

Добавляет
ценность диагнозу



ЭКСПЕРТ В ЛАБОРАТОРНОЙ
ДИАГНОСТИКЕ

Лабораторная диагностика ревматических заболеваний: правильное использование разных методов и возможные ошибки

По материалам научно-практической конференции
«Обоснование и направления инновационной медицины в ревматологии» (24-25 марта, г. Киев)

Лабораторные методы исследования играют важную роль в скрининге, диагностике и мониторинге заболеваний во всех сферах медицины. На каждом из этих этапов клиницист должен правильно выбирать лабораторные исследования и уметь их анализировать.

О роли лабораторной диагностики в ревматологии с точки зрения врача-клинициста рассказал доктор медицинских наук, профессор Андрей Михайлович Гнилорыбов (ГУ «Институт неопластической и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака НАМН Украины»).



— Согласно данным литературы лабораторные погрешности в значительной степени влияют на решение врачей и в 6-12% случаев приводят к неоправданному клиническим действиям (J.W. Ross, D.J. Boone, P.A. Nutting, M. Plebani, P. Corrado). Для ревматологии данная проблема особенно актуальна, поскольку результаты лабораторных исследований в этой области не дают окончательных ответов в отношении диагноза.

Для того, чтобы получить одно из подтверждений в пользу наличия или отсутствия заболевания, необходимо пройти определенный алгоритм, и крайне важно, чтобы клиницист хорошо понимал каждый шаг этого алгоритма, начиная с момента сравнения результатов тестов с референсными значениями исследуемых параметров.

Профессор А.М. Гнилорыбов отметил, что при сравнении результатов лабораторных исследований с референсными интервалами (нормой) следует помнить об их относительной значимости для клинициста. Показатели, выходящие за пределы нормы, не всегда свидетельствуют о наличии патологии — они лишь являются существенным прогностическим признаком, указывающим на возможность патологического процесса. С другой стороны, отсутствие отклонений в результатах теста от референсных значений — не повод для того, чтобы отказаться от диагноза при наличии серьезных подозрений и характерных симптомов. В связи с этим в лабораторной диагностике все большее значение приобретает подход, когда наиболее адекватными для каждого конкретного пациента референсными величинами считаются стабильные результаты его лабораторных исследований, полученные на протяжении нескольких лет.

В ходе доклада значительное внимание было уделено методам, которые применяются в скрининге и диагностике некоторых системных ревматических заболеваний.

В ревматологии важную роль в диагностическом поиске играет определение антинуклеарных аутоантител (АНА), образующихся к различным компонентам клеточного ядра при различных аутоиммунных заболеваниях. В широком практическом смысле под АНА понимают все антитела к любым аутоантигенам в клетке (как ядерным, так и цитоплазматическим). Всего на сегодня установлено более 500 аутоантигенов, но их клиническое значение зачастую неясно. Следует помнить, что только 10% из них (около 50) имеют четкие клинические ассоциации.

Значительный прогресс в использовании АНА для скрининга и диагностики аутоиммунных заболеваний в клинической практике произошел с 1987 г., когда появились стандартизованные тесты для их выявления. АНА встречаются практически в 100% случаев системной красной волчанки (СКВ), лекарственной волчанки, у большинства пациентов с прогрессирующим системным склерозом, синдромом Шегрена. Несколько реже АНА определяются при дерматомиозите и полимиозите. Соответственно, АНА имеют разное значение в диагностике различных ревматических заболеваний (табл. 1).

Метод непрямой иммунофлуоресценции (НИФ)

НИФ — один из методов для определения АНА, который сегодня наиболее активно используется клиницистами. АНА в данном методе обнаруживают благодаря их связыванию с внутриклеточными антигенами перевиваемой линии клеток эпителия человека (HEp-2). Ядро и цитоплазма клеток HEp-2 содержат все антигены, характерные для человеческой клетки, что позволяет выявлять в одном тесте все основные АНА. Возможность оценки одновременного связывания аутоантител со всеми антигенами, которые имеются в тканевом субстрате,

Заболевание	Частота встречаемости АНА, %
Тестирование на АНА важно для постановки диагноза	
СКВ	99-100
Склеродермия	97
Поли-/дерматомиозит	40-80
Синдром Шегрена	48-96
Тестирование необходимо для постановки диагноза	
Лекарственная волчанка	100
Смешанное заболевание соединительной ткани	100
Тест на АНА может быть полезен для оценки прогноза	
Ювенильный ревматоидный артрит	20-50
Синдром Рейно	20-60
Антифосфолипидный синдром	40-50
Тест на АНА обычно не используют	
Дискоидная волчанка	5-25
Фибромиалгия	15-25
Ревматоидный артрит	30-50

является несомненным преимуществом метода НИФ. Это делает его удобным для скринингового использования, хотя метод характеризуется определенной субъективностью. Метод НИФ на клеточной линии HEp-2 рекомендован в качестве золотого стандарта выявления АНА международными экспертами.

Иммуноферментный анализ (ИФА) позволяет быстро и надежно получить количественный результат о содержании аутоантител в сыворотке крови больного. На сегодняшний день иммуноферментный анализ является основным методом определения аутоантител в небольших клинических лабораториях. При всех неоспоримых преимуществах и высокой чувствительности ИФА имеет некоторые недостатки, в частности характеризуется низкой специфичностью. Это обусловлено применением методов очистки белка, которые способны в определенной степени изменять структуру антигенов, что приводит к значительным вариациям в специфичности наборов для ИФА. Улучшение специфичности выявления аутоантител может быть достигнуто в случае использования тест-систем, основанных на сэндвич-ИФА (antigen capture ELISA) — этот метод не требует предварительной очистки антигена, поэтому обладает высокой специфичностью и сохраняет все преимущества традиционного ИФА-метода, включая высокую чувствительность и простоту проведения анализа. Неоспоримым преимуществом ИФА является возможность его автоматизации, что уменьшает трудозатраты и снижает себестоимость обследования пациента.

Иммуноблоттинг (Western-blot) представляет собой один из наиболее чувствительных и специфичных методов анализа антигенной специфичности антител сыворотки больного. Этот метод позволяет обнаружить сывороточные антитела и описать соответствующие им антигены в зависимости от их молекулярной массы. Иммуноблоттинг не требует высокоочищенных антигенов, референтных и контрольных сывороток, и его результаты не зависят от стандартизации, чувствительности, качества субстрата, нестабильности или нерастворимости определенных антигенов. Однако специфика АНА даже при их высоких титрах удается установить не всегда, поскольку ряд антигенов до сих пор остаются неохарактеризованными. Отрицательный результат иммуноблоттинга в этом случае не исключает диагноза системного ревматического заболевания.

ImmunoCAP — иммунофлуоресцентный метод, в 300 раз более чувствительный, чем ИФА. Идея данной технологии заключается в возможности обнаружения сверхнизких концентраций антител в крови пациента. Технология выполнения метода обеспечивает высокую точность исследований, их воспроизводимость и быстроту проведения.

Необходимо понимать, что для правильной оценки результатов тестов (особенно при мониторинге активности заболевания) желательно определять не только содержание АНА «в крестах», но и их конечный титр, что позволяет уточнять наличие в сыворотке высокоаффинных аутоантител, которые более тесно связаны с активностью процесса. Пороговым считается титр АНА $\geq 1:160$. Следует помнить, что к ложноположительному повышению титра АНА может приводить лечение многими препаратами: аминосалицилатами, карбамазепином, изониазидом, метилдопой, прокаинамидом, пероральными контрацептивами, тетрациклинами, тиазидными диуретиками, сульфаниламидами и другими.

Важным моментом, который клиницисты обычно упускают из поля зрения, является оценка типа свечения АНА на клетках HEp-2. Установлено, что каждая разновидность АНА имеет конкретные клеточные мишени, в связи с чем тип свечения ядра, ядрышка и цитоплазмы клетки отражает взаимодействие АНА сыворотки больного с антиген-содержащими структурами внутри клетки. Тип свечения зависит от наличия конкретных аутоантител в сыворотке крови больного, что позволяет сделать предварительное заключение относительно разновидностей АНА, которые имеются в данной сыворотке. Таким образом, описание типа свечения АНА значительно повышает информативность теста и позволяет определить последующие тесты для уточнения их специфичности. Для практики достаточно различать 6 основных вариантов связывания аутоантител с антиген-содержащими структурами клетки (табл. 2, рис. 1-5). К сожалению, в подавляющем большинстве случаев в результатах анализов не указывается тип свечения АНА на клетках HEp-2.

Тип свечения	Заболевание
Гомогенный	СКВ, лекарственная волчанка, склеродермия
Точечный нуклеоплазменный (46-92 точки)	Склеродермия лимитированная
Ядрышковый гомогенный	Склеродермия диффузная, полимиозит, дерматомиозит
Ядрышковый гранулярный	Склеродермия диффузная
Гранулярный нуклеоплазменный	Системные заболевания соединительной ткани, склеродермия, СКВ, дискоидная волчанка, ревматоидный артрит, синдром Шегрена
Центромерный	Склеродермия

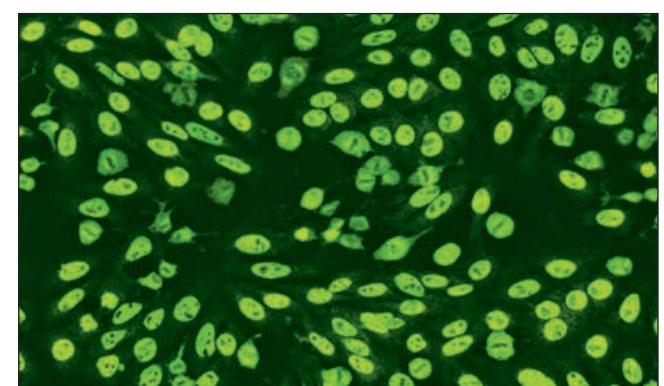


Рис. 1. Мелкогранулярный тип свечения АНА (наименее специфичный)

Здесь и далее микрофотографии предоставлены лабораторией «Новая диагностика», г. Киев).

Как уже отмечалось, в ревматологии отрицательный результат лабораторного теста не всегда может служить основанием для отказа от дальнейшего диагностического поиска. Не следует сбрасывать со счетов и возможность ложноположительных или ложноотрицательных результатов анализов и пренебрегать возможностью повторить исследование, если есть серьезные основания для этого. В ряде ситуаций, даже если АНА не выявлены, но существует подозрение на наличие ревматического заболевания, врач может направить

Продолжение на стр. 70.

Добавляет
ценность диагнозу



ЭКСПЕРТ В ЛАБОРАТОРНОЙ
ДИАГНОСТИКЕ

Лабораторная диагностика ревматических заболеваний: правильное использование разных методов и возможные ошибки

Продолжение. Начало на стр. 69.

на проведение иммуноспецифического теста (как правило, используется метод иммуноблоттинга). Например, если АНА не обнаружены, но есть клиническое (даже небольшое) подозрение на СКВ, то необходимо направить пациента на определение антител к антигенам SS-A (Ro). При сильном подозрении на СКВ и низком титре АНА следует выполнить тесты на анти-Smith (являются одним из критериев диагностики СКВ), анти-dsDNA (высокоспецифичный маркер СКВ). При отсутствии или низком титре АНА и подозрении на поли-/дерматомиозит необходимо провести тест на наличие антител к tRNA-синтазе (например, анти-Jo-1). Выполнение тестов на анти-SCL-70, анти-RNP, антицентромеры целесообразно при подозрении на склеродермию у пациентов с низкими титрами АНА. При подозрении на смешанное заболевание соединительной ткани и отсутствии АНА по результатам анализа проводят тест на анти-RNP (табл. 3).

Рекомендуемые моноспецифические тесты при титре АНА $\geq 1:160$ и определенных типах свечения АНА представлены на рисунке 6.

И еще один интересный факт: исследования последних лет, посвященные вопросу о роли обнаружения АНА или

специфических антител у внешне здоровых лиц, свидетельствуют о том, что отклонения в тестах от референсных значений не следует игнорировать даже при отсутствии клинических симптомов. Симптомы заболевания могут появиться через несколько лет после изменения лабораторных показателей, например, в исследовании M.R. Arbuskel показано, что АНА могут обнаруживаться в среднем за 3,3-9,4 года до развития СКВ. В связи с этим желателен периодический мониторинг с повторным назначением исследований.

Докладчик отметил, что ошибки при оценке результатов тестов в лабораторной диагностике могут быть обусловлены несколькими факторами:

- переоценкой возможностей иммунобиологических методов;
- ложноположительным/ложноотрицательным результатом;
- неправильным (несоответствующим клинической ситуации) выбором лабораторных тестов.

Немаловажен и выбор лаборатории, которая в первую очередь должна иметь сертификат стандарта качества (ISO 9001: 2008; 15189-2009; 22869-2009). Об уровне профессионализма

специалистов лаборатории можно судить также по некоторым деталям, например, следует обращать внимание, как заполняются бланки с результатами исследований. Отсутствие такой информации, как время забора материала, референсные значения исследуемых параметров, единицы измерения, названия метода исследования, реактива и оборудования, а также отсутствие подписи исполнителя могут указывать на то, что достоверность данных нуждается в проверке.

Таким образом, в сфере лабораторной диагностики ревматических заболеваний имеется множество нюансов, затрудняющих оценку результатов тестов клиницистами. В последние годы эта область быстро развивается, появляются новые биомаркеры, в связи с чем остро стоит вопрос о тесном сотрудничестве между практическими врачами и лабораторными экспертами. Важным является также умение наладить партнерские отношения с пациентами, которым следует разъяснять результаты исследований в доступной форме.

Актуальным для нашей страны остается и более широкое использование методов лабораторной диагностики в скрининге, диагностике и мониторинге различных заболеваний. Сегодня в Украине количество лабораторных исследований и затраты для их проведения на одного больного в год в десятки раз меньше средневропейских показателей, и это свидетельствует о том, что многие врачи не в полной мере используют возможности, связанные с этим видом диагностики.

Подготовила **Наталья Очеретяная**

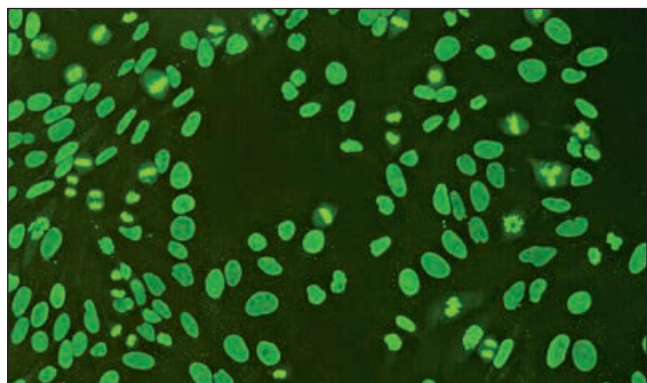


Рис. 2. Гомогенный тип свечения АНА

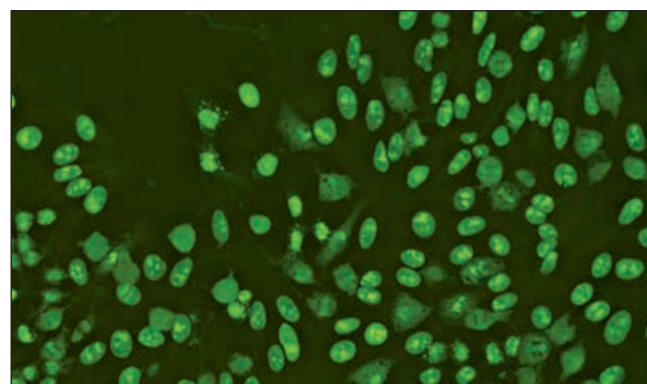


Рис. 3. Ядрышковый тип свечения АНА

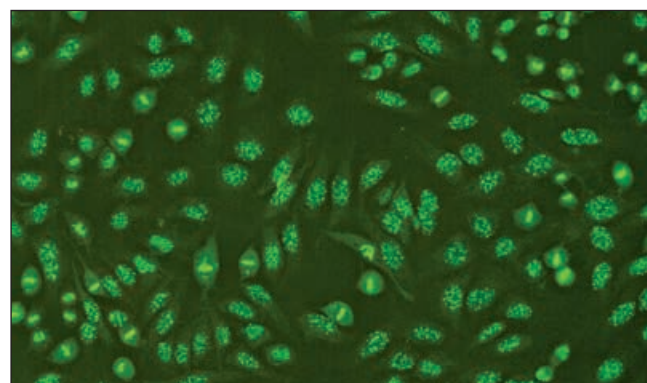


Рис. 4. Центромерный тип свечения АНА

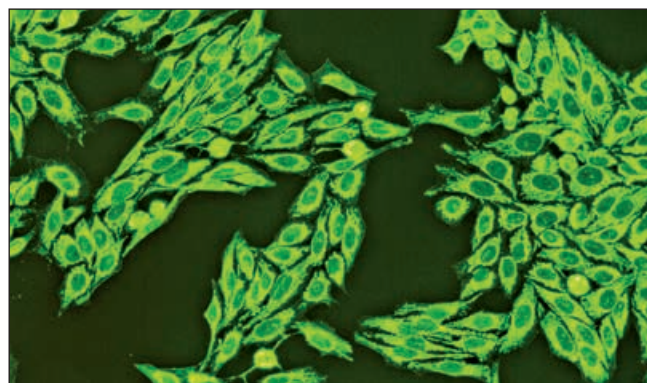


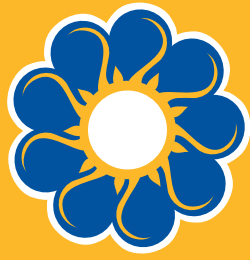
Рис. 5. Цитоплазматический тип свечения АНА

Таблица 3. Алгоритм АНА-диагностики по АНА-титру (по S.L. Peng, J. Graft, 2005)

(-) титр АНА	Низкий (+) титр АНА	Низкий (+) титр АНА	Высокий (+) титр АНА
	Низкое подозрение	Высокое подозрение	
Анти-Ro/SS-A	СКВ	Анти-dsDNA Анти-U1snRNP Анти-Sm Анти-Ro/SS-A	Кожа и/или суставы
	Лекарственная волчанка	Антигистоны	Прием лекарств
	Склеродермия	Анти-SCL70 Анти-RNP полимеразы Антицентромеры	Синдром Рейно Склеродактилия Миозит Телеангиэктазия Дисфункция пищевода Поражение легких
Анти-tRNA синтаза (н-р, анти-Jo-1)	Смешанное заболевание	Анти-U1 snRNP	
	Поли-/дерматомиозит	Анти-tRNA синтаза	
	Синдром Шегрена	Анти-Ro/SS-A Анти-La/SS-B	Сухой синдром
Антифосфолипидные антитела	АФС (первичный/вторичный)		



Рис. 6. Схема проведения анализа АНА



СІНЕВО
медична лабораторія

СПІВПРАЦЯ З «СІНЕВО» — СУЦІЛЬНИЙ ПЛЮС ДЛЯ ЛІКАРЯ

Повний спектр
досліджень
на кращому
світовому
обладнанні



Міжнародний контроль
якості досліджень
і довіра понад 20 тисяч
лікарів в Україні



72 медичні
лабораторії
у 16 країнах Європи



Інформаційна підтримка
та зручні онлайн сервіси
для лікарів і пацієнтів

0 800 50 70 30 безкоштовно зі стаціонарних телефонів по території України

044 20 500 20

www.synevo.ua

 [synevolab](https://www.facebook.com/synevolab)