторными маркерами иммунокомплексных лейко- и лимфоцитокластических васкулитов. Иммунные комплексы чаще включают в себе и антиген и антитело (при лейкоцитокластических васкулитах), но могут состоять только из иммуноглобулинов (при криоглобулинемии, болезни Шенлейна-Геноха). Иммунокомплексный васкулит может быть связан не только с избыточным образова-

нием иммунных комплексов, но и с нарушением их выведения и снижением растворимости. В результате ЦИК откладываются в сосудистой стенке, происходит активация комплемента, гиперпродукция цитокинов и развивается лейкоцитарный инфильтрат.

Чаще всего для выявления ЦИК используется реакция осаждения с полиэтиленгликолем. Другим методом обнаружения ЦИК является реакция связывания C1q фактора комплемента. Однако данные методы не отличаются высокой точностью, в связи с чем эффективность определения уровня подвергается сомнению. Кроме того ЦИК могут выявляться у здоровых людей. По-видимому, наиболее целесообразно сочетать определение ЦИК с выявлением других более специфичных лабораторных маркеров аутоиммунных заболеваний, а также использовать определение уровня ЦИК в динамике для оценки активности иммунокомплексных заболеваний и эффективности проводимой терапии. При изучении уровня ЦИК полезно оценивать и активность комплемента. Потребление компонентов комплемента должно рассматриваться как признак активного иммунокомплексного васкулита. Отложение иммуноглобулинов в тканях возможно оценить морфологически с использованием реакции прямой иммуофлюоресценции.

Криоглобулины представляют собой ЦИК, состоящие только из иммуноглобулинов. Криоглобулины способны образовывать обратимый преципитат (конъюгат) при температуре ниже ядра человеческого тела.

Криоглобулины необходимо определять в сыворотке, а не в плазме, поскольку в плазме находится криофибриноген, коагулирующий при низких температурах, что может привести к ложноположительным результатам теста. В процессе лабораторного обследования на наличие криоглобулинов нельзя допускать охлаждения материала. Кровь должна забираться прямо в лаборатории, где будет выполняться исследование (без транспортировки), не допускается образование сгустка крови в пробирке, а центрифугирование проводят при температуре 37°C. Для обнаружения преципитата при температуре 4°C требуется не менее 48 часов, а иногда и несколько суток (обычно инкубация проводится 5 дней). После образования преципитата его необходимо нагреть до 37 градусов, при этом должно произойти исчезновение преципитата. Учет реакции проводится качественно (по наличию или отсутствию преципитата) и полуколичественно, для чего необходимо отцентрифугировать пробирку при обычной температуре и определить объем криоглобулинов иммунодиффузией. Существует более быстрый спектрофотометрический метод обнаружения криоглобулинов (Насонов Е.Л., 1988). Нормальное

содержание криоглобулинов при оценке их концентрации спектрофотометрическим методом составляет $\leq 0,016$ ЕОП.

Существует 3 типа криоглобулинемий.

Криоглобулинемия I типа характеризуется наличием в плазме моноклонального иммуноглобулина (IgM, IgA, IgG) или из моноклональных легких цепей (белок Бенс-Джонса). Чаще всего этот тип криоглобулинемий встречается при лимфо- и миелопролиферативных заболеваниях, миеломной болезни, макроглобулинемии Вальденстрема.

Криоглобулинемии II и III типа относятся к смешанным.

При II типе криоглобулинемии выявляются смешанные криоглобулины, состоящие из моноклональных (обычно РФ IgM) и поликлональных (IgG). Это так называемая смешанная (эссенциальная) криоглобулинемия. Она встречается чаще всего изолированно, может возникать при вирусных инфекциях (вирусном гепатите C), заболеваниях соединительной ткани, системных заболеваниях крови.

Криоглобулинемия III типа встречается наиболее широко. В данном случае имеются смешанные иммунные комплексы поликлональных иммуноглобулинов, в составе которых присутствует поликлональный РФ класса IgM, а также неиммуноглобулиновые компоненты (фибронектин, липопротеиды, компоненты комплемента). Встречается данный тип криоглобулинемии при системных заболеваниях соединительной ткани, аутоиммунных заболеваниях кишечника, инфекционном эндокардите, вирусных инфекциях (инфекционном мононуклеозе, цитомегаловирусной инфекции, вирусных гепатитах). Необходимо помнить о том, что у 80-90% пациентов с смешанной криоглобулинемией обнаруживается вирус гепатита C.

Антифосфолипидные антитела (АФЛ) представляют собой гетерогенное семейство аутоантител, взаимодействующие с отрицательно заряженными фосфолипидами клеточных мембран. Антифосфолипидные антитела взаимодействуют не только с фосфолипидами, но и с комплексами фосфолипидов и связывающих их плазменных белков. Большое значение во взаимодействии антифосфолипидных антител с фосфолипидами играют также белковые кофакторы данных аутоантител, например, β_2 гликопротеин I. Наличие АФЛ свидетельствует о наличии антифосфолипидного синдрома, а уровень данных антител коррелирует с риском развития тромботических осложнений при АФС. Выделяют следующие виды АФЛ: антитела к кардиолипину (АКЛ), волчаночный антикоагулянт (ВА) и антитела к β_2 гликопротеину I. Антитела к кардиолипину могут перекрестно реагировать с фосфатидилсери-

ном, антителами к тромбоцитам, антителами к окисленным липопротеидам низкой плотности и протромбином (Лапин С.В., Тотолян А.А., 2006).

У пациентов с антифосфолипидным синдромом часто обнаруживается ложно положительная реакция Вассермана при отрицательных дополнительных специфических тестах для диагностики сифилиса. Ложноположительная реакция Вассермана может встречаться также у пациентов с инфекционными заболеваниями (транзиторно-положительная реакция Вассермана) и аутоиммунными заболеваниями (включая антифосфолипидный синдром, системную красную волчанку) (постоянно положительная реакция Вассермана). Антитела к кардиолипину нарушают образование протромбинактивирующего комплекса, состоящего из V, X факторов, фосфолипидов, тромбоцитов и кальция. В качестве сывороточного кофактора, необходимого для взаимодействия антител с фосфолипидами, выступает β_2 гликопротеин I. Предполагается, что антитела к β_2 гликопротеину I играют главную роль в патологии коагуляции при антифосфолипидном синдроме.

АКЛ и ВА являются маркерами антифосфолипидного синдрома, а ВА еще используется и для прогнозирования тромботических осложнений, а также акушерской патологии. Антитела к кардиолипину в низких и средних титрах свидетельствуют о наличии системной красной волчанки, а в высоких титрах указывает на развитие вторичного антифосфолипидного синдрома. Антитела к кардиолипину могут обнаруживаться также при системных васкулитах, при болезни Крона, инфекционных заболеваниях (вирусном гепатите С, ВИЧ, стрептококковой инфекции и др.).

β_2 гликопротеин I – гликозилированный белок плазмы, обладающий антикоагулянтной активностью. Диагностическая эффективность определения антител к β_2 гликопротеину I дискутируется. С одной стороны, содержание данных антител невелико, с другой стороны, имеются методические сложности определения данной разновидности антител. Поэтому рекомендуют определять уровень антител к β_2 гликопротеину I в качестве дополняющего метода диагностики антифосфолипидного синдрома (при повышенном содержании антикардиолипиновых антител).

Волчаночный антикоагулянт определяют в коагулологических тестах. Они делятся на скрининговые (АЧТВ с фосфолипид-зависимым субстратом, каолиновое время и тест с ядом гадюки Рассела), коррекционные (тест с добавлением нормальной человеческой плазмы) и подтверждающие (с добавлением избытка фосфолипидов). Коррекционный тест заключается в том, что если результат теста не изменяется после добавления нормальной плазмы, то диагностируется антифосфолипидный синдром и исключаются врожденные

коагулопатии, связанные с дефицитом факторов свертывания крови. Подтверждающий тест с избытком фосфолипидов позволяет нейтрализовать действие ингибирующих антител и подтвердить наличие специфических антифосфолипидных антител.

Методами обнаружения АФЛ являются ИФА (АКЛ) и коагуляционные тесты (ВА). Нормальное содержание IgG АКЛ составляет 7-23 GPL, IgM АКЛ – 6-26 MPL, IgG/IgM а β ₂-ГП I – 9-11 ЕД/мл. GPL – это единицы содержания IgG антикардиолипиновых антител, MPL – единицы для оценки содержания IgM антикардиолипиновых антител. Одна единица – это связывающая активность 1 мкг/мл аффинно очищенных антикардиолипиновых антител. При интерпретации результатов тестов используют не столько абсолютные показатели содержания антител в сыворотке крови, сколько значения уровней позитивности (Erkan D. et al., 2005). Рекомендуют считать высокопозитивными уровни IgG АКЛ более 65 GPL, IgM АКЛ – более 45 MPL, умереннопозитивными уровни IgG АКЛ 30-65 GPL, IgM АКЛ – 35-45 MPL, низкопозитивными уровни IgG АКЛ 23-30 GPL, IgM АКЛ – 26-35 MPL, негативными уровни IgG АКЛ менее 23 GPL, IgM АКЛ – менее 26 MPL.

Таким образом, лабораторная диагностика системных васкулитов является достаточно сложной. Однако детализация спектра аутоантител совершенно необходима для верификации нозологических форм системных васкулитов, которые имеют особенности клинического течения, терапии и прогноза.

Лабораторная диагностика воспаления

В настоящей лекции будут рассмотрены вопросы использования скорости оседания эритроцитов (СОЭ) и С-реактивного белка для диагностики воспаления и оценки его активности.

СОЭ является наиболее широко используемым лабораторным тестом не только в ревматологии, но и в клинической практике в целом. СОЭ зависит от степени агрегации эритроцитов, на которую влияют электростатические свойства мембран эритроцитов, а также от свойств эритроцитов. Увеличению СОЭ способствуют такие состояния как воспаление, анемия, гиперхолестеринемия. Повышение СОЭ наблюдается в пожилом возрасте, при беременности, а у женщин СОЭ выше, чем у мужчин. Замедление СОЭ происходит при полицитемии, акантоцитозе, сфероцитозе, серповидноклеточной анемии, микроцитозе, лейкоцитозе, гипербилирубинемии, кахексии, застойной сердечной недостаточности.

Основным методом определения СОЭ является международный метод по Вестергрену. Верхняя граница нормального уровня СОЭ зависит от возраста и рассчитывается по формуле: для женщин $\text{СОЭ (мм/ч)} = (\text{возраст в годах} + 10) / 2$, для мужчин $\text{СОЭ (мм/ч)} = (\text{возраст в годах}) / 2$ (Miller A. et al., 1983).

СОЭ - высокочувствительный, но низкоспецифичный маркер воспаления. Оценка активности воспаления ревматических заболеваний по уровню СОЭ должна производиться с большой осторожностью. Наблюдение за уровнем СОЭ может использоваться в динамике при оценке эффективности проводимой терапии. Примером ситуации, когда уровень СОЭ является значимым для подтверждения диагноза, может служить ревматическая полимиалгия, т.к. одним из диагностических критериев данного заболевания является уровень СОЭ более 50 мм/ч.

В целом, увеличение СОЭ может быть использовано для подтверждения клинически обоснованного диагноза, но не дает оснований для диагностического поиска при отсутствии клинической картины какой-либо патологии.

Значение СОЭ может быть использовано для оценки активности ревматической патологии только в случае повышения данного показателя и отсутствия прочих причин, кроме основного заболевания, способных повлиять на его уровень.

Определение сывороточной концентрации С-реактивного белка (СРБ) в настоящее время рассматривается как наиболее чувствительный показатель воспалительного процесса, инфекции и повреждения.

С-реактивный белок впервые был найден в сыворотке крови больного, инфицированного *Streptococcus pneumoniae* в 20-х годах прошлого века. При фракционировании белков *S. pneumoniae* было обнаружено, что одна из фракций, названная фракцией С, осаждает белки сыворотки пациента. Эту фракцию С называли С-полисахаридом пневмококка, а белок крови – С-реактивным белком.

В настоящее время определение уровня СРБ в клинических исследованиях служит индикатором процессов воспаления. Его биологическая функция связана с удалением клеток, находящихся в состоянии апоптоза и некроза, и носит название опсонофагоцитоз (*opsonophagocytosis*). Обычно С-реактивный белок появляется в крови раньше, чем антитела.

Наряду с ещё 40 белками он относится к так называемой группе белков «острой фазы». В группу белков «острой фазы» входят белки свертывающей системы крови, факторы комплемента, транспортные белки, антипротеазы и

др. Основная функция данных белков состоит в осуществлении неспецифической защиты организма.

Существуют 2 основные конформационные изоформы С-реактивного белка – пентамерная и мономерная. В последнее время появились данные о том, что эти изоформы имеют различные функции. Наиболее изучена пентамерная изоформа СРБ, которая имеет молекулярную массу 105 кДа, связывается с полисахаридами и липидами клеточной стенки бактерий и способна активировать альтернативный путь активации комплемента, что приводит копсонизации и фагоцитозу бактериальных клеток. Таким образом, СРБ осуществляет неспецифическую защиту организма.

Увеличение концентрации СРБ в крови сопровождается системные воспалительные процессы различной этиологии, ревматические заболевания, онкологическую патологию, некрозы, травмы, реакции отторжения трансплантата. СРБ в настоящее время определяется как основной неспецифический тест оценки активности заболевания у больных с разнообразными воспалительными процессами. Определение СРБ при разных состояниях позволяет использовать данный критерий для классификации, определения тяжести, прогноза и активности воспалительного процесса. Необходимо учитывать, что повышение уровня СРБ без видимой причины может отражать воспалительный процесс в сосудистой стенке и является фактором риска развития атеросклеротического процесса.

По сравнению с СОЭ увеличение СРБ сыворотки крови значительно чаще свидетельствует об органической природе заболевания. Доказано, что определение СРБ является более эффективным методом оценки активности ревматических заболеваний по сравнению с определением СОЭ. Результаты многочисленных исследований свидетельствуют о необходимости использования оценки сывороточной концентрации высокочувствительного С-реактивного белка (вч-СРБ) для мониторинга кардиоваскулярного риска у больных ревматической патологией. Уровень С-реактивного белка отражает разную степень риска развития сердечно-сосудистых заболеваний, которую делят на три уровня: низкую – при концентрации С-реактивного белка менее 1 мг/л, среднюю – 1-3 мг/л и высокую – более 3 мг/л (Pearson T.A. et al. , 2003). Уровень вч СРБ от 3 до 10 мг/л связан с субклиническим («low grade») воспалением, а более 10 мг/л – с системным персистирующим («high grade») воспалением (Ridker R.M. et al. , 2003).

С-реактивный белок синтезируется в основном в печени. К синтезу данного белка способны также нейроны, клетки почек, моноциты, лимфоциты и макрофаги альвеол. Макрофаги и гладкомышечные клетки, находящиеся

ся в атеросклеротических бляшках, а также эндотелиоциты аорты также синтезируют С-реактивный белок.

На синтез СРБ активно влияют цитокины – ИЛ-6, ИЛ-1 бета и ФНО-альфа. Период полувыведения СРБ составляет 19 часов, то есть он является стабильным показателем в отличие, например, от цитокинов, уровни которых подвержены циркадным колебаниям.

Оценка содержания СРБ проводится классическими и высокочувствительными методами.

Классическими методами являются иммунодиффузия, иммунотурбидиметрия и иммунонефелометрия. При этом определяется содержание СРБ в диапазоне 5-500 мг/л.

Высокочувствительный СРБ (ВчСРБ) определяют с помощью ИФА, иммунотурбидиметрии и иммунонефелометрии. При этом определяют концентрации СРБ менее 5 мг/л. Указанный диапазон концентраций СРБ позволяет судить о его базальном уровне, который свидетельствует о степени кардиоваскулярного риска (при отсутствии воспалительного процесса и обострения хронического заболевания).

У 50% здоровых лиц уровень СРБ в сыворотке крови равен 0,8 мг/л, у 90% - 3 мг/л, а у 99% - 10 мг/л. Усредненный нормальный уровень СРБ составляет менее 5 мг/л, а концентрации более 3 мг/л свидетельствуют о высоком кардиоваскулярном риске у обследуемых лиц.

Таким образом, наиболее часто используемые лабораторные показатели для определения активности воспаления при ревматических заболеваниях (СОЭ и СРБ) не являются специфичными и не отражают в полной мере реальную картину воспалительных проявлений данной патологии.

Лабораторная диагностика спондилоартритов

СПА представляют собой группу ревматических заболеваний, характеризующихся такими общими признаками, как наследственная предрасположенность, молодой возраст, мужской пол, асимметричный олигоартрит, преимущественное поражение нижних конечностей, энтезопатии, дактилиты, воспалительная боль в спине, спондилит, спондилоартрит, сакроилеит, ассоциация с HLA-B27 антигеном, отсутствие ревматоидного фактора в сыворотке крови, экстраартикулярные изменения (увейт, аортит, патология уrogenитального тракта, кишечника и др.). Основными представителями СПА являются псориатический артрит (ПА), реактивный артрит (РеА) РеА, включая болезнь Рейтера, анкилозирующий спондилит (АС), в том числе и ювениль-

ный АС. К данной группе заболеваний относятся также энтеропатические артриты (при неспецифическом язвенном колите и болезни Крона). Обсуждается принадлежность к СпА так называемых недифференцированных СпА, к которым относят болезнь Уиппла, синдром SAPHO (synovitis, acne, pustulosis, hyperostosis, osteomyelitis), синдром SEA (Seronegative Enthesopathy and Arthropathy syndrome), изолированный дактилит и HLA B27-ассоциированный увеит/иридоциклит.

Общепризнанным фактом является генетическая предрасположенность к развитию заболеваний из группы СпА. Маркером генетической предрасположенности к заболеваниям из группы СпА является носительство HLA-B27 антигена. Частота носительства HLA-B27 при ПА составляет 20-40%, при ПА с поражением позвоночника – 50-70%, при АС частота носительства данного антигена равна 90-95%, а при РеА – 60-85% по сравнению с 6-8% в общей популяции. При ПА определенные аллели антигенов гистосовместимости ответственны также за характер течения и степень тяжести поражения суставов. Так, тяжелое течение ПА чаще бывает у пациентов – носителей HLA-B-17 и HLA-B-38,39 и/или DQw3, благоприятное течение заболевания отмечается у пациентов с HLA DR7. HLA-B-22 при ПА обладает протективным свойством. Ген HLA-B27, расположенный на коротком плече 6 хромосомы, представлен семейством 31 тесно связанных аллеля, названных субтипами, что определяет гетерогенность молекулы HLA-B27 [273, 337, 369]. При РеА доминирует носительство субтипов HLA-B*2702 и HLA-B*2705. С АС тесно ассоциированы аллели HLA-B*2702, *2703, *2704, HLA-B*2705 и *2707.

Антигены системы HLA определяются комплементзависимым лимфотоксическим тестом (метод Тerasaki) и с помощью ПЦР.

Большое значение в патогенезе СпА имеют внешнесредовые факторы, среди которых доминирующую роль играют инфекционные агенты. Триггерными факторами постэнтероколитических РеА являются иерсинии (20-30%), сальмонеллы (2-8%), шигеллы (1-2%), кампилобактер (1%). Наиболее частым возбудителем урогенитальных РеА является *Chlamidia trachomatis* (50-90%), микоплазма и уреаплазма. Интактные формы хламидий в суставах были выявлены при электронной микроскопии, ДНК хламидий обнаружена путем гибридизации *in situ*, а хламидийная мРНК идентифицирована с помощью ПЦР. Чаще присутствие хламидий обнаруживается в синовиальной ткани, чем в синовиальной жидкости. Хламидии выявляются и в клетках периферической крови, прежде всего в моноцитах. Обнаружена обратная корреляция между присутствием хламидий в суставных тканях и пролиферацией лимфоцитов в синовиальной мембране, что указывает на то, что изменения Т-клеточного

ответа происходят при условии присутствия бактериального агента. В синовиальной ткани при РеА обнаружены транскрипты для протеинов хламидий, в частности Hsp (heat shock protein) 60 и OMP (outer membrane protein)-1.

Идентификация триггерного микроорганизма имеет ключевое значение для правильного ведения пациента с реактивным артритом. Наиболее доказательно выявление триггерной инфекции культуральным методом. Косвенными признаками доказательства наличия инфекции являются иммунологические методы (определение антител к инфекционным агентам или их антигенам), а также амплификация фрагментов нуклеиновых кислот микроорганизмов (ПЦР). Для выявления хламидийной инфекции необходимо использовать как минимум два различных метода, один из которых – ПЦР. Для доказательства роли энтеробактерий в этиологии реактивного артрита необходимо выполнить посев кала и серологические реакции (определение уровня антител в сыворотке крови).

Диагностика хламидийной инфекции в Республике Беларусь должна осуществляться в соответствии с Протоколом лабораторной диагностики инфекции, вызванной *Chlamidia trachomatis* (урогенитальной хламидийной инфекции) (И. Шиманская и соавт., Минск: БелМАПО, 2009). Настоящий протокол создан на основе согласительного документа, разработанного Восточно-Европейской Ассоциацией по охране сексуального и репродуктивного здоровья (Domeika M. Et al., 2007). Далее приводим выдержки из Протокола, содержащие информацию о диагностике хламидийной инфекции.

Для лабораторной диагностики уrogenитальной хламидийной инфекции в странах Восточной Европы до настоящего времени используют следующие методы, направленные на выявление возбудителя – *C. trachomatis*:

- бактериоскопический метод с окраской мазка по Гименезу или Романовскому–Гимза;
- иммунологические методы: выявление антигенов *C. trachomatis* (прямая иммунофлюоресценция - ПИФ; реже - иммуноферментный анализ - ИФА);
- культуральный метод (выделение хламидий на клеточных линиях L-929, Mc Coy, Hela и др.).
- молекулярно-биологические методы, направленные на выявление нуклеиновых кислот *C. trachomatis*.

Широко применяются также серологические методы выявления антител к *C. trachomatis*.

Однако многие из перечисленных методов, направленных на выявление возбудителя, являются устаревшими и по своим параметрам в настоящее время не могут быть рекомендованы для установления диагноза урогенитальной хламидийной инфекции ввиду низкой чувствительности и высокой вероятности получения ложноотрицательного и ложноположительного результатов.

Выявление антител к хламидиям может свидетельствовать о ранее перенесенном заболевании и не всегда адекватно отражает активность и динамику воспалительного процесса.

Врач, осуществляющий взятие материала у лиц с подозрением на наличие урогенитальной хламидийной инфекции, должен гарантировать:

- качественное взятие материала – материал для исследования на хламидии обязательно должен содержать эпителиальные клетки; получение для исследования на хламидии только экссудата недопустимо!
- специальную маркировку материала с указанием в направлении и медицинской карте пациента его идентификационных данных, пола, возраста, вида материала и анатомической области, откуда он получен;
- избегать задержки при транспортировке материала;
- транспортировку осуществлять при адекватном температурном режиме для каждого метода.

Качество результата лабораторного исследования во многом зависит от физиологического состояния пациента на момент взятия клинического материала. Наиболее информативным может быть материал, если он получен при следующих условиях:

- материал взят при наличии клинических признаков заболевания;
- пациент не использовал местного лечения минимум в течение последних 48-72 часов;
- пациент не использовал общего лечения антибактериальными препаратами в течение 7 – 8 суток до обследования, т.к. проведение системной терапии может значительно повлиять на результат исследования и снизить его диагностическую ценность;
- у женщин при исследовании материалов из урогенитального тракта взятие образцов желательно проводить на 2-3 день менструального цикла (если заболевание не имеет явных проявлений) или в дни, когда нет кровянистых выделений (при обострении процесса);
- взятие образцов из уретры у мужчин и женщин необходимо проводить при условии задержки мочеиспускания не менее 2 часов;

- при обследовании пациента необходимо брать несколько клинических образцов для различных лабораторных исследований.

Существуют некоторые особенности взятия и транспортировки материала для диагностики молекулярно-биологическими методами, основанными на амплификации нуклеиновых кислот (МАНК), для исследования методом прямой иммунофлюоресценции, для культурального исследования (см. протокол).

Культуральная диагностика

Принцип культурального метода основан на выделении *C. trachomatis* из биологического материала больных после заражения этим материалом чувствительных живых клеток тканевых культур (клеток линий L-929, McCoу, Hela и др.).

До начала 1980-х годов культуральный метод был основным методом, диагноза хламидийной инфекции. Считалось, что этот метод имеет 100% специфичность, так как результат был очевидным при выявлении в клетках характерных для *C. trachomatis* включений. Таким образом, изначально это был «золотой стандарт», с которым сравнивали новые методы диагностики хламидийной инфекции, не связанные с выявлением жизнеспособного микроорганизма. Выделение хламидий методом культуры клеток сейчас редко используется для диагностики в Северной Америке и Западной Европе, и не рекомендовано для рутинной диагностики в странах Восточной Европы. Однако сохранение опыта работы с культуральным методом чрезвычайно важно. Метод рекомендован для работы в референс- лабораториях.

Чувствительность культурального метода диагностики, по данным разных авторов, колеблется в пределах 40 – 70%. При этом специфичность метода остается 100%.

Оценка результатов. Результаты культурального исследования должны быть получены через 2-3 дня (48 – 72 часа). Результат считается положительным, если обнаруживается хотя бы одно хламидийное внутрицитоплазматическое включение и нет причин подозревать контаминацию другим положительным образцом. Если такое подозрение есть, исследование необходимо повторить, используя оставшийся клинический материал, кроме того, в этом случае желательно еще использовать другой альтернативный диагностический метод.

Форма заключения лабораторного исследования на основании результатов культурального метода выделения хламидий:

Chlamydia trachomatis выделены.

Chlamydia trachomatis не выделены.

Методы выявления антигенов

Антиген *C. trachomatis* в клиническом материале определяется либо прямой микроскопией с использованием метода прямой иммунофлюоресценции (ПИФ), либо опосредовано, методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Прямая иммунофлюоресценция (ПИФ)

Принцип метода заключается в выявлении антигенов хламидий в соскобных препаратах урогенитального тракта больных урогенитальной хламидийной инфекцией путем обработки препаратов мечеными флюоресцеином моноклональными антителами к родоспецифическим и видоспецифическим антигенам хламидий. Исследование препаратов осуществляют с использованием люминесцентного микроскопа.

Чувствительность и специфичность. Чувствительность метода составляет 55-76%, специфичность - около 98%.

Достоинства и недостатки метода Метод ПИФ отличается быстротой и прост в исполнении, но все же недостаточно чувствителен. К положительным качествам метода люминесцирующих антител относится высокая специфичность.

К числу *недостатков метода* относятся: субъективизм оценки, необходимость присутствия квалифицированного исследователя, осуществляющего исследование препаратов, невозможность автоматизации процесса. Главный недостаток метода – его низкая чувствительность при малых количествах элементарных телец в исследуемом материале. В этих случаях при использовании ПИФ возрастает количество ложноотрицательных результатов.

Оценка результатов качества взятия клинического материала и результатов при постановке метода ПИФ

Для оценки качества взятия материала просматривают не менее 10 полей зрения, используя увеличение люминесцентного микроскопа $\times 400$. В одном поле зрения микроскопа должно быть более 5 клеток цилиндрического эпителия. Критерии, используемые для оценки, включают размер элементарных телец – 200-300 нм, их яблочно-зеленый цвет и правильную округлую форму. Если в препарате содержится достаточное количество эпителиальных клеток и видны специфические флюоресцирующие элементарные тельца (более 5 элементарных телец в препарате), результат считается положительным.

Форма заключения лабораторного исследования на основании результатов метода ПИФ:

- Антиген, специфичный для *Chlamydia trachomatis*, выявлен.
- Антиген, специфичный для *Chlamydia trachomatis*, не выявлен

Иммуноферментный анализ для определения антигена (ИФА-АГ)

Метод основан на выявлении в клиническом материале антигенов хламидий путем проведения ИФА с использованием моноклональных антихламидийных антител установленной специфичности. Существует ряд доступных коммерческих тест-систем для ИФА. Методы тестирования варьируют от прямого обнаружения антигена до захвата антигена с использованием или без использования ферментной амплификации с целью увеличения чувствительности метода.

Чувствительность и специфичность метода колеблется от 20 до 85% и зависит от вида тест-системы. Чувствительность ИФА близка методу ПИФ, однако ниже, чем у методов, основанных на амплификации нуклеиновых кислот возбудителя.

Достоинства и недостатки метода Иммуноферментный анализ может быть автоматизирован, что позволяет обрабатывать большое количество образцов, отличается относительно невысокой стоимостью. **Недостатки:** ИФА основан на определении липополисахарида (ЛПС) хламидий, который, как известно, перекрестно реагирует с ЛПС других микроорганизмов, что может приводить к ложноположительным результатам; метод может применяться только для материала, полученного инвазивным способом (соскоб цервикального канала шейки матки, уретры).

Оценка результатов. Визуально положительные пробы приобретают цветное окрашивание; интенсивность окраски прямо пропорциональна количеству антигена хламидий. Результат исследования определяют с помощью специальных ридеров, позволяющих определять оптическую плотность образца при определенной длине волны (обычно – при 492 нм). Образцы, дающие значения оптической плотности выше или равные значениям отсекающего поглощения (cut-off), считаются положительными.

Форма заключения лабораторного исследования на основании результатов метода ИФА:

- Антиген, специфичный для *Chlamydia trachomatis*, выявлен.
- Антиген, специфичный для *Chlamydia trachomatis*, не выявлен

Методы выявления антител к *C. trachomatis*

Методы серологической диагностики хламидиоза, направленные на выявление антител к хламидиям, основаны на определении специфических

антител в сыворотке крови, а также в других биологических жидкостях и секретах больных урогенитальной хламидийной инфекцией или имеющих хламидиоз в анамнезе. Для серодиагностики в настоящее время наиболее часто используют иммуноферментный анализ (ИФА на наличие антител).

Однако выявление антител к хламидиям связано с рядом проблем. Воспроизводимость методов, таких как микроиммунофлюоресцентный тест, низка и нет никаких согласованных стандартов. У некоторых людей иммунный ответ на урогенитальную хламидийную инфекцию может быть отсрочен или даже отсутствовать после перенесенной хламидийной инфекции. В случаях, где ответ есть, антитела часто сохраняются в течение длительного времени после выздоровления. По этим причинам, несмотря на ряд очевидных достоинств иммунологических методов для выявления антител к возбудителю урогенитального хламидиоза (относительная дешевизна и простота постановки, возможность автоматизации), серологическое исследование для диагностики отдельных случаев урогенитальной хламидийной инфекции **не рекомендуется**. Диагноз должен быть основан на прямом выявлении этиологического агента. Определение антител к хламидиям может быть использовано в эпидемиологических исследованиях как совокупный показатель контакта исследуемой популяции с возбудителем.

Быстрые тесты у постели больного

Одним из актуальных направлений научно-технического прогресса в лабораторной практике является миниатюризация аналитических технологий, что в ряде случаев сопровождается радикальным изменением привычного формата исследования. Новой диагностической технологией является иммунохроматографический анализ, который иногда называют простым быстрым тестом.

В основу методов экспресс-диагностики хламидийной инфекции положены иммунохроматография и ферментспецифическая реакция. Метод позволяет выявлять в исследуемом материале антигены хламидий. В большинстве разработанных наборов применяются моно-или поликлональные антитела к антигену хламидий в том же качественном составе, что и в наборах реагентов для иммуноферментного анализа. Быстрые иммунохроматографические тесты, такие как Unipath Clearview и другие можно использовать у постели больного (Bed Side), при скрининговых исследованиях.

Чувствительность и специфичность. Тесты у постели больного не обладают достаточной чувствительностью и специфичностью по сравнению с методами амплификации нуклеиновых кислот, хотя приемлемая чувствительность была доказана для *Chlamydia Rapid Test*.

Достоинства и недостатки метода. К числу достоинств данных методов относится простота и быстрота процедуры исследования, отсутствие потребности в специальном оборудовании, когда возможность проведения других методов диагностики отсутствует. Недостаток: широкое применение тестов ограничивается ввиду недостаточно высокой чувствительности и специфичности по сравнению с методами амплификации нуклеиновых кислот.

Оценка результатов Накопление в зоне учета результатов реакции иммунных комплексов, содержащих метки, приводит к образованию окрашенной полосы (розового цвета различной интенсивности), учитываемой визуально. При отсутствии антигенов хламидий в исследуемом образце окрашенной полосы не формируется. Правильность прохождения реакции проверяют по появлению цветной полосы в месте расположения контроля. Если окраска в этой зоне контроля не появляется, результат расценивают как «неопределенный», исследование повторяют с новой пробой клинического материала.

Форма заключения результатов быстрых тестов у постели больного:

- Антиген, специфичный для *Chlamydia trachomatis*, выявлен.
- Антиген, специфичный для *Chlamydia trachomatis*, не выявлен.

Молекулярно-биологические методы диагностики

Методы выявления нуклеиновых кислот можно разделить на две группы: связанные и не связанные с амплификацией нуклеиновых кислот.

Методы, не связанные с амплификацией нуклеиновых кислот

К основным методам, не связанным с амплификацией нуклеиновых кислот, относятся различные варианты методов, основанных на гибридизации нуклеиновых кислот-мишеней и комплементарных зондов, содержащих радиоактивные или другие метки. Лучшим примером такого метода является тест PACE® 2 CT (Gen-Probe, Inc. San Diego, CA), одобренный FDA 1988 году. Тест основан на гибридизации ДНК-зонда со специфическим участком 16S рибосомальной РНК *C. trachomatis*. В связи с относительно низкой чувствительностью указанный метод постепенно вытесняется амплификационными методами.

Чувствительность и специфичность: чувствительность – 70-85%, специфичность приближается к 100%.

Форма заключения:

- нуклеиновая кислота, характерная для *C.trachomatis*, обнаружена
- нуклеиновая кислота, характерная для *C.trachomatis*, не обнаружена

Методы, основанные на амплификации нуклеиновых кислот

Разработка метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) явилась поворотным моментом в развитии молекулярной диагностики. Хотя этот метод амплификации нуклеиновых кислот и остается наиболее распространенным, в настоящее время предложены и другие способы амплификации. Все амплификационные методы можно разделить на три группы: основанные на амплификации сигнала, мишени и зонда.

Классическая ПЦР

Принцип метода: Амплификация ДНК-мишени осуществляется в ходе повторяющихся циклов, каждый из которых включает:

- денатурацию (образование одноцепочечных молекул) ДНК-мишени при температуре более 90⁰С;
- отжиг на каждой одноцепочечной молекуле ДНК комплементарного олигонуклеотидного праймера при понижении температуры до 55⁰С – 65⁰С.
- достройка (синтез) двухцепочечной молекулы ДНК с каждого праймера в результате энзиматической активности термостабильной ДНК-полимеразы при использовании содержащихся в реакционной смеси дезоксинуклеозидтрифосфатов при температуре 72⁰С.

Метод ПЦР в его классическом варианте первоначально использовался для детекции ДНК *C. trachomatis* с помощью тест-систем, сконструированных в каждой лаборатории самостоятельно (домашнее изготовление). К настоящему времени такие тест-системы вытесняются коммерческими тест-системами. В большинстве тест-систем мишенью является криптическая плаزمиды или 23S рРНК *C. trachomatis*.

Тест-системы, основанные на принципе классической ПЦР, являются наименее удобными в повседневной работе (особенно при ручном исполнении), но отличаются относительно низкой стоимостью.

Для повышения чувствительности и специфичности классической ПЦР был разработан ее вариант получивший название **гнездой ПЦР**. При этом используют две пары праймеров. С практической точки зрения, весьма перспективной является **мультиплексная ПЦР**. При этом варианте в одной и той же пробирке находятся несколько пар праймеров, специфичных для различных мишеней, что позволяет проводить детекцию нескольких мишеней одновременно.

ПЦР в реальном времени (real-time PCR)

ПЦР в реальном времени может быть использована для определения количественного содержания ДНК-мишени в биологическом образце. Целе-

сообразность количественной детекции *C. trachomatis* при урогенитальной хламидийной инфекции в настоящее время не определена, что, однако, не исключает такой возможности в будущем.

Для проведения ПЦР в реальном времени необходимы специальные термоциклеры с прецизионной оптикой, позволяющие мониторировать интенсивность флюоресценции в реакционной смеси. Современные термоциклеры для ПЦР в реальном времени оснащены каналами для детекции флюоресценции в нескольких диапазонах длин волн (до 5 – 6), что позволяет разрабатывать мультиплексные форматы реакции.

Тест-системы для детекции *C. trachomatis* методом ПЦР в реальном времени, а также мультиплексные тест-системы для детекции возбудителей ИППП (включая *C. trachomatis*) разработаны и выпускаются некоторыми российскими производителями.

Каждому специалисту-ревматологу, курирующему пациентов с реактивным артритом, ассоциированным с урогенитальной инфекцией, необходимо владеть информацией о правилах идентификации триггерных агентов и контролировать качество проведения обследования.

Существуют следующие рекомендации по выполнению лабораторных исследований у пациентов с подозрением на реактивный артрит: в случае предшествующего клинически выраженного поражения урогенитальной системы на хламидии обязательно исследовать соскоб из шейки матки или утреннюю мочу методами иммунофлюоресценции или ПЦР. В качестве дополнительных (факультативных) методов рекомендуется использовать серологические методы, определение HLA B27, а при наличии синовита – ПЦР на хламидии в синовиальной жидкости. Проведение серологической диагностики на наличие антител к иерсиниям и сальмонеллам нецелесообразно. При отсутствии у пациента предшествующей клинически выраженной урогенитальной инфекции показано исследование на хламидии соскобов из уретры или утренней мочи с одновременной оценкой уровня антител к хламидиям (повышение уровня IgG+IgM или IgA). Параллельно рекомендуется провести серологическую диагностику на наличие антител к иерсиниям и сальмонеллам. При клинически выраженной кишечной инфекции для подтверждения триггерной инфекции достаточно серологической диагностики с определением уровня IgG+IgM или IgA.

Как и при других ревматических заболеваниях, при СпА постоянно ведется поиск биологических маркеров активности воспаления и тяжести патологического процесса, по уровню которых можно прогнозировать развитие и исход заболеваний.

Основными биомаркерами ПА, РеА и АС являются разнообразные матриксные металлопротеиназы, их тканевые ингибиторы, цитокины и продукты катаболизма хряща.

Матриксные металлопротеиназы (matrix metalloproteases - MMP) представляют собой внеклеточные цинк-зависимые эндопептидазы, участвующие в пролиферации, миграции и дифференцировке клеток, ремоделировании тканей, апоптозе, ангиогенезе, активации хемокинов. MMP, особенно MMP-3 (стромелизин 1) активно экспрессируются в синовиальной жидкости и в сыворотке крови при СпА.

Наблюдается связь между сывороточными концентрациями MMP-3 и величиной индекса BASDAI, а также значениями СОЭ и С-реактивного белка. Определение уровня MMP-3 в сыворотке крови может использоваться для оценки активности АС (чувствительность метода 69,2%, специфичность – 68,8%). Авторы считают, что MMP-3 является более чувствительным маркером активности АС, чем СОЭ и С-реактивный белок.

Выделенные из синовиальной мембраны MMP3, являются чувствительными и специфичными биомаркерами периферического артрита при АС. В синовиальной жидкости обнаружено повышенное содержание MMP-3, степень экспрессии которой коррелирует с активностью воспалительного процесса.

При ПА в синовиальной оболочке обнаружены в большом количестве матриксные металлопротеиназы, а уровень сывороточной MMP-3 является надежным биомаркером степени тяжести патологического процесса, в то время как MMP-1 тесно коррелирует с маркерами деградации коллагена.

Поскольку гиперваскулярность является специфической особенностью синовиальной оболочки при СпА, ведется поиск биомаркеров неоангиогенеза, на роль которых претендуют, прежде всего, сосудистый эндотелиальный фактор роста (vascular endothelial growth factor (VEGF)) и молекулы адгезии. При связывании с рецепторами VEGF стимулирует рост и пролиферацию эндотелиальных клеток сосуда. VEGF способствует ангиогенезу и выживанию незрелых кровеносных сосудов (сосудистая поддержка), стимулирует проницаемость мелких кровеносных сосудов. Помимо ангиогенеза, VEGF способствует формированию лимфатических сосудов, стимулирует хемотаксис моноцитов, подавляет образование дендритных клеток.

У пациентов с активным АС выявлена повышенная экспрессия VEGF в ткани крестцово-подвздошных суставов, обнаружена зависимость уровня экспрессии VEGF и процессов остеонеогенеза при АС. Отмечена связь сывороточной концентрации VEGF и величины индекса BASDAI, уровня СОЭ и

С-реактивного белка у пациентов с АС. Результаты исследования указывают на роль VEGF в патогенезе АС и позволяют рассматривать VEGF как маркер активности заболевания.

Маркером активности АС может служить и сывороточный амилоид А, повышенные концентрации которого обнаружены у пациентов с АС по сравнению со здоровыми лицами. Отмечена связь уровня сывороточного амилоида А и величины индекса BASDAI, значений СОЭ и С-реактивного белка.

Таким образом, при СпА существуют разнообразные биомаркеры активности и тяжести заболевания. Однако среди них до настоящего времени нельзя назвать те, которые были бы специфичны для данного заболевания.

Большое значение в иммунопатогенезе СпА имеют и механизмы гуморального иммунитета, в частности продукция иммуноглобулинов и антител. При СпА изучается содержание антител к широкому спектру антигенов. В роли аутоантигенов при СпА выступают некоторые компоненты протеогликанов, входящих в матрикс соединительной ткани. При ПА обнаружено повышенное содержание антител к декорину и корреляция между уровнями указанных антител и клинико-лабораторными признаками заболевания. Наибольшее значение в патогенезе АС имеют протеогликаны агрекан и версикан. Спондилитогенные эпитопы обеих молекул локализованы в гомологичных N-концевых G1 глобулярных доменах.

В эксперименте на крысах при введении G1 домена агрекана у лабораторных животных развивается спондилит и эрозивный артрит. Синовиальные CD4⁺ Т-лимфоциты у пациентов с АС участвуют в антигенспецифическом ответе на G1 домен агрекана, в ходе которого наблюдается увеличение синтеза ФНО-α и ИФН-γ CD4⁺ Т-лимфоцитами. Идентифицированы иммунодоминантные эпитопы G1 компонента агрекана, против которых при АС развивается клеточный иммунный ответ.

Получены данные о наличии при СпА IgA, связывающихся с альфа 1 антитрипсином, а также антиперинуклеарных антител. При ПА антиперинуклеарные антитела выявлялись у 7,9% пациентов, что превышает уровни у доноров крови и пациентов с кожным псориазом. Однако при РА содержание антиперинуклеарных антител было значительно выше.

Примерно у 14% пациентов с ПА выявлены антинуклеарные аутоантитела, у 3% - антитела к двухспиральной ДНК, у 1% - антитела к рибонуклеопротеинам.

При СпА выявлены повышенные уровни IgA антител против коллагена 1, 2, 3 и 4 типа. Установлено преобладание IgG и IgA антител к коллагену 2 типа и IgA антител к коллагену 4 типа, что позволило предположить, что при

АС развивается иммунный ответ к коллагену 2 и 4 типа, который участвует в развитии локального воспалительного процесса.

При ПА отмечено повышение уровней IgA антител к цитокератину 18 (СК-18) и эпидермальному кератину по сравнению с другими СпА. Среди пациентов с наибольшими уровнями данных антител были лица с периферическим поражением суставов. Повышенный уровень СК-18 отражает взаимодействие внутриклеточных цитокератиновых антигенов с иммунной системой вследствие цитолиза.

При АС определено повышенное содержание антифосфолипидных антител, в частности АКЛ класса G, однако не получено данных об ассоциации этого показателя с клиническими проявлениями антифосфолипидного синдрома.

Со времени выделения АС в самостоятельную нозологическую форму изучается связь данного заболевания с воспалительным процессом в кишечнике. При исследовании серологических маркеров воспалительных заболеваний кишечника - антисахаромицетных антител (ASCA) у пациентов с АС установлено повышение уровня ASCA IgA антител. Выявлена связь уровня ASCA IgA с величинами СОЭ и С-реактивного белка, однако не установлена зависимость между содержанием ASCA IgA и наличием морфологических признаков воспалительного процесса в кишечнике. ASCA антитела предлагается использовать в качестве специфического сывороточного маркера СпА.

Проводятся исследования уровней АЦЦП и при СпА. Диагностически значимые уровни АЦЦП выявлялись у 0,7% пациентов с кожным псориазом, в группе пациентов с ПА уровень АЦЦП был повышен в 6,9% случаев, а у здоровых лиц – в 2%.

Несмотря на достаточно низкие уровни АЦЦП при ПА он оказался выше ожидаемого, учитывая высокую специфичность данного показателя для РА. Необходимо отметить, однако, что у большинства пациентов с ПА, продемонстрировавших высокие величины АЦЦП в течение динамического наблюдения диагноз был изменен на РА, поскольку все они продемонстрировали АСР-критерии данного заболевания. Также исследователи не исключают сосуществование у ряда пациентов РА и ПА.

В результате дальнейшего изучения был сделан вывод о том, что уровень определяемых АЦЦП позволяет разграничить такие заболевания как РА и ПА, что особенно актуально в связи с гетерогенностью клинического течения ПА, а также развитием в ряде случаев тяжелого деструктивного артрита с прогрессирующим течением заболевания.

В ходе дальнейших исследований было установлено, что 13% пациентов с ПА имеют повышенное содержание АЦЦП. Однако у этих пациентов не были выявлены АСР критерии РА. Авторы высказали предположение, что существует разновидность ПА, при которой имеются повышенные уровни АЦЦП, однако за подобными пациентами необходимо устанавливать динамическое наблюдение.

Таким образом, до настоящего времени нельзя назвать те антитела, которые были бы строго специфичны для СПА и могли бы стать определяющими иммунологическим маркерами ПА, АС и РеА. Антитела, обладающие доказанной специфичностью в отношении РА (в частности АЦЦП) могут служить критериями исключения для СПА.

Литература

1. Лапин, С.В. Иммунологическая лабораторная диагностика ревматических заболеваний / С.В. Лапин, А.А. Тотолян. – Санкт-Петербург: Человек, 2006. – 128 с.
2. Guidelines for immunologic laboratory testing in the rheumatic diseases: an introduction. American college of rheumatology ad hoc committee on immunologic testing guidelines / A.F. Kavanaugh [et al.] // Arthritis Rheum. – 2002. – Vol. 47. – P. 429–433.

*Авторы обращают внимание читателей, что в 2012 году опубликованы **НАЦИОНАЛЬНЫЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ РЕВМАТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**. Авторы: Е.Н. Александрова и А.А. Новиков.*

С рекомендациями можно ознакомиться на сайте Института Ревматологии РАМН www.rheumatolog.ru

Учебное издание

Кундер Елена Владимировна
Тябут Тамара Дмитриевна
Буглова Анна Евгеньевна,
Пристром Андрей Марьянович
Руцкая Татьяна Александровна
Рачок Светлана Михайловна
Казаков Сергей Алексеевич
Михно Мария Михайловна
Пырочкин Александр Владимирович
Башлакова Надежда Анатольевна

**ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА
РЕВМАТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

Учебно-методическое пособие

Ответственная за выпуск Е.В. Кундер

Подписано в печать 11.12. 2013. Формат 60х84/16. Бумага Double A premium

Печать ризография. Гарнитура «Times New Roman»

Печ.л. 3,44. Уч. – изд. л. 2,57 Тираж 100 экз. Заказ 306

Издатель и полиграфическое исполнение –

Белорусская медицинская академия последипломного образования.

ЛВ № 23 от 27.01.2004. 220013, г. Минск, ул. П. Бровки, 3.

