

Диагностическое значение выявления аутоантител и современные автоматизированные методы их исследования

О. Ю. Ткаченко, С. В. Лапин, А. В. Мазинг, Т. В. Блинова,
А. Н. Мошникова, Д. А. Кузнецова, И. В. Холопова

ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург

РЕЗЮМЕ

Аутоантитела (ААТ) представляют собой иммуноглобулины человека, способные специфически связываться с антигенными эпитопами молекул собственного организма. Многие ААТ имеют диагностическое значение и являются серологическими маркерами, а также отражают основные механизмы потери толерантности и воспаления у пациентов с аутоиммунными заболеваниями. Метод непрямой иммунофлуоресценции (НИИФ) был первым методом, применяемым для обнаружения ААТ. В течение 1970-х и 1980-х годов произошла эволюция в качественных методах с введением иммуноблоттинга или дот-блоттинга, а также были введены количественные иммунометрические анализы (ИМА) второго поколения (радиоиммуноанализ, иммуноферментный анализ, флуороиммунологический анализ, иммунохемилюминесцентный анализ). Растущий спрос на исследование ААТ в целом способствовал развитию автоматизированного и мультиплексного тестирования. Примером является мультипараметрическая автоматическая станция Chorus trio (Cortay Group, Швейцария), объединяющая ИФА метод и реакцию связывания комплемента (РСК) на одной платформе. К преимуществам данного прибора относятся широкая панель востребованных тестов, минимальные трудозатраты сотрудников лаборатории, возможность использования анализатора для выполнения анализов в режиме «cito», выполнение РСК-тестов в автоматическом режиме, высокая точность и воспроизводимость результатов, компактный дизайн анализатора. Мультипараметрическая автоматическая станция Chorus trio была внедрена в рутинную практику нашей лаборатории для диагностики аутоиммунных заболеваний в качестве подтверждающего тестирования. Таким образом, эффективность новых технологий, возможности автоматизации и повышение скорости и качества тестирования, а также обширная информация, предоставляемая с помощью инновационных мультипараметрических систем, принесет значительные преимущества для врачей клинической лабораторной диагностики и врачей-клиницистов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: аутоантитела, иммуноферментный анализ, автоматизированные методы

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Diagnostic value of autoantibodies and novel automated methods of their detection

O. Yu. Tkachenko, S. V. Lapin, A. V. Mazing, T. V. Blinova,
A. N. Moshnikova, D. A. Kuznetsova, I. V. Kholopova

First St. Petersburg State Medical University n. a. academician I. P. Pavlov, St. Petersburg, Russia

SUMMARY

Autoantibodies (aAb) are human immunoglobulins that can specifically bind to antigenic epitopes of molecules of their own body. Most of AATs have diagnostic value and are serological markers, as well as reflect the main mechanisms of loss of tolerance and inflammation in patients with autoimmune diseases. Indirect immunofluorescence (IIF) was the first method used to detect aAb. During the 1970s and 1980s, there was an evolution in qualitative methods with the introduction of immunoblotting or dot blotting, and second generation quantitative immunometric assays (radioimmunoassay, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), fluoroimmunoassay, immunochemiluminescence assay) were suggested. The growing number of aAbs, as well as the growing request for aAb research in general, has fueled the development of automated and multiplex testing. An example is the Chorus trio multi-parameter automatic station (Italy), which combines the ELISA method and the complement fixation reaction (CFR) on one platform. The advantages of this device include a large panel of tests, minimal labor costs, the ability to use the analyzer to perform analyzes in the "cito" mode, perform CFR tests in an automatic mode, high accuracy and reproducibility of results, and a compact design of the analyzer. The Chorus trio multi-parameter automatic station has been implemented into the routine practice of our laboratory for the diagnosis of autoimmune diseases as a confirmatory test. Thus, the effectiveness of new technologies, the possibility of automation and an increase in the speed and quality of testing, as well as the extensive information provided by innovative multi-parameter systems, will bring significant benefits for clinical laboratory diagnostics and clinicians.

KEY WORDS: autoantibodies, enzyme-linked immunosorbent assay, automated methods.

CONFLICT OF INTEREST. The authors declare no conflict of interest.

Введение

Аутоантитела (ААТ) представляют собой иммуноглобулины человека, способные специфически связываться с антигенными эпитопами молекул собственного организма. Присутствие ААТ, высокоспецифичных для определенного типа клеток при органоспецифических аутоиммунных заболеваниях, таких как тиреоидит, сахарный диабет 1 типа

и первичный билиарный цирроз, свидетельствует о том, что синтез ААТ обусловлен воспалительными процессами в органах-мишенях. При системных аутоиммунных заболеваниях, таких как системная волчанка (СКВ), выработка ААТ индуцируется чрезмерным высвобождением внутриклеточных антигенов в результате апоптоза, а также

аномальными иммунными ответами В- или Т-лимфоцитов. Многие ААТ имеют диагностическое значение, а также отражают основные механизмы потери толерантности и воспаления у пациентов с аутоиммунными заболеваниями [1].

Хотя некоторые ААТ, вероятно, не обладают патогенными эффектами, прямое участие других ААТ в повреждении тканей/клеток наблюдается при многих аутоиммунных заболеваниях. К механизмам патологического воздействия ААТ относятся связывание с мембранами и последующее разрушение клеток, взаимодействие с рецепторами и последующая модификация их биологической активности, формирование иммунных комплексов в тканях (локальное отложение или циркуляция), перекрестные реакции между внутриклеточными и мембранными антигенами, перемещение внутриклеточного антигена к мембране после повреждения или активации клетки [2].

Важно отметить, что любая человеческая сыворотка содержит широкий спектр ААТ, который в норме представлен так называемыми природными или натуральными ААТ, которые играют важную роль в первичной линии защиты от инфекции, в развитии профиля распознаваемых антигенов и гомеостазе иммунной системы [3]. Выявление ААТ в низком титре без клинической значимости у здоровых людей или лиц с другими заболеваниями неаутоиммунного генеза – относительно частое явление. Также титры некоторых ААТ например, антифосфолипидные антитела (АФА), повышаются при инфекционных заболеваниях, и их синтез носит транзиторный характер. При обнаружении подобных ложноположительных результатов разработаны ряд подходов и алгоритмов для их корректной интерпретации [4].

Таким образом, ААТ, обнаруженные в образцах сыворотки крови пациентов с аутоиммунными заболеваниями, представляют собой гетерогенную смесь полиреактивных низкоаффинных природных ААТ класса IgM и монореактивных высокоаффинных патогенных ААТ классов IgG и IgA [5]. Методы, обычно используемые в лабораторной диагностике, не способны различать эти два типа ААТ, так что дифференциальная диагностика проводится на основе истории болезни пациента, симптомов и уровней (титров) ААТ в сыворотке крови. Аутоиммунные заболевания характеризуются наличием более высоких титров ААТ. Некоторые ААТ имеют важное клиническое значение в качестве ранних индикаторов заболевания и могут обнаруживаться задолго до клинических проявлений [6, 7]. Например, антитела к центромерным белкам могут выявляться задолго до постановки диагноза системной склеродермии, а антитела к Scl-70 (топоизомераза I) ассоциированы с развитием легочным фиброзом и более высоким уровнем смертности [8].

Таким образом, в качестве серологических маркеров аутоиммунных заболеваний все чаще используется спектр ААТ. Это особенно актуально сегодня, когда новые диагностические платформы (мультиплексные иммуноферментный анализ, иммуноблоттинг, хемилюминисцентный анализ) достигли более высокой чувствительности, чем

устаревшие технологии. Следовательно, появляющиеся в настоящее время новые методы исследования позволяют выявлять более широкие профили ААТ и, таким образом, меняют подходы к диагностике и терапии аутоиммунных заболеваний.

Семейства аутоантител

Так как ААТ связываются с молекулами сходной структуры или молекулами в составе одной ткани, клетки, органеллы или молекулярного комплекса, их делят на семейства (*табл. 1*). Диагноз системных заболеваний соединительной ткани (СЗСТ) основывается на клинических данных и результатах серологических исследований, среди которых ключевую роль играет исследование антител к ядерным и цитоплазматическим антигенам, так называемых антинуклеарных антител (АНА)[9]. Большинство АНА, вероятно, не играют роль в патогенезе аутоиммунных воспалительных процессов СЗСТ, но могут быть ассоциированы с поражением органов-мишеней и тяжестью заболевания. По данным специального комитета по иммунологическому тестированию Американского колледжа ревматологии, исследование АНА крайне информативно для диагностики системной красной волчанки (СКВ) и системной склеродермии (ССД), в некоторой степени информативно для диагностики первичного синдрома Шегрена (СШ) и полимиозита/дерматомиозита (ПМ/ДМ), очень важно для мониторинга или прогноза ювенильного идиопатического артрита (ЮИА) (для стратификации риска увеита), и значимо для диагностики лекарственной волчанки, смешанного заболевания соединительной ткани (СЗСТ) и аутоиммунного гепатита [10]. АНА имеют множество антигенных мишеней, включая SSA/Ro, SSB/La, центромеры, двуспиральную ДНК, Jo1, RNP, Sm, топоизомеразы, гистоны, gp210, sp100, PM-Scl, OJ. Антинейтрофильные антитела (АНЦА) представляют собой группу ААТ, которые направлены против цитоплазматических антигенов нейтрофильных гранулоцитов. Выделяют цитоплазматические АНЦА (ц-АНЦА), которые направлены против протеиназы-3 и ассоциированы с гранулематозом с полиангиитом (болезнь Вегенера), перинуклеарные АНЦА (п-АНЦА), направленные против миелопероксидазы и связанные с эозинофильным гранулематозом с полиангиитом (синдром Черджа – Стросса [11]. Нетипичные п-АНЦА часто выявляются при воспалительных заболеваниях кишечника и аутоиммунной патологии печени [12]. Антифосфолипидные антитела всегда встречаются при антифосфолипидном синдроме (АФС), который клинически проявляется рецидивирующими артериальными/венозными тромбозами и/или патологией беременности [13]. В соответствии с классификационными критериями 2006 года, стойко персистирующие средние и высокие уровни ААТ, а также положительный волчаночный антикоагулянт при повторном выявлении через 12 недель позволяют поставить диагноз АФС [14]. Антитела к циклическому цитруллинированному пептиду (АЦЦП) и модифицированному цитруллинированному виментину (АМЦВ) характеризуются очень высокой специфичностью и широко используются для диагностики ревматоидного

Таблица 1
Автоантитела и их клинические ассоциации

Семейство антител	Автоантиген	Клинические ассоциации
Антиядерные антитела	дсДНК	СКВ с почечной недостаточностью
	RNP	смешанное заболевание соединительной ткани, синдром Шарпа, 30% больных с СКВ, 10% случаев ССД
	Scl-70 (топоизомераза I)	ССД, ассоциированы с неблагоприятным течением
	Центромеры	CREST-синдром при ССД
	tРНК-синтазы: гистидил (Jo-1), треонил, аланил, изолейцил, глицил, лейцил, аспартил и др.	Миозит с «антисинтетазным синдромом» (миозит, интерстициальное заболевание легких, воспалительный артрит, феномен Рейно, руки механика)
	SRP	Миозит с тяжелым течением
	Ro60 (SS-A)/ La (SS-B), Ro52	Сухой синдром при первичном или вторичном СШ, неонатальная волчанка, блокада сердца
Антинейтрофильные антитела	Миелопероксидаза	Микроскопический полиангиит (70–90%), быстро прогрессирующий олигоиммунный гломерулонефрит с полулуниями (60%), синдром Чарга-Стросса (30–50%), синдром Гудпасчера (20–30%), редко при гранулематозе Вегенера, у больных ВЗК
	Протеиназа-3	Активный гранулематоз Вегенера (90–98%)
	Эластаза, LAMP-2, лактоферрин, белок BPI, катепсин G	ВЗК, аутоиммунные заболевания печени, аутоиммунный панкреатит, редко – системные васкулиты и др. СЗСТ, муковисцидоз, активный фокально-некротизирующий гломерулонефрит
Антитела к цитруллинированным белкам / пептидам	Циклический цитруллинированный пептид, модифицированный цитруллинированный виментин	Ревматоидный артрит, редко – псориатический артрит
Антифосфолипидные антитела	Кардиолипин Бета-2-гликопротеин	Антифосфолипидный синдром, СКВ, СЗСТ
Антимитохондриальные антитела	PDC-E2/M2, BCOADC-E2, OGDC-E2, E1a субъединица PDC, E3BP	Первичный билиарный цирроз, ССД, редко при СЗСТ
Антитела к щитовидной железе	Тиреопероксидаза	Тиреоидит Хашимото, диффузный токсический зоб (болезнь Грейвса/Базедова), микседема
	Антитела к рецептору тиреотропного гормона	Диффузный токсический зоб (болезнь Грейвса/Базедова)
Антитела островковым клеткам поджелудочной железы	Две изоформы глутамат-декарбоксилазы – GAD 65kDa и GAD 67kDa, островковый антиген 2 (IA-2)	Сахарный диабет I типа, скрытый аутоиммунный диабет взрослых (LADA), гестационный диабет у беременных, тиреоидит Хашимото, болезнь Грейвса, первичная надпочечниковая недостаточность, синдром «ригидного человека», паранеопластическая мозжечковая атаксия, эпилепсия, миастения, лимбический энцефалит, паранеопластический энцефалит и синдром Ламберта-Итона.
Антиганглиозидные антитела	GM1, GM2, GM3, GM4, GD1a, GQ1b, GD2, GD3, GT1a, GT1b, GD1b	Острая моторная аксональная невропатия, синдром Гийена-Барре
Антитела к ацетилхолиновому рецептору	Альфа-субъединица никотинового ацетилхолинового рецептора	Генерализованная форма (80–90% больных), паранеопластическая (70–80% больных), окулярная (40–50% больных) миастения
Антинейрональные антитела	NMDA, LG1, CASPR2, Hu, Ri, Yo и др.	Лимбический энцефалит, церебеллярная дегенерация, подострая сенсорная нейропатия, автономная нейропатия, паранеопластический энцефаломиелит, паранеопластическая сенсорная нейропатия, паранеопластическая мозжечковая дегенерация, паранеопластическая атаксия опсоклонус-миоклонус, синдром «ригидного человека»
Антитела к аквапорины 4	Аквапорин 4 – белок семейства аквапоринов, преобладающий в водных каналах клеток мозга	Оптический миелит, азиатский (оптикоспинальный) тип рассеянного склероза
Антитела к эндомизию	Тканевая трансглутаминаза 2 типа	Целиакия, герпетиформный дерматит (дерматит Дюринга)
Антитела к базальной мембране клубочка	Неколлагеновый участок альфа 3 цепи коллагена IV типа	Синдром Гудпасчера (пневмонит и быстро прогрессирующий гломерулонефрит), быстро прогрессирующий гломерулонефрит и системный васкулит
Антитела к десмосомам кожи	Десмоглеин-1 и десмоглеин-3	80–90% больных вульгарной пузырчаткой
Антитела к базальной мембране кожи	Гемидесмосомы, белки BP180 и BP210	70–75% больных буллезным пемфигиомом, у 30–60% больных рубцующимся пемфигиомом, приобретенный буллезный эпидермолиз и пемфигиом беременных

Примечание: СКВ – системная красная волчанка, дсДНК – двуспиральная ДНК, ССД – системная склеродермия, СЗСТ – системные заболевания соединительной ткани, ВЗК – воспалительные заболевания кишечника.

артрита (РА). Эти ААТ, как и ревматоидный фактор, могут быть идентифицированы за 10 лет до постановки диагноза, и их присутствие ассоциировано с более агрессивным течением заболевания и худшим прогнозом.

Антимитохондриальные антитела (АМА) направлены против антигенных компонентов митохондрий в различных органах и тканях человека и являются маркером первичного билиарного цирроза (ПБЦ), хронического

холестатического заболевания печени, поскольку они обнаруживаются примерно в 90–95 % случаев задолго до клинических проявлений [15]. ААТ к щитовидной железе связываются с компонентами щитовидной железы, включая тиреоидную пероксидазу (ТПО), рецептор тиреотропного гормона и тиреоглобулин. Эти ААТ ассоциированы с диффузным токсическим зобом (болезнь Грейвса) и тиреоидитом Хашимото [16, 17]. ААТ к островковым клеткам поджелудочной железы тесно связаны с развитием диабета 1 типа [18]. Появление ААТ к одному или нескольким аутоантигенам – GAD 65, IA-2 или инсулину – свидетельствует об аутоиммунном генезе уничтожения бета-клеток.

Антиганглиозидные антитела направлены против собственных ганглиозидов, включая GD3, GM1 и GQ1b, и ассоциированы с синдромом Гийена – Барре [19]. Как правило, ААТ класса IgG к ганглиозидам возникают после острых инфекций, особенно энтерита, вызванного *Campylobacter jejuni*. Кроме того, хронические аутоиммунные невропатии связаны с антителами IgM, направленными против многих гликолипидов, включая ганглиозиды. Обнаружение ААТ к нервно-мышечному никотиновому рецептору ацетилхолина (аАХР) оказалось полезным при диагностике миастении гравис (МГ). Пациенты с МГ без аАХР часто имеют антитела к другим белкам нервно-мышечного соединения, таким как мышечно-специфическая киназа, которая выявляется примерно у 70 % серонегативных пациентов с МГ [20]. Антитела к поверхностным/синаптическим рецепторам нейрональных клеток (NMDA, LG1, CASPR, AMPA, GABA и др.) вызывают дисфункцию нейронов путем прямого взаимодействия со своим антигеном-мишенью и являются причиной развития аутоиммунных энцефалитов. Энцефалит, вызванный антителами к NMDA-рецептору, является наиболее частым ААТ-опосредованным энцефалитом и второй по частоте причиной иммуно-опосредованного энцефалита после острого диссеминированного энцефаломиелимита [21]. Анти-LG1 ассоциированный энцефалит преимущественно встречается у пожилых мужчин (средний возраст 60 лет), у которых развиваются потеря памяти, спутанность сознания и судорожный синдром. Антитела против внутриклеточных нейрональных антигенов (Hu, PNMA, Ri, амфифизин) часто выявляются при паранеопластических энцефалитах и могут встречаться при мелкоклеточных новообразованиях легкого и нейробластоме, карциноме яичка и карциноме молочных желез. Антитела к Hu-антигену направлены против РНК-содержащих антигенов ядер нейронов I типа центральной и периферической нервной системы и ассоциированы с лимбическим энцефалитом. Антитела к Ri антигену направлены к ядрам нейронов II типа центральной нервной системы, и их выявление характерно для пациентов с энцефалитом ствола мозга, мозжечковой дегенерацией и нарушением мышечного тонуса (опсоклонус-миоклонус). Антитела к аквапорины 4 являются высокоспецифичным маркером оптиконеуромиелимита, клиническая специфичность составляет 90–98 %.

Антитела к эндомизию, основным антигеном которых является тканевая трансглутаминаза 2 типа, являются чувствительным и специфическим серологическим маркером целиакии (рекомендации Европейского общества педиатрической гастроэнтерологии, гепатологии и питания [ESPGHAN, 2019]) и клинические рекомендации Союза педиатров России [2016]) [22]. Антитела к эндомизию отмечаются практически у всех пациентов с атрофией ворсинок тонкого кишечника, то есть клинически значимой целиакией, а также у лиц с герпетиформным дерматитом (дерматитом Дюринга). Антитела к базальной мембране клубочка (БМК) направлены против неколлагенового участка альфа-3 цепи коллагена IV типа, антиген которого может быть обнаружен в базальной мембране почек и легких. Выявление антител к БМК является диагностическим маркером для синдрома Гудпасчера (пневмонит и быстро прогрессирующий гломерулонефрит). Основной причиной возникновения пузырчатки является наличие ААТ против основных гликопротеинов десмосом – десмоглеина-1 и десмоглеина-3. Повышение титров антител к базальной мембране кожи отмечается при буллезном пемфигоиде (в крови 70–75 % больных), рубцующемся пемфигоиде (у 30–60 % больных), приобретенном буллезном эпидермолизе (в 100 % случаев) и пемфигоиде беременных (в 25 % случаев) [23]. При пемфигоиде появляются антитела к гемидесмосомам, функция которых состоит в связывании эпителиальных клеток с внеклеточным матриксом. Основными антигенами ААТ к базальной мембране кожи являются белки BP180 и BP210. Таким образом, выявление ААТ является ключевым аспектом диагностики большинства орган-специфических аутоиммунных заболеваний и СЗСТ.

Методы детекции аутоантител

Метод непрямой иммунофлюоресценции (НРИФ) был первым методом, применяемым для обнаружения ААТ. Помимо НРИФ, к методам первого поколения, относятся другие качественные иммунохимические методы (иммунодиффузия, фиксация комплемента, пассивная агглютинация, иммуноэлектрофорез, иммунопреципитация), разработанные в 1957 году («золотой год иммунодиагностики») [24–27]. В течение 1970-х и 1980-х годов произошла эволюция в качественных методах с введением иммуноблоттинга или дот-блоттинга, а также были введены количественные иммунометрические анализы второго поколения (радиоиммуноанализ, иммуноферментный анализ, флюороиммунологический анализ, иммунохемилюминесцентный анализ). Включение измерения ААТ в диагностические критерии, а также развитие биоинженерии и разработка протеомных технологий привели к наступлению новой эры в измерении ААТ с экспоненциальным увеличением аналитической способности и соответствующим увеличением объема запросов на исследования. Эта эволюция привела к отказу от методов иммуноанализа 1-го и 2-го поколения в пользу автоматизированных методов иммуноанализа 3-го поколения (рис. 1). Далее в нашем обзоре мы рассмотрим ключевые особенности моно- и мультиплексных методов.

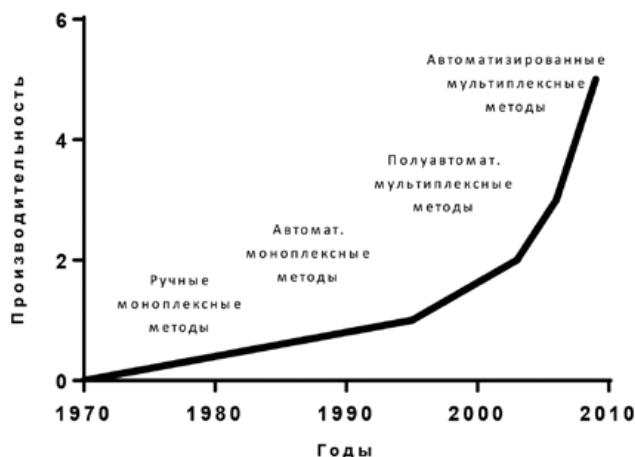


Рисунок 1. Эволюция технологий обнаружения аутоантител: роль автоматизации.

Иммуноферментный анализ

Иммуноферментный анализ (ИФА) представляет собой высокочувствительный и быстрый метод обнаружения ААТ. Метод ИФА был разработан путем модификации радиоиммуноанализа, что было достигнуто путем конъюгирования меченого антигена и антитела с ферментами, а не с радиоактивным йодом. Обнаружение ААТ осуществляется путем образования комплекса антиген-антитело для получения измеримого результата. ИФА тестирование проводят в полистироловых 96-луночных планшетах. Процедура ИФА тестирования заключается в том, что сыворотки инкубируют в лунках, предварительно покрытых очищенным антигеном, и связанные антитела выявляют с помощью конъюгированных с ферментом антител против иммуноглобулина человека с последующей цветовой визуализацией с соответствующим ферментным субстратом. Коммерческая доступность наборов ИФА позволяет быстро обрабатывать большое количество клинических образцов при умеренно низких затратах. Однако вследствие низкого уровня стандартизации существует множество возможных источников ошибок, например, высокие фоновые сигналы, высокая межпостановочная вариабельность, концентрация ААТ или антигена, взаимодействие «антиген – аутоантитело», состав буфера, время и температура инкубации или стадии промывки. Поскольку при разработке ИФА тест-систем могут использоваться денатурированные аутоантигены, данный метод может давать ложноположительные результаты. Хотя второе многоцентровое европейское исследование показало, что методы ИФА улучшаются, Bizzaro et al. полагает, что проблема ложноположительных результатов в ИФА по-прежнему широко распространена [28, 29]. Было также обнаружено, что методы ИФА пропускают сыворотки с положительным АНФ в низком титре, а также сыворотки со специфическими АНА. Таким образом, в настоящее время тесты ИФА могут быть адекватными для скрининга сывороток только со средними и высокими титрами. Эти обстоятельства стимулировали разработку более простых и высокопроизводительных анализов, которые можно автоматизировать и стандартизировать.

Иммуноблоттинг

Вестерн-блот был разработан в 1980-х годах и был крайне информативен для выявления спектра ААТ. В этом методе сначала ядерный и цитоплазматический антигены разделяются в соответствии с их молекулярной массой с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, а затем переносятся на мембрану или стрипы. Хотя этот метод считается высокочувствительным к выявлению антител к растворимым антигенам, антитела против конформационных эпитопов не обнаруживаются [30]. Метод дот-блоттинга – это качественный анализ, в котором используются полоски нитроцеллюлозы, на которых очищенные антигены наносятся на заранее расположенные точки. Полоски инкубируют с 50-кратным разведением сыворотки пациента с последующей инкубацией с конъюгатом, содержащим щелочную фосфатазу и протеин А. Наконец, тест-полоски окрашивают 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфатом. Положительные полоски окрашиваются в виде синего пятна [48]. Метод лайн-блоттинга – это еще один качественный тест, который выявляет реактивность антител к антигенам, нанесенным в виде отдельных линий на мембрану. Как и дот-блот, лайн-блот прост в использовании, требует меньше времени на обработку результатов и сравним с ИФА по чувствительности и специфичности. Возможна также автоматизация и стандартизация интерпретации результатов [31].

Автоматизированные методы исследования аутоантител

Мультиплексные методы исследования ААТ – это анализы, которые могут обнаруживать множество специфических ААТ за один запуск, тогда как традиционный ИФА использует один антиген для обнаружения только одной специфичности ААТ [32]. Таким образом, в мультиплексном анализе комбинация рекомбинантных/нативных антигенов или антигенного пептида используется для одновременного обнаружения комбинации специфических ААТ. Примером является мультипараметрическая автоматическая станция Chorus trio (Италия), объединяющая ИФА метод и реакцию связывания комплемента (РСК) на одной платформе. Данная методика позволяет выполнять более 30 тестов в ИФА формате для диагностики аутоиммунных заболеваний, а также более 20 тестов в РСК формате для диагностики инфекционных заболеваний. Производительность данной аналитической системы составляет 30 тестов. Автоматическая станция Chorus trio допускает любую комбинацию тестов, включая одновременное выполнение РСК и ИФА. Готовый к использованию стрип для проведения одного теста содержит все необходимые реагенты (рис. 2). Пробоподготовка в ИФА-тестах не требуется: в стрип вносят цельную сыворотку. В РСК-тестах необходима только тепловая инактивация собственных компонентов комплемента сыворотки. В зависимости от теста, результаты анализа представляются в качественном, полуколичественном и количественном форматах. Высокую точность исследования обеспечивают содержащие все необходимые реагенты

стрипы, отсутствие пробоподготовки (в стрип вносят цельную сыворотку), точное дозирование проб и реагентов благодаря наличию датчика уровня и мониторингу добавления пробы, калибровочные пробы, контрольные образцы. Таким образом, к преимуществам данного прибора относятся широкая панель востребованных тестов, минимальные трудозатраты сотрудников лаборатории, возможность использования анализатора для выполнения анализов в режиме *cito*, выполнение РСК-тестов в автоматическом режиме, высокая точность и воспроизводимость результатов, компактный дизайн анализатора.

Мультипараметрическая автоматическая станция Chorus trio была внедрена в рутинную практику нашей лаборатории для диагностики аутоиммунных заболеваний в качестве подтверждающего тестирования. Были обследованы 67 больных с ССД, 31 больной с синдромом Шегрена (СШ), а также 30 здоровых доноров. Для определения антител к Scl-70, CENP-B, SSa и SSB с помощью метода лайн-блоттинга использовались диагностические наборы фирмы Euroimmun (Германия). Также были измерены антитела к Scl-70, CENP-B, SSa и SSB с использованием реагентов Chorus (Италия) на платформе Chorus trio. Аналитические характеристики представлены в таблице 2. Для оценки сходимости тест-систем разных производителей был использован коэффициент Каппа Коэна. Коэффициент < 0 расценивался как «нет сходимости», между 0,00 и 0,20 – «слабая сходимость», между 0,21 и 0,40 – «низкая сходимость», между 0,41 и 0,60 – «удовлетворительная сходимость», между 0,61 и 0,80 – «хорошая сходимость», между 0,81 и 1,00 – «почти идеальная сходимость». При сопоставлении результатов лайн-блоттинга и реагентов Chorus значения каппа/коэффициента Коэна составили 1,00 для aScl-70, 1,00 – для aCENP-B и продемонстрировали «почти идеальную сходимость». В группе СШ сходимость тест-систем для aSSa и aSSB составила 0,737 и 0,345 соответственно, что свидетельствует о хорошей и удовлетворительной сходимости соответственно.



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



Рисунок 2. Стрип для проведения одного теста на мультипараметрической автоматической станции Chorus trio (Италия).

Таблица 2
Аналитические характеристики тест-систем CHORUS

Реагент	ЧВ, %	95% ДИ	СП, %	95% ДИ	ОППР	95% ДИ	ОПОР	95% ДИ
Пациенты с системной склеродермией (n=67)								
a-Scl-70	16,42	8,49–27,48	100,00	96,38–100,00	–	–	0,84	0,75–0,93
aCENPB	35,82	24,47–48,47	100,00	96,38–100,00	–	–	0,64	0,54–0,77
Пациенты с синдромом Шегрена (n=31)								
aSSa	77,42	58,9–90,41	95,34	83,47–99,36	–	–	0,87	0,77–0,99
aSSB	46,67	28,34–65,67	97,50	86,84–99,94	–	–	0,97	0,94–1,00

Примечание: ЧВ – диагностическая чувствительность, СП – диагностическая специфичность, ДИ – доверительный интервал, ОППР – отношение правдоподобности положительного результата исследования, ОПОР – отношение правдоподобности отрицательного результата исследования, a-Scl-70 – антитела к Scl70, aCENPB – антитела к CENP B, aSSa – антитела к SSa-антигену, aSSB – антитела к SSB-антигену.

Заключение

Спектр лабораторных методов, используемых для определения ААТ, резко изменился за последние десятилетия. Первые лабораторные методы определения ААТ (гемагглютинация, иммуноэлектрофорез) отличаются трудоемкостью и низкой скоростью выполнения, имеют более высокую диагностическую специфичность, но более низкую диагностическую чувствительность, чем современные подходы, основанные на твердофазных тестах (ИФА, лайн-блот). Современные методы позволяют количественно измерить уровни ААТ и лучше подходят для диагностики и мониторинга заболеваний. Новые твердофазные иммунологические исследования, создавшие основу для различных коммерческих платформ, были разработаны и внедрены в рутинные лаборатории диагностики аутоиммунных заболеваний. Следующим этапом ААТ тестирования стало развитие мультиплексных технологий, которые позволяют улучшить и ускорить лабораторное обследование. В ближайшем будущем будут внедрены дополнительные технологии, а разработка новых рекомбинантных белков еще больше расширит число выявляемых аналитов. Эффективность данных технологий, возможности автоматизации и повышение скорости и качества тестирования, а также обширная информация, предоставляемая с помощью инновационных мультипараметрических систем, принесет значительные преимущества для врачей клинической лабораторной диагностики и врачей-клиницистов.

Список литературы / References

1. Elkon K., Casali P. Nature and functions of autoantibodies. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 2008; (4): 491–498. <https://doi.org/10.1038/ncprheum0895>.
2. Ludwig R. J., Vanhoorelbeke K., Leyboldt F., Kaya Z., Bieber K., McLachlan S.M., Komorowski L., Luo J., Cabral-Marques O., Hammers C.M., Lindstrom J.M., Lamprecht P., Fischer A., Riemekasten G., Tersteeg C., Sandermann P., Rapoport B. t., Wandinger K.-P., Probst C., Beidag A. El, Schmidt E., Verkman A., Manz R. A., Nimmerjahn F. Mechanisms of Autoantibody-Induced Pathology, *Front. Immunol.* 2017; (8). doi:10.3389/fimmu.2017.00603.
3. Pashnina I. A., Krivolapova I. M., Fedotkina T. V., Ryabkova V. A., Cheresheva M. V., Churilov L. P., Cheresheva V. A. Antinuclear Autoantibodies in Health: Autoimmunity Is Not a Synonym of Autoimmune Disease, *Antibodies*. 2021; (10):9. doi:10.3390/antib10010009.
4. Pengo V., Banzato A., Denas G., Jose S.P., Bison E., Hoxha A., Ruffatti A. Correct laboratory approach to APS

diagnosis and monitoring. *Autoimmun. Rev.* 2013; (12): 832–834. doi:10.1016/j.autrev.2012.11.008.

5. Hang L., Nakamura R.M., Tubbs R. Current Concepts and Advances in Clinical Laboratory Testing for Autoimmune Diseases. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 1997; (34):275–311. <https://doi.org/10.3109/10408369708998095>.
6. Bizzaro N., Tozzoli R., Shoenfeld Y. Are we at a stage to predict autoimmune rheumatic diseases? *Arthritis Rheum.* 2007; (56): 1736–1744. <https://doi.org/10.1002/art.22708>.
7. Fritzler M. J. Challenges to the use of autoantibodies as predictors of disease onset, diagnosis and outcomes. *Autoimmun. Rev.* 2008; (7):616–620. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2008.06.007>.
8. Shero J., Bordwell B., Rothfield N., Earnshaw W. High titers of autoantibodies to topoisomerase I (Scl-70) in sera from scleroderma patients. *Science.* 1986; (231): 737–740. <https://doi.org/10.1126/science.3003910>.
9. Agmon-Levin N., Damoiseaux J., Kallenberg C., Sack U., Witte T., Herold M., Bossuyt X., Musset L., Cervera R., Plaza-Lopez A., Dias C., Sousa M. J., Radice A., Eriksson C., Hultgren O., Vliedermans M., Khamashta M., Regenass S., Andrade L.E.C., Wiik A., Tincani A., Rönnefeldt J., Bloch D.B., Fritzler M. J., Chan E.K.L., Garcia-De La Torre I., Konstantinov K.N., Lahita R., Wilson M., Vainio O., Fabien N., Sinico R.A., Meroni P., Shoenfeld Y. International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. *Ann. Rheum. Dis.* 2014; (11):17–23. doi:10.1136/annrheumdis-2013-203863.
10. D. H. Solomon, A. J. Kavanaugh, P. H. Schur. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: Antinuclear antibody testing. *Arthritis Rheum.* 47 (2002) 434–444. doi:10.1002/art.10561.
11. Savige J. A., Paspaliaris B., Silvestrini R., Davies D., Nikoloutsopoulos T., Sturgess A., Neil J., Pollock W., Dunster K., Hendle M. A review of immunofluorescent patterns associated with antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) and their differentiation from other antibodies. *J. Clin. Pathol.* 1998; (51):568–575. <https://doi.org/10.1136/jcp.51.5.568>.
12. Mitsuyama K. Antibody markers in the diagnosis of inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* 2016; (22): 1304. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i3.1304>.
13. Favaloro E. J., Wong R. C. W. Antiphospholipid antibody testing for the antiphospholipid syndrome: a comprehensive practical review including a synopsis of challenges and recent guidelines. *Pathology.* 2014; (46): 481–95. <https://doi.org/10.1097/PAT.0000000000000142>.
14. Miyakis S., Lockshin M. D., Atsumi T., Branch D. W., Brey R. L., Cervera R., Derksen R. H. W. M., De Groot P. G., Koike T., Meroni P. L., Reber G., Shoenfeld Y., Tincani A., Vlachoyiannopoulos P. G., Kriis S. A. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J. Thromb. Haemost.* 2006; (4): 295–306. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.01753.x>.
15. Muratori L., Granito A., Muratori P., Pappas G., Bianchi F. B., Antimitochondrial Antibodies and Other Antibodies in Primary Biliary Cirrhosis: Diagnostic and Prognostic Value. *Clin. Liver Dis.* 2008; (12): 261–276. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2008.02.009>.
16. Ragusa F., Fallahi P., Elia G., Gonnella D., Paparo S. R., Giusti C., Churilov L. P., Ferrarri S. M., Antonelli A. Hashimoto's thyroiditis: Epidemiology, pathogenesis, clinic and therapy. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2019; (33): 101367. doi:10.1016/j.beem.2019.101367.
17. Bartalena L. Diagnosis and management of Graves disease: a global overview. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2013; (9): 724–734. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.193>.
18. Krip M., Siljander H. Autoimmune mechanisms in type 1 diabetes. *Autoimmun. Rev.* 2008; (7): 550–557. doi:10.1016/j.autrev.2008.04.008.
19. Kusunoki S., Kaida K. Antibodies against ganglioside complexes in Guillain-Barré syndrome and related disorders. *J. Neurochem.* 2011; (116): 828–832. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.07029.x>.

20. Haven T. R., Astill M. E., Pasi B. M., Carper J. B., Wu L. L., Tebo A. E., Hill H. R. An Algorithm for Acetylcholine Receptor Antibody Testing in Patients with Suspected Myasthenia Gravis. *Clin. Chem.* 2010; (56): 1028–1029. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2009.140392>.
21. Granerod J., Ambrose H. E., Davies N. W., Clewley J. P., Walsh A. L., Morgan D., Cunningham R., Zuckerman M., Mutton K. J., Solomon T., Ward K. N., Lunn M. P., Irani S. R., Vincent A., Brown D. W., Crowcroft N. S. Causes of encephalitis and differences in their clinical presentations in England: a multicentre, population-based prospective study. *Lancet Infect. Dis.* 2010; (10): 835–844. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70222-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70222-X).
22. Husby S., Koletzko S., Korponay-Szabó I., Kurppa K., Mearin M. L., Ribes-Koninckx C., Shamir R., Troncone R., Auricchio R., Castillejo G., Christensen R., Dolinsek J., Gillett P., Hróbjartsson A., Koltai T., Maki M., Nielsen S. M., Popp A., Størdal K., Werkstetter K., Wessels M. European Society Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Guidelines for Diagnosing Coeliac Disease 2020. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2020; (70): 141–156. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000002497>.
23. E. Schmidt, M. Kasperkiewicz, P. Joly, Pemphigus. *Lancet.* 2019; (394): 882–894. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31778-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31778-7).
24. R. Tozzoli, C. Bonaguri, A. Melegari, A. Antico, D. Bassetti, N. Bizzaro. Current state of diagnostic technologies in the autoimmune laboratory. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2013; (51): 1437–4331 <https://doi.org/10.1515/cclm-2012-0191>.
25. Robbins W. C., Holman H. R., Deicher H., Kunkel H. G. Complement Fixation with Cell Nuclei and DNA in Lupus Erythematosus. *Exp. Biol. Med.* 1957; (96): 575–579. <https://doi.org/10.3181/00379727-96-23545>.
26. Anderson J. R., Goudie R. B., Gray K., Timbury G. C. Auto-antibodies in Addison's disease. *Lancet.* 1957; (26919): 1123–1124. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(57\)91687-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(57)91687-2).
27. Ceppellini R., Polli E., Celada F. A DNA-Reacting Factor in Serum of a Patient with Lupus Erythematosus Diffusus. *Exp. Biol. Med.* 1957; (96): 572–574. <https://doi.org/10.3181/00379727-96-23544>.
28. Charles P. J., van Venrooij W. J., Maini R. N. The Consensus Workshops for the Detection of Autoantibodies to Intracellular Antigens in Rheumatic Diseases: 1989–1992. *Clin. Exp. Rheumatol.* 1989 (10): 507–11. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1458707>.
29. Bizzaro N., Tozzoli R., Tonutti E., Piazza A., F. Manoni, A. Ghirardello, D. Bassetti, D. Villalta, M. Pradella, P. Rizzotti, Variability between methods to determine ANA, anti-dsDNA and anti-ENA autoantibodies: a collaborative study with the biomedical industry. *J. Immunol. Methods.* 1998; (219): 99–107. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(98\)00140-9](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(98)00140-9).
30. Boire G., Lopez-Longo F.-J., Lapointe S., Ménard H.-A. Sera from patients with autoimmune disease recognize conformational determinants on the 60-kDa r/o-sa protein. *Arthritis Rheum.* 1991; (119434): 722–730. <https://doi.org/10.1002/art.1780340613>.
31. J. W. C. T. J. Damoiseaux, K. Boesten, J. Giesen, J. Austen, Evaluation of a Novel Line-Blot Immunoassay for the Detection of Antibodies to Extractable Nuclear Antigens. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2005; (1050): 340–347. <https://doi.org/10.1196/annals.1313.036>.
32. Pollard K. M., Casiano C. A., Muro Y., Satoh M., Tanaka S., Chan E. K. L. The uses and misuses of multiplex autoantibody assays in systemic autoimmune rheumatic diseases. *Front. Immunol.* 2015; (6): 181. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00181>.

Статья поступила / Received 05.10.2021
Получена после рецензирования / Revised 17.10.2021
Принята в печать / Accepted 10.03.2022

Сведения об авторах:

Ткаченко Ольга Юрьевна, к.м.н., врач клинической лабораторной диагностики клинико-диагностической лаборатории НМЦ по молекулярной медицине. E-mail: tkachenie@mail.ru. eLibrary SPIN: 6593–8770. ORCID: 0000-0002-1479-6551

Лапин Сергей Владимирович, к.м.н., зав. лабораторией диагностики аутоиммунных заболеваний, НМЦ по молекулярной медицине. E-mail: svlapin@mail.ru. eLibrary SPIN: 9852–7501. ORCID: 0000-0002-4998-3699

Мазинг Александра Васильевна, к.м.н., в.н.с. лаборатории молекулярной диагностики, НМЦ по молекулярной медицине. E-mail: alex_mazing@mail.ru. eLibrary SPIN: 4458–4633. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3055-6507>

Блинова Татьяна Владимировна, к.м.н., с.н.с. лаборатории диагностики аутоиммунных заболеваний, НМЦ по молекулярной медицине. E-mail: tvblinova@list.ru. eLibrary SPIN: 1637–4357. ORCID: 0000-0003-4896-3319

Молникова Анна Николаевна, врач клинической лабораторной диагностики, клинико-диагностическая лаборатория, НМЦ по молекулярной медицине. E-mail: molnikova-anna@mail.ru. eLibrary SPIN: 7252–3525. ORCID: 0000-0002-4604-0660

Кузнецова Дарья Александровна, к.м.н., врач клинической лабораторной диагностики, клинико-диагностическая лаборатория, НМЦ по молекулярной медицине. E-mail: lariwar@mail.ru. eLibrary SPIN: 6110–6168. ORCID: 0000-0001-5318-354X

Холопова Ирина Валерьевна, врач клинической лабораторной диагностики, клинико-диагностическая лаборатория, НМЦ по молекулярной медицине. E-mail: irinakholopova@yandex.ru. eLibrary SPIN: 8964–4523. ORCID: 0000-0001-9520-453X

ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург

Автор для переписки: Ткаченко Ольга Юрьевна. E-mail: tkachenie@mail.ru

Для цитирования: Ткаченко О. Ю., Лапин С. В., Мазинг А. В., Блинова Т. В., Молникова А. Н., Кузнецова Д. А., Холопова И. В. Диагностическое значение выявления аутоантител и современные автоматизированные методы их исследования. Медицинский алфавит. 2022; (6): 40–46. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2022-6-40-46>.

About authors

Tkachenko Olga Yu., PhD Med, senior researcher of clinical diagnostic laboratory, Center for Molecular Medicine. E-mail: tkachenie@mail.ru. eLibrary SPIN: 6593–8770. ORCID: 0000-0002-1479-6551

Lapin Sergey V., PhD Med, head of the Laboratory for Diagnosis of Autoimmune Disease. E-mail: svlapin@mail.ru. eLibrary SPIN: 9852–7501. ORCID: 0000-0002-4998-3699

Mazing Alexandra V., PhD Med, leading research scientist, Laboratory for Molecular Diagnostics, Center for Molecular Medicine. E-mail: alex_mazing@mail.ru. eLibrary SPIN: 4458–4633. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3055-6507>

Blinova Tatyana V., PhD Med, senior research scientist, Laboratory for Diagnostics of Autoimmune Diseases, Center for Molecular Medicine. E-mail: tvblinova@list.ru. eLibrary SPIN: 1637–4357. ORCID: 0000-0003-4896-3319

Molnikova Anna N., MD, clinical diagnostic laboratory, Center for Molecular Medicine. E-mail: molnikova-anna@mail.ru. eLibrary SPIN: 7252–3525. ORCID: 0000-0002-4604-0660

Kuznetsova Daria A., PhD Med, clinical diagnostic laboratory, Center for Molecular Medicine. E-mail: lariwar@mail.ru. eLibrary SPIN: 6110–6168. ORCID: 0000-0001-5318-354X

Kholopova Irina V., MD, clinical diagnostic laboratory, Center for Molecular Medicine. E-mail: irinakholopova@yandex.ru. eLibrary SPIN: 8964–4523. ORCID: 0000-0001-9520-453X

First St. Petersburg State Medical University n.a. Academician I. P. Pavlov, St. Petersburg, Russia

Corresponding author: Tkachenko Olga Yu. E-mail: tkachenie@mail.ru

For citation: Tkachenko O. Yu., Lapin S. V., Mazing A. V., Blinova T. V., Molnikova A. N., Kuznetsova D. A., Kholopova I. V. Diagnostic value of autoantibodies and novel automated methods of their detection. *Medical alphabet.* 2022; (6): 40–46. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2022-6-40-46>

