Био-лайн

Современные возможности лабораторной диагностики аутоиммунных заболеваний

Донецк 14 октября 2026 г.

Зав. КДЛ ООО «БИО-ЛАЙН»
Небесная Л.В.

Био-лайн

Чувствительность тест-системы

- **определяет, как часто антитела встречаются у лиц с данным заболеванием**

Процент выявленных тест-системой **позитивных** образцов из массива положительных образцов (вероятность появления ***ложноотрицательных*** результатов)

Аналитическая чувствительность - способность обнаружить минимальное количество искомого вещества

Био-лайн

Специфичность тест-системы

- **определяет, насколько редко антитела встречаются при других заболеваниях**

- Процент выявленных **негативных** образцов из панели негативных контрольных сывороток (вероятность появления ***ложноположительных*** результатов)

Специфичность позволяет дифференцировать искомое вещество

Био-лайн

Тест-системы для диагностики антител

- **Скрининговые – высокая чувствительность**
- **Подтверждающие – высокая специфичность**

Основные лабораторные методы и оборудование для выявления АНА в клинико-диагностических лабораториях

Принцип измерения	Лабораторное оборудование, фирмы- производители
Непрямая иммунофлюоресценция на эпителиоидных клеточных линиях человека Нер-2 и Нер 2000 (нРИФ)	TITERPLANE (Euroimmun AG), ALKIDES (Medipon)
Иммуноферментный анализ (И ФА)	ANALYZER (Euroimmun AG), ALEGRIA (Orgentec)
Иммуноблот: лайн-блот (LIA), вестерн-блот, дот-блот	EUROBIotOne (Euroimmun AG), BlueDiver (D-TEK)
Хемилюминесценция (CLIA)	LIAISON (DiaSorin)
Проточная цитометрия с иммунореактивными микрочастицами (ALBIA)	BIOPLEX 2200 (BioRad)
Иммуноферментный флюоресцентный метод (FEIA)	PHADIA 250 (Thermo Scientific)

Био-лайн

Определение антител



Маркировка (флуоресцентный краситель, фермент и т.д.)

Вторичные антитела (направлены против антител)

Антитела (образец пациента)

Поверхности (слайды, ячейки плашки, мембраны)

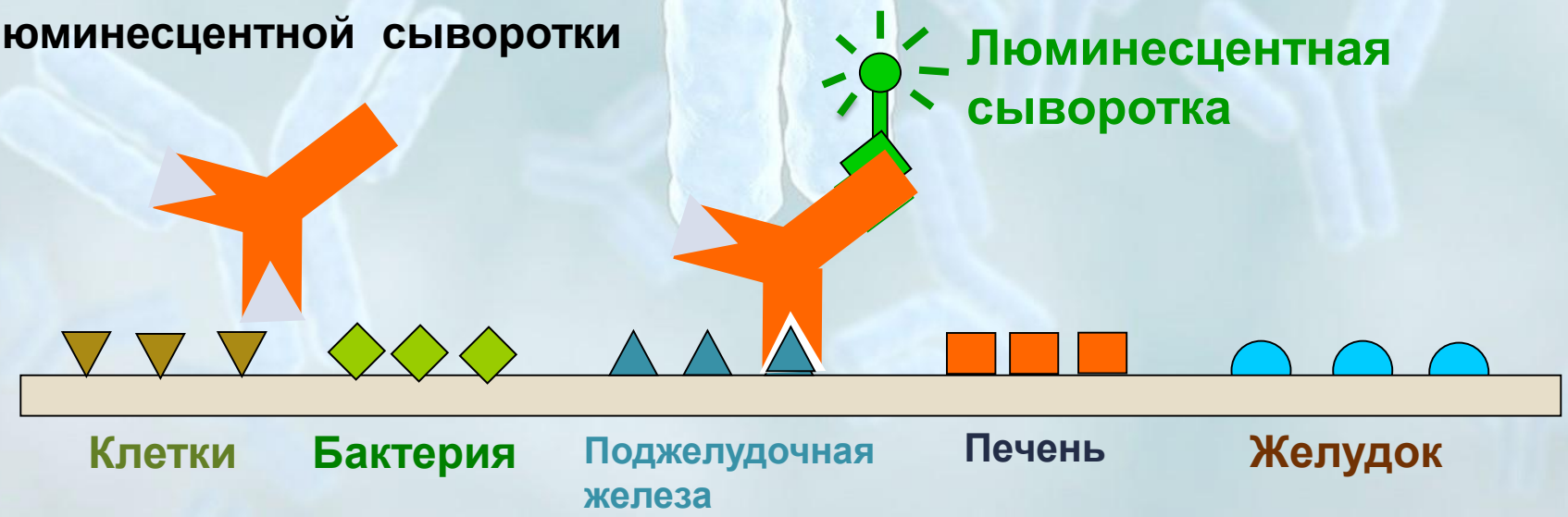
Антиген (клетки, бактериологические фрагменты, белки)

Обнаружение антител методом непрямой иммунофлюоресценции

- Сегменты органов, клетки, бактерии фиксируются на поверхности стекла
- Антитела связываются с антигенами (фрагментами органов (например, сердце, печень, желудок), клетками, бактериями
- Выявленные антитела визуализируются с помощью люминесцентной сыворотки



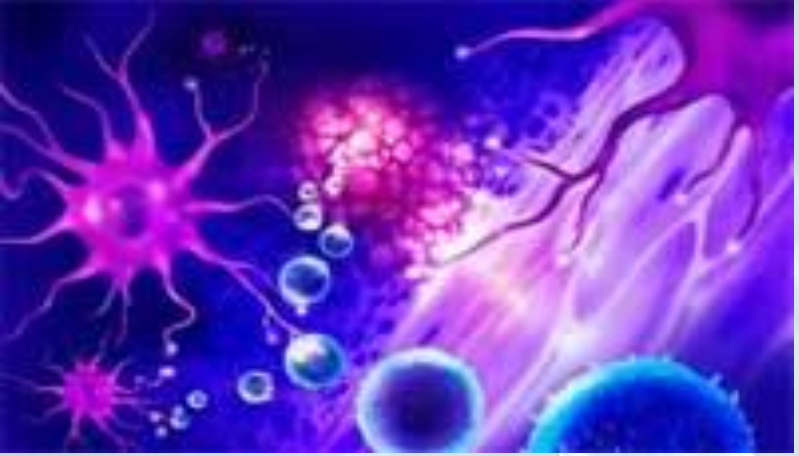
Антитело



Аутоиммунные заболевания — это класс заболеваний, разнородных по клиническим проявлениям, развивающихся вследствие патологической выработки аутоагрессивных антител или размножения аутоагрессивных клонов киллерных клеток против здоровых, нормальных тканей организма, приводящих к повреждению и разрушению нормальных тканей и развитию аутоиммунного воспаления

Био-лайн

- **Более 100 нозологических форм относят к заболеваниям аутоиммунной природы**
- **Более 500 аутоантител описаны при различных аутоиммунных заболеваниях**



Био-лайн

Диагностика аутоиммунных заболеваний

❖Системная патология

- СКВ
- Прогрессирующий системный склероз (склеродермия)
- Ревматоидный артрит
- Синдром Шарпа
- Синдром Шегрена
- Поли-/дерматомиозиты
- Антифосфолипидный синдром
- Васкулиты (гранулематоз Вегенера, микроскопический артериит и др.)

❖Органная патология

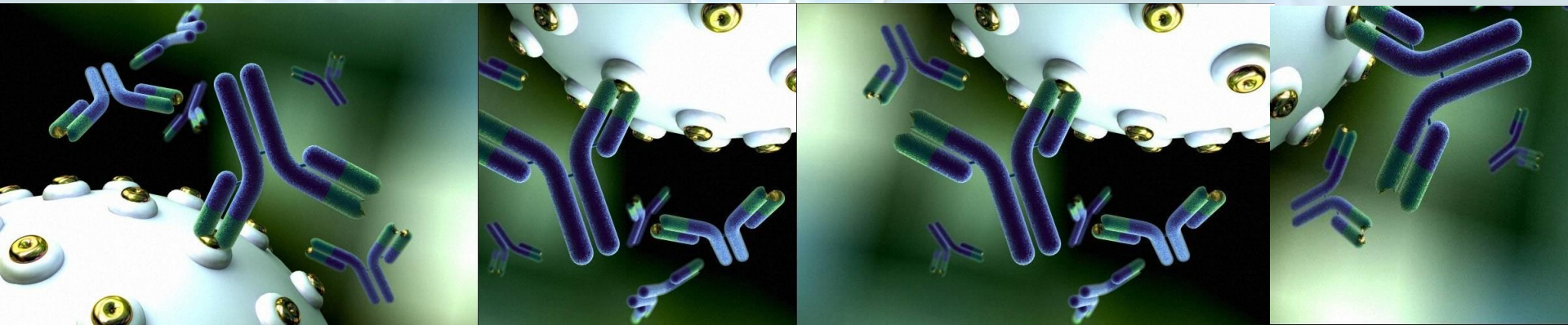
- Заболевания печени: аутоиммунный гепатит, первичный билиарный цирроз
- Заболевания щитовидной железы: тиреоидит Хошимото, болезнь Грейвса
- Заболевания поджелудочной железы: диабет I типа
- Целиакия и др.

Био-лайн

Антинуклеарные антитела (АНА, ANA)

- Представляют собой семейство аутоантител, реагирующих с нуклеиновыми кислотами и ассоциированными с ними белками
- Семейство включает более 200 ***антигенных специфичностей*** (Conrad K. et al., 2017, Shoenfeld Y. 2012)
- Могут быть направлены на антигены ядра, мембран и цитоплазмы клетки – ***антиклеточные антитела*** (Agmon-Lavin N. et al., 2014)

Причиной их формирования является иммунная реакция против антигенов, которые образуются в результате апоптоза (Casciola-Rosen et al., 1994)



Био-лайн

Классификация и номенклатура

«Антинуклеарные антитела/Антиклеточные антитела» - общий термин

«Антинуклеарный фактор» - непрямая иммунофлюоресценция (нРИФ) (условно «АНА=АНФ»)

«Экстрагируемый ядерный антиген»- водо-растворимые компоненты ядра клетки — ранее использовался ацетонный экстракт, в настоящее время смесь антигенов

(Нуклеиновые кислоты водонерастворимы, в состав ЭНА не входят)

«Скрининг антител к ЭНА» // «Антинуклеарные антитела скрининг» – выявление антител к смеси основных АНА методом ИФА, однако нуклеиновые кислоты (ДНК, РНК) водонерастворимы, в состав ЭНА не входят и требуют отдельных тестов

«Специфичность АНА» - определение аутоантител к конкретным антигенам

- **Номенклатура конкретного антитела**:
  - название антигена или мол. масса (snRNP70)
  - фамилия больного (Sm, Ku)
  - сокращение антигена/заболевания (PM-Scl)
- **Локализация ядерной мишени**:

  хроматин; рибонуклеопротеины; ядрышко; цитоплазма

Био-лайн

Методы определения АНА

- LE- клетки
- АНФ (HEp-2) с определением титра и типа свечения
- Антитела к дсДНК и нуклеосомам
- Антитела к экстрагируемым антигенам (ИФА и лайнблот)
- Антитела к фосфолипидам

Био-лайн

LE-клеточный феномен

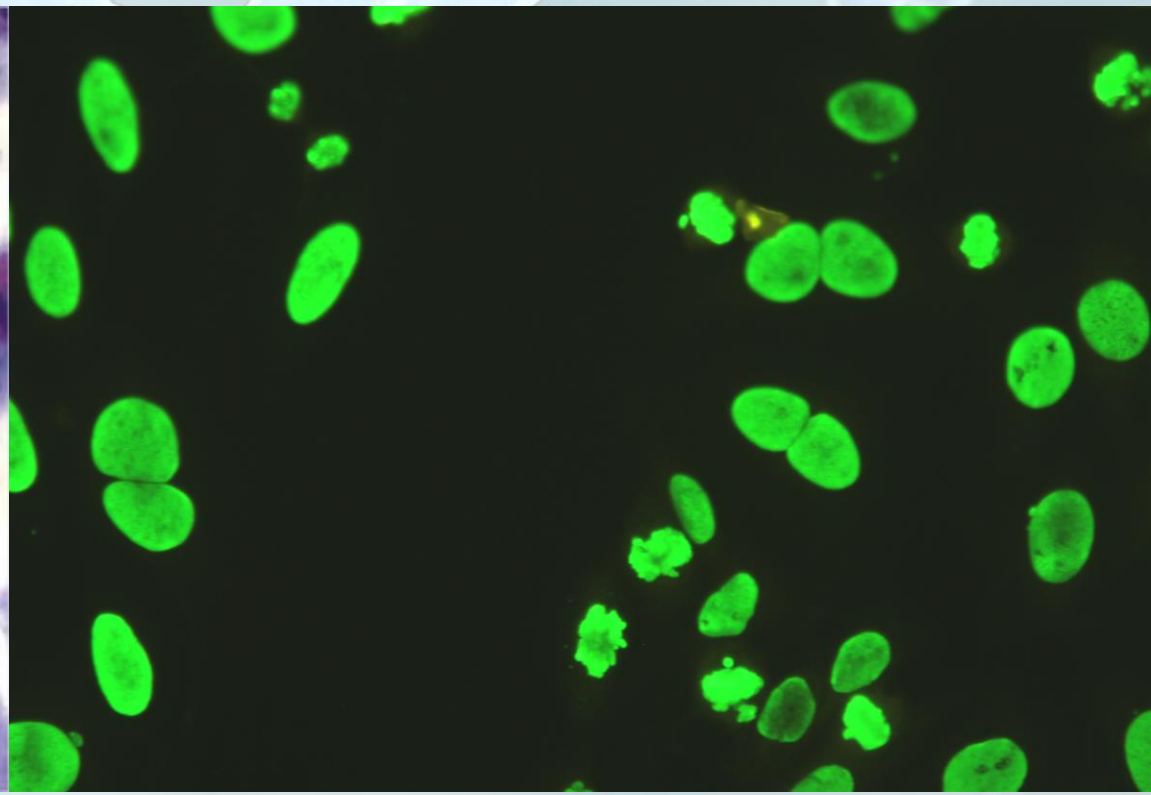
- Обнаружение нейтрофилов, фагоцитировавших ядра лимфоцитов при инкубации цельной крови
- Формирование LE-клеток определяется присутствием в сыворотке антинуклеарных антител
- Метод не стандартизован, требуется трехкратное выявление LE-клеток
- Низкая чувствительность **не позволяет рекомендовать его использование** в практической диагностике



Био-лайн

Антинуклеарный фактор на клеточной линии аденокарциномы гортани HEp-2

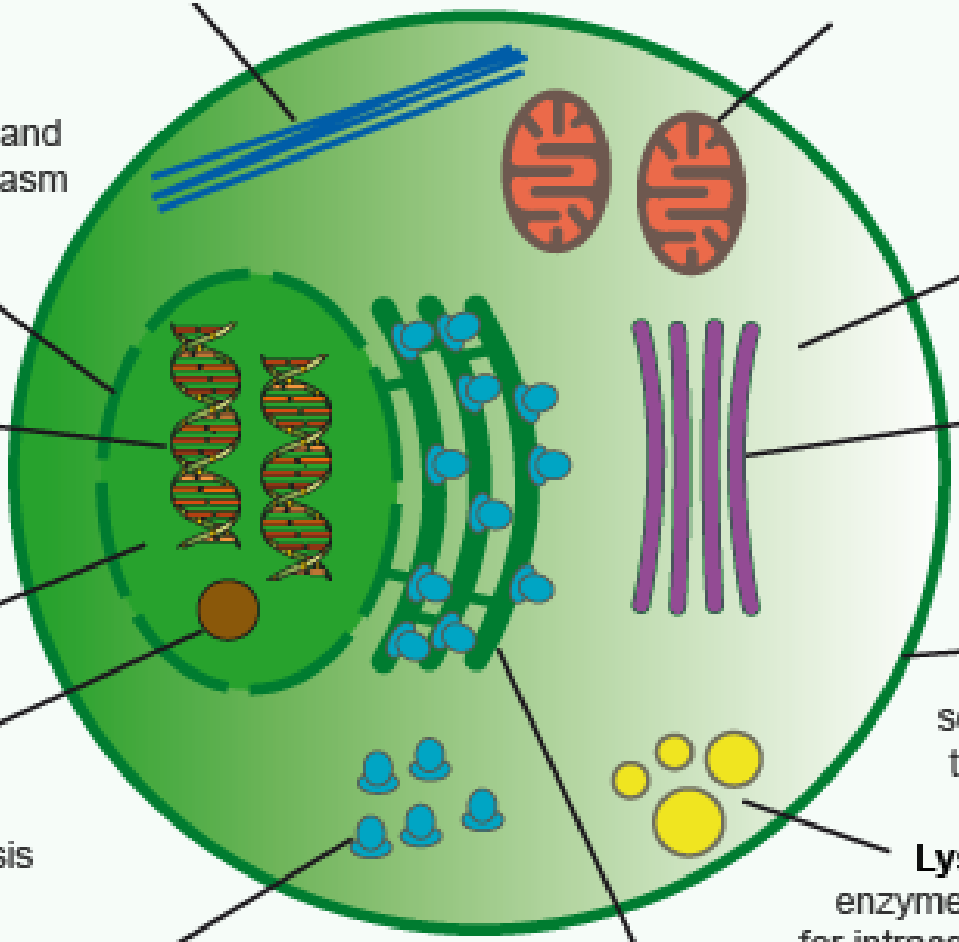




Био-лайн

Зачем использовать метод непрямой иммунофлюоресценции?

- Золотой стандарт ANA - скрининга
- Полный спектр антигенов (ядра клетки и цитоплазма)
- Прост в применении
- Один субстрат на слайде может показать множество различных аутоантител



Cytoskeleton
structural proteins of the cell,
e.g. actin, vimentin

Mitochondria
provide energy in the form of ATP for
the cell metabolism

Nuclear membrane with nuclear pores
surrounds the cell nucleus and
separates it from the cytoplasm

Cytoplasm
liquid medium
within the cell

DNA
carries the
genetic information

Golgi apparatus
processes and sends
proteins within the cell

Cell nucleus
contains the DNA

Cell membrane
surrounds the cell and
separates its interior from
the outside environment

Nucleolus
performs rRNA synthesis
in the cell nucleus

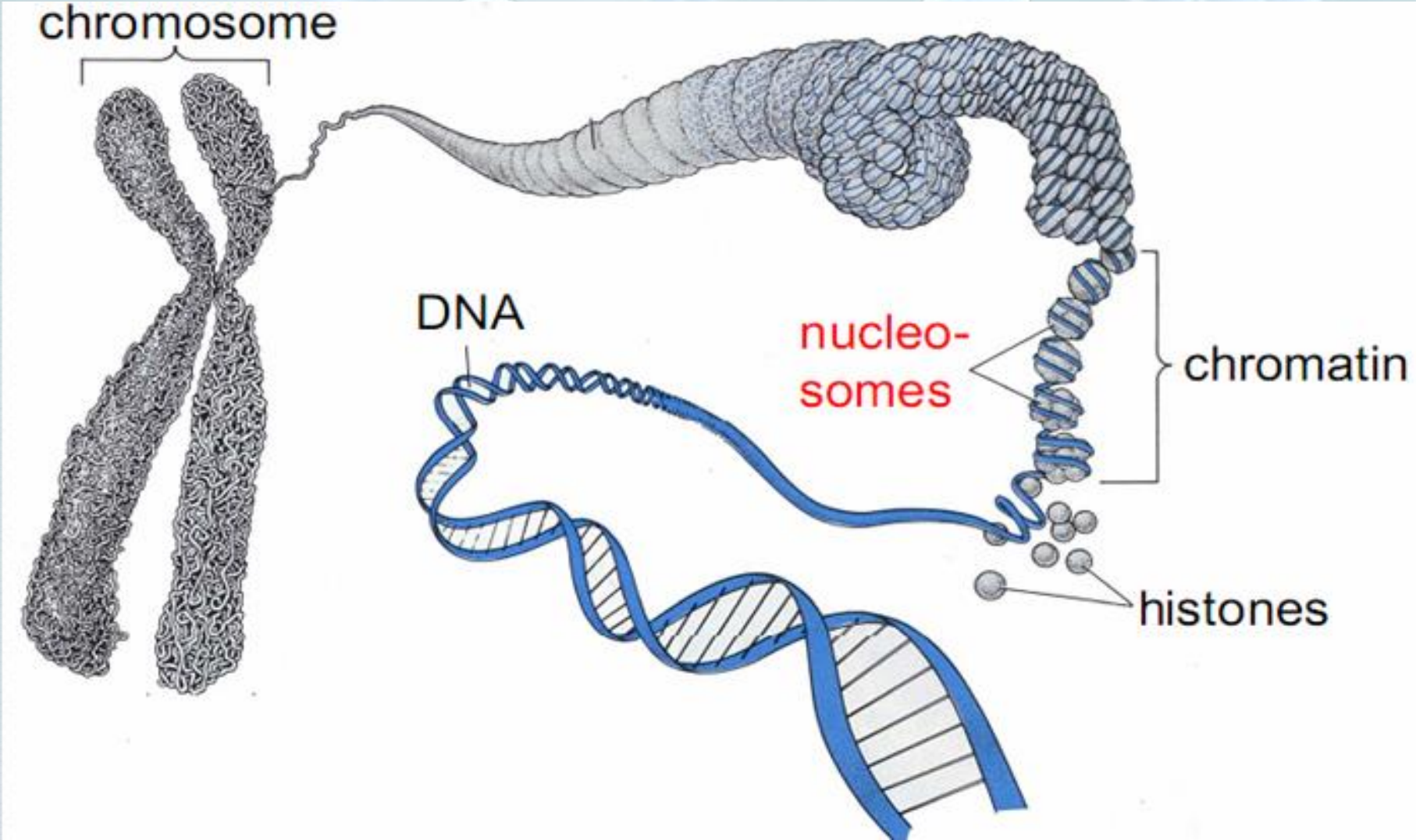
Lysosomes
enzyme-filled vesicles
for intracellular catabolism

Free ribosomes
responsible for protein biosynthesis
in the cytoplasm

Rough endoplasmic reticulum
studded with ribosomes;
specialises in the synthesis of membrane

Био-лайн

Антигены хроматина – гомогенный тип свечения АНА



Био-лайн

Краткий перечень состояний, сопровождающихся АНА

Нозологическая форма	%
Системная красная волчанка	95
Диффузная склеродермия	95
Синдром Шегрена	95
Дерматомиозит	40
Смешанное заболевание соед.ткани	100
Дискоидная КВ	50
Ревматоидный артрит	30
Юношеский РА (олигоартикулярный)	90
Аутоиммунный гепатит	95
Первичный билиарный цироз	95
Злокачественные заболевания	20
Лица пожилого возраста	15
Здоровые женщины	3

Био-лайн

Инициатива ICAP

- International consensus on ANA patterns (ICAP)- международная согласительная группа по типам свечения АНФ
- Сформирована в 2014 году под эгидой Международного союза иммунологических обществ (IUIS), является частью Autoantibody Standardization Committee, который функционирует уже более 25 лет (стандарты ANA CDC)
- Разработаны 17 стандартов ANA, кроме того стандарты АКЛА, MPO/PR3, АСРА (**www.AutoAb.org**)
- Организаторы: *E.K.L. Chan, J. Damoiseaux, O.G. Carballo, K. Conrad, W. de Melo Cruvinel, P.L.C. Francescantonio, M.J. Fritzler, I. Garcia-De La Torre, M. Herold, T. Mimori, M. Satoh, C.A. von Mühlen, and L.E.C. Andrade*

Стандартизация типов свечения ICAP

- Буквенно-цифровая номенклатура AC-0….AC-29

(от англ. Anti-Cell ##) всего 30 типов

- Классификационное дерево:

ядерные, ядрышковые, цитоплазматические и митотические типы

- Два уровня: компетентный (12) и экспертный (18)
- Выделены типы с окраской митотической пластинки
- Описание и база фотографий представлены на сайте

www.anapatterns.org


Тип свечения на клетках HEp-2
Отрицательный
АС-0
Ядерный
с АС-1 по АС-14, АС-29
Цитоплазматический
с АС-15 по АС-23
Митотический
с АС-24 по АС-28
Гомогенный
АС-1
Гранулярный
АС-2,4,5, 29
Центромерный
АС-3
Точки в ядре
АС-6, 7
Ядрышковый
АС-8,9,10
Ядерная мембрана
АС-11,12
Плеоморфный
АС-13,14
Фибриллярный
АС-15,16,17
Гранулярный
АС-18,19,20
АМА
АС-21
Гольджи
АС-22
Палочки и кольца
АС-23
* Определяется не на всех субстратах
Плотный мелкогранулярный
АС-2
Мелкогранулярный
АС-4
Крупногранулярный
АС-5
Топоизомераза 1
АС-29
Множественные
АС-6
Единичные
АС-7
Гомогенный
АС-8
Глыбчатый
АС-9
Точечный
АС-10
Гладкий
АС-11
Точечный
АС-12
PCNA
АС-13
CENP-F
АС-14
Линейные волокна
АС-15
Фибриллярные филаменты
АС-16
Фибриллярные сегменты
АС-17
С точками
АС-18
Плотный мелкогранулярный
АС-19
Мелкогранулярный
АС-20
NUMA
АС-26
Центросомы
АС-24
Веретено деления
АС-25
Межклеточный мостик
АС-27
Оболочка митотической хромосомы
АС-28
Компетентный уровень
Экспертный уровень
Метафазная пластинка окрашена

Международные рекомендации по выявлению АНА 2014 года

International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies

Nancy Agmon-Levin,[1,2] Jan Damoiseaux,[3] Cees Kallenberg,[4] Ulrich Sack,[5] Torsten Witte,[6] Manfred Herold,[7,8] Xavier Bossuyt,[9] Lucille Musset,[10] Ricard Cervera,[11] Aresio Plaza-Lopez,[12] Carlos Dias,[13] Maria Jose Sousa,[14] Antonella Radice,[15] Catharina Eriksson,[16] Olof Hultgren,[17] Markku Viander,[18] Munther Khamashta,[19] Stephan Regenass,[20] Luis Eduardo Coelho Andrade,[21] Allan Wiik,[22] Angela Tincani,[23] Johan Ronnelid,[24] Donald B Bloch,[25] Marvin J Fritzler,[26] Edward K L Chan,[27] I Garcia-De La Torre,[28] Konstantin N Konstantinov,[29] Robert Lahita,[30] Merlin Wilson,[31] Olli Vainio,[32] Nicole Fabien,[33] Renato Alberto Sinico,[34] Pierluigi Meroni,[35] Yehuda Shoenfeld[1,2,36]

Ann Rheum Dis. 2014 Jan;73(1):17-23

Документ насчитывает 25 рекомендаций:

Рекомендации 1-7: тесты для определения АНА и референтный метод тестирования АНА

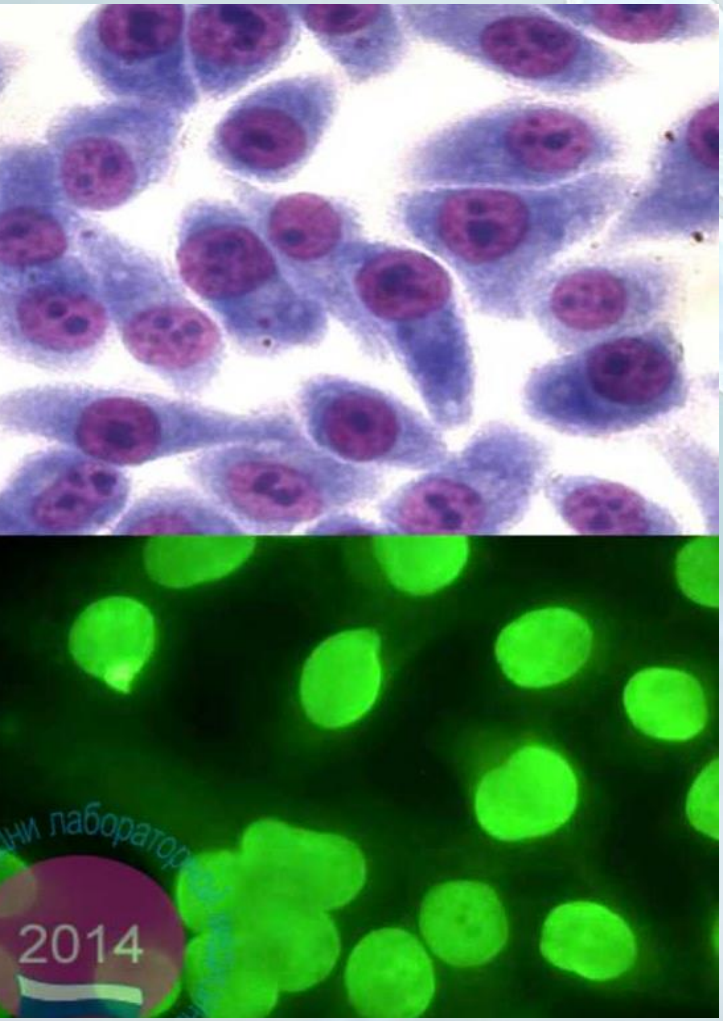
- **Рекомендации 8-13:** методические особенности выявления АНА, типы свечения АНФ
- **Рекомендации 14-15:** определение антител к двуспиральной ДНК
- **Рекомендации 16-25:** определение специфичности АНА

Рекомендации 1-7:

Тесты для определения АНА и референтный метод

1	Диагноз СЗСТ требует нескольких специализированных лабораторных тестов
2	Выявление АНА, анти-дсДНК и антител к ЭНА (специфичностей АНА) следует использовать для диагностики СЗСТ и ряда других аутоиммунных заболеваний
3	Выявление АНФ является первым лабораторным тестом в диагностике СЗСТ
4	Выявление АНФ следует использовать для диагностики, а не мониторинга СЗСТ
5	Непрямая иммунофлюоресценция (АНФ) является референтным методом скринигового выявления АНА. Другие методы выявления АНА могут отличаться по уровню ложных результатов. Если существует клиническое подозрение при отрицательном результате другого метода выявления АНА, следует провести выявление АНФ
6	Диагностические лаборатории должны указывать метод выявления АНА
7	Тесты, основанные на смеси нескольких конкретных ядерных антигенов, не должны называться АНА-тестом или АНА-скринингом

Антинуклеарный фактор на клеточной линии HEp-2: золотой стандарт тестирования (рекомендации ACR ANA Task Force 2008, EULAR EASI 2010)



Эпителиоидная клеточная линия аденокарциномы гортани (ATCC ref.no. CCL-23)

Метод позволяет выявлять все 200 типов антинуклеарных антител

Содержит все человеческие антигены антинуклеарных антител, включая конформационные и нерастворимые

Определение антинуклеарных антител в виде титра

Норма < 1:160, Низкие титры: 1:80-1:160

Средние титры (ремиссия): 1:320-1:640

Высокие титры (обострение): >1:1280

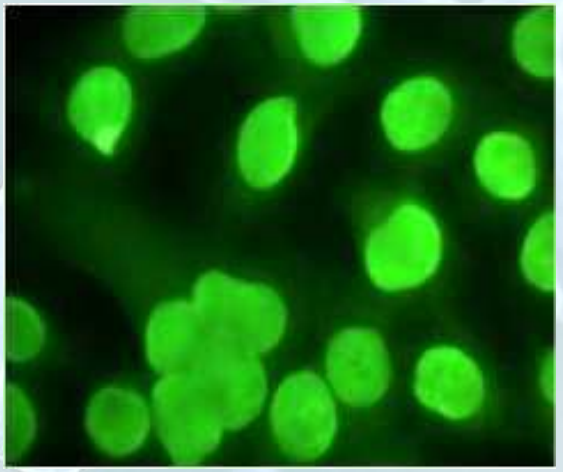
EUROIMMUN

Разработки алгоритма *(Лапин С.В и др. Мед. Иммунол 2011)*

Результат анализа 981 образца Б/М для исключения СЗСТ

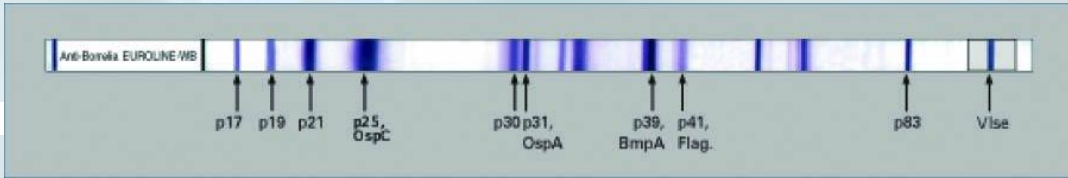
Обследование включало:

- *Антинуклеарный фактор на линии Нер-2*
- *Антитела к экстрагируемому ядерному антигену (SSA+SSB+SM+RNP +Scl70+Jo*
- *Антитела к дсДНК*
- *Иммуноблот антинуклеарных антител*









EUROIMMUN

Рекомендации 8-13

Методические особенности выявления АНА, типы свечения АНФ

8	Лаборатории, которые используют внутри лабораторные методы для выявления АНФ, равно как и антитела к дсДНК и специфическим ЭНА, должны стандартизовать эти методы с помощью международных стандартов (ВОЗ или CDC/IUISJ
9	Для выявления АНФ следует использовать меченную флюорохромом античеловеческую антисыворотку против IgG
10	Титр АНФ зависит от реактивов, оборудования и других факторов, поэтому разведение для скрининга сыворотки следует определять в лаборатории. Повышенный АНФ следует считать титр выше 95-го перцентиля контролен из здоровой популяции. В большинстве случаев
	разведение сыворотки 1:160 достаточно для выявления АНФ во взрослой популяции
11	В случае положительного результата выявления АНФ в результате лабораторного теста должен быть указан **тип свечения клетки и наивысший титр разведения сыворотки**
12	Тип АНФ следует указывать в соответствии со стандартной терминологией
13	Кроме типов свечения ядра АНФ должны указываться свечения цитоплазмы и делящихся клеток

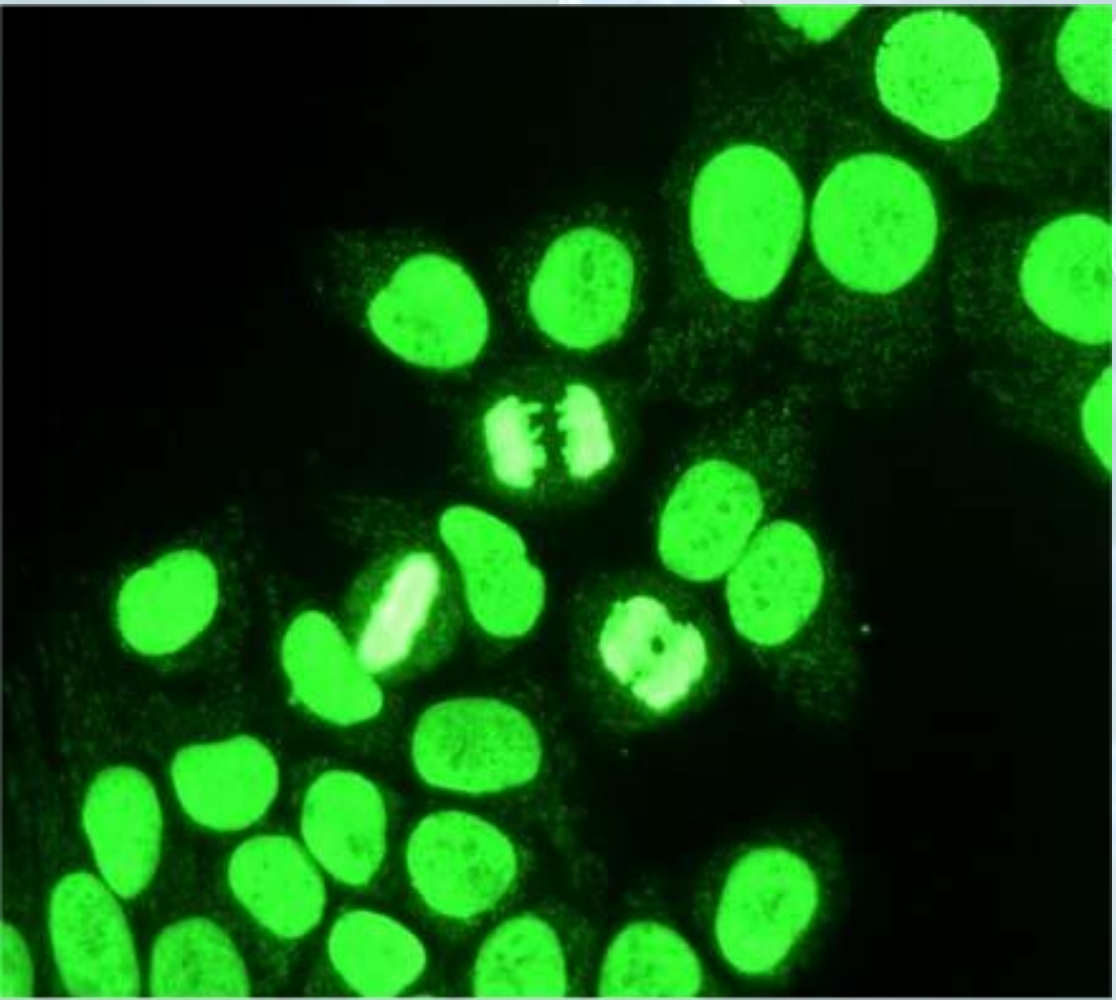
Типы свечения ядра и цитоплазмы на клеточной линии HEp2, аутоантигены и заболевания

Тип свечения		Основной антиген(ы)	Заболевания
Нуклеарный	Гомогенный	дсДНК, гистоны, нуклеосомы	СКВ, ЮРА
	Крупногранулярный	RNP, RNP/Sm	СЗ, СКВ, СС
	Мелкогранулярный	SSA, SSB, Topo-1, другие антигены	СКВ, СС, СШ, ВМ, СЗ
	Центромерный	CENT-A, B, C	СС, синдром Рейно
	Ядрышковый	PM/Scl, RNA-Pol	СС, ВМ, синдром Рейно
Цитоплазматический	Диффузный	RibP, Jo-1	СКВ, ВМ
	Гранулярный	Jo-1, PDH/AMA-M2	ПБЦ, ВМ
Редкий нуклеарный	Периферический/ядерная мембрана Плотный мелкогранулярный Пролиферирующие клетки (PCNA)	Точки в ядре Центросома/ центриоли Веретено деления	
Редкий цитоплазматический	Отдельные гранулы Комплекс Гольджи	Цитоскелет клетки	

Примечаний ВМ — воспалительные миопатии, **ПБЦ—** первичный билиарный цирроз, СЗ — смешанное заболевание соединительной ткани, **СКВ —системная** красим волчанка, СС — системный склероз, СШ — синдром Шегрена, **ЮРА —** ювенильный ревматоидный артрит.

Био-лайн

Гомогенный тип свечения



Заболевания:

- ✓ **СКВ**
- ✓ **лекарственная СКВ**
- ✓ **аутоиммунный гепатит**
- ✓ **склеродермия**

Основные антигены:

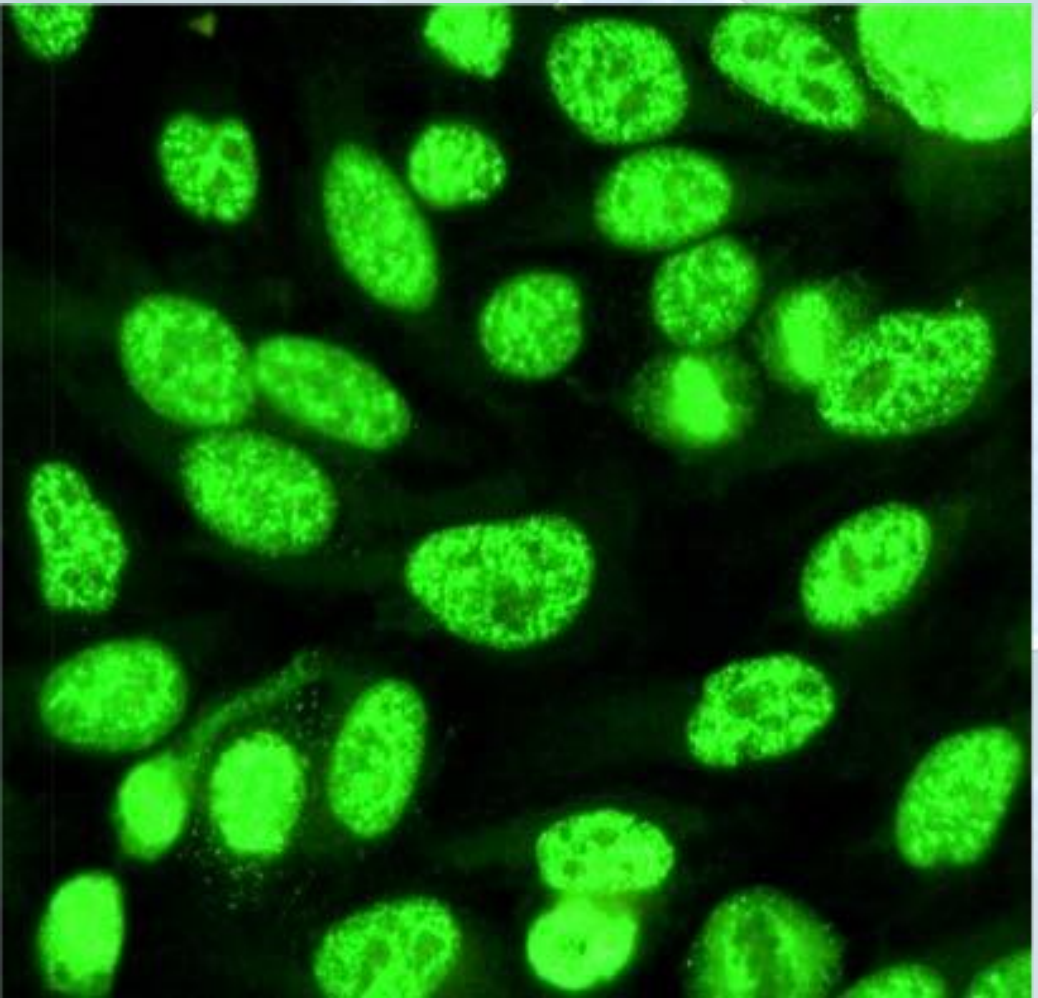
- ✓ дсДНК - 50%
- ✓ гистоны - 30%
- ✓ нуклеосомы - 60%

Встречаются:

- ✓ RNP/Sm 10%
- ✓ SSA 60 - 20%
- ✓ SSA 52 - 25%

Био-лайн

Гранулярный тип свечения



Заболевания:

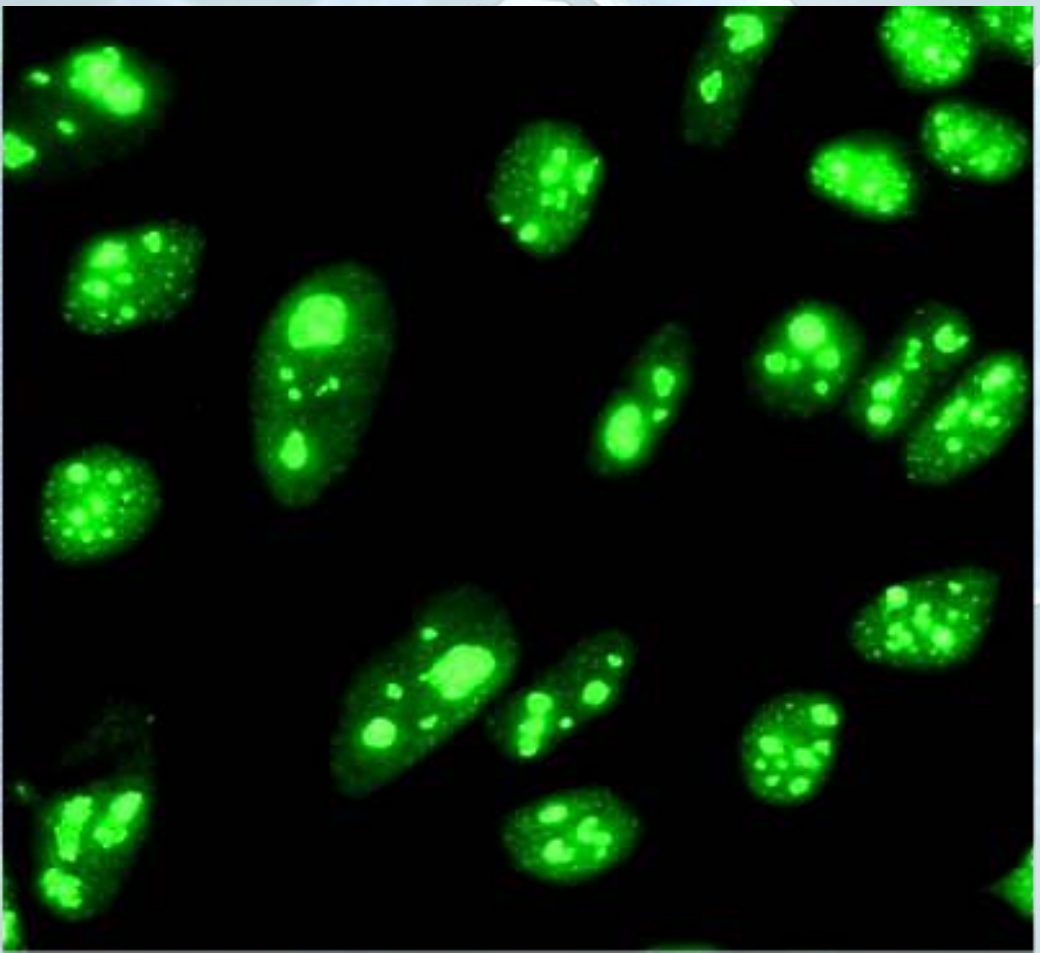
- ✓ **кожная КВ**
- ✓ **СЗСТ**
- ✓ **с-м Шогрена**
- ✓ **РА**

Основные антигены:

- ✓ RNP - 60%
- ✓ Sm - 30%
- ✓ SSA 60 - 20%
- ✓ SSA 52 - 40%
- ✓ SSB - 20%

Био-лайн

Ядрышковый тип свечения



Заболевания:

- ✓ **диффузная склеродермия**
- ✓ **дерматомиозит**

Основные антигены:

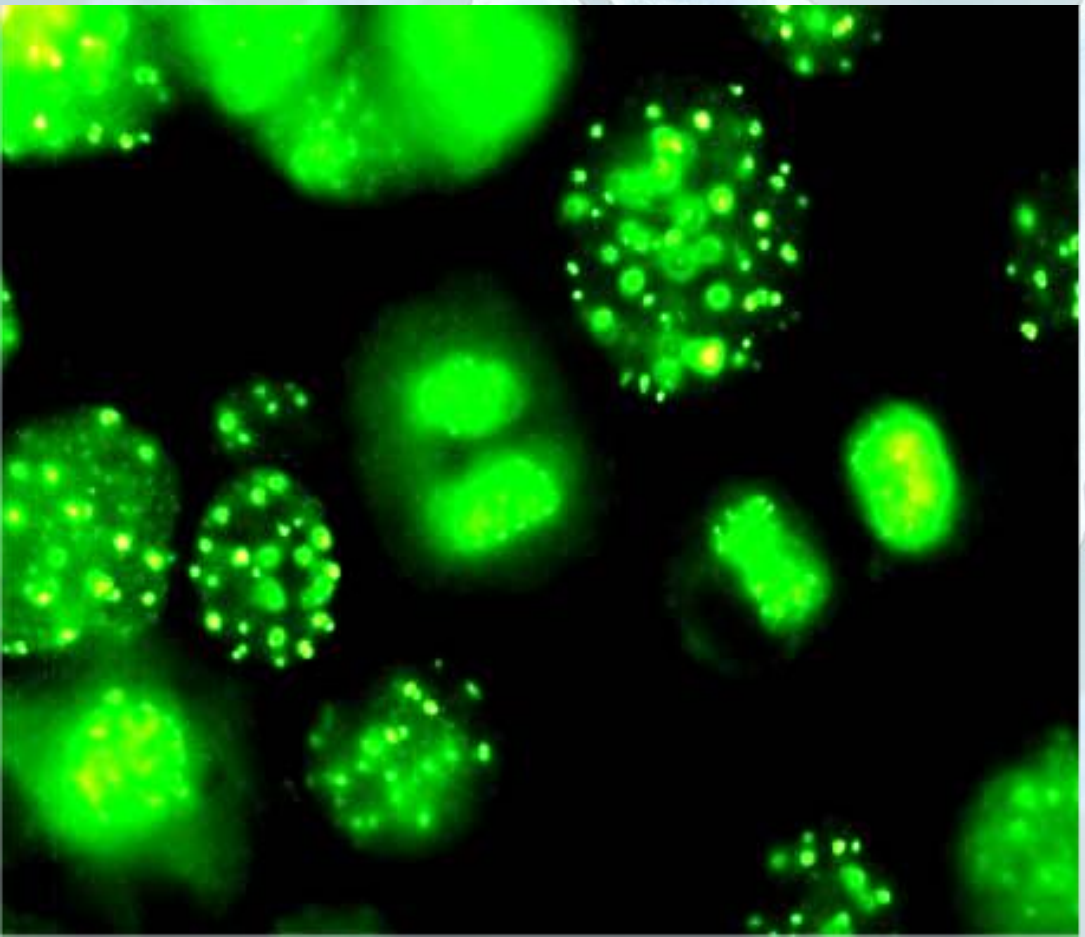
- ✓ Scl70 4/10
- ✓ PM-Scl 1/10

Встречаются:

- ✓ SSA 52 – 3/10

Био-лайн

Центромерный тип свечения



Заболевания:

- ✓ **Диффузная склеродермия**
- ✓ **CREST синдром**

Основные специфичности:

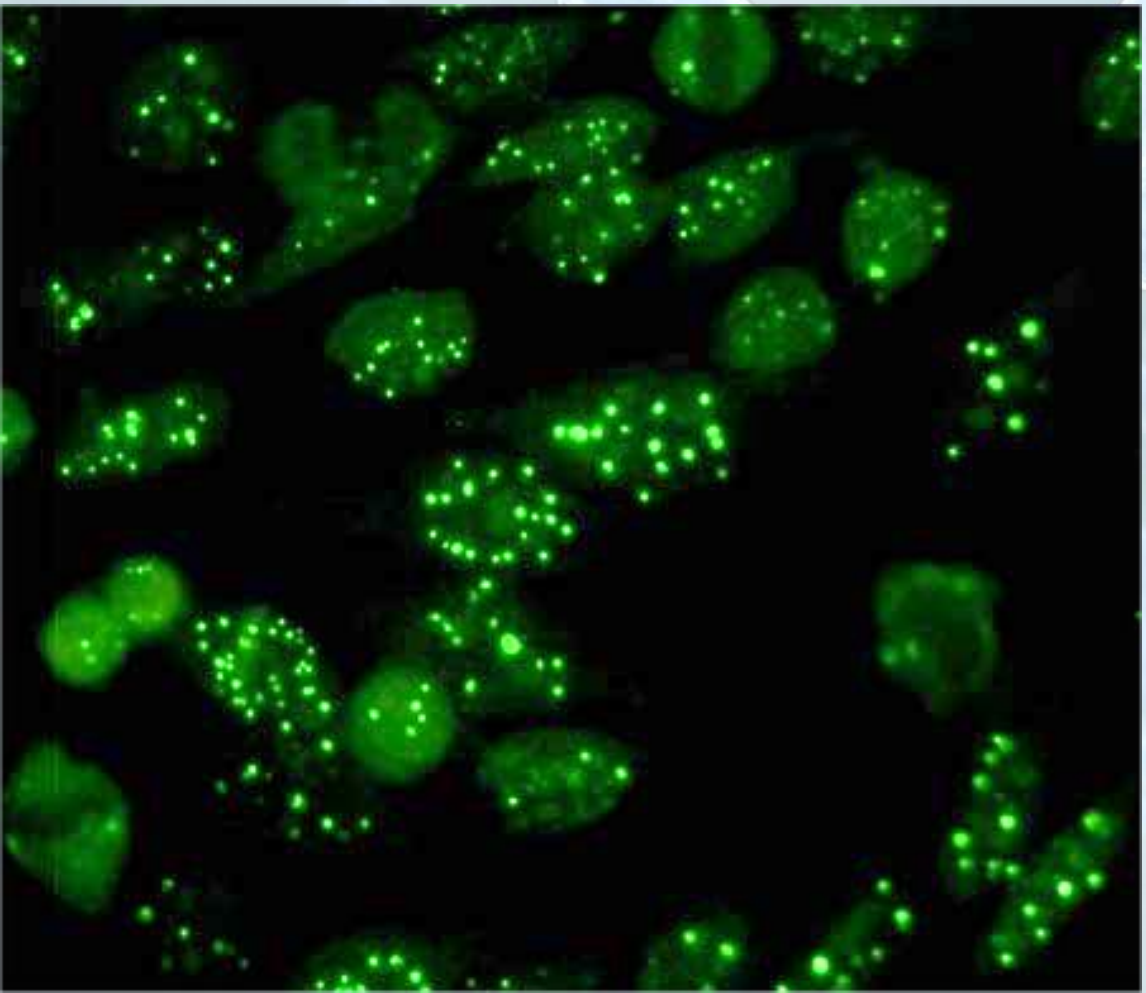
- ✓ Cent B 95%
- ✓ Scl70 20%

Другие:

- ✓ PM-Scl 1/12 SSA 52 3/12

Био-лайн

Точки в ядре (nuclear dots)



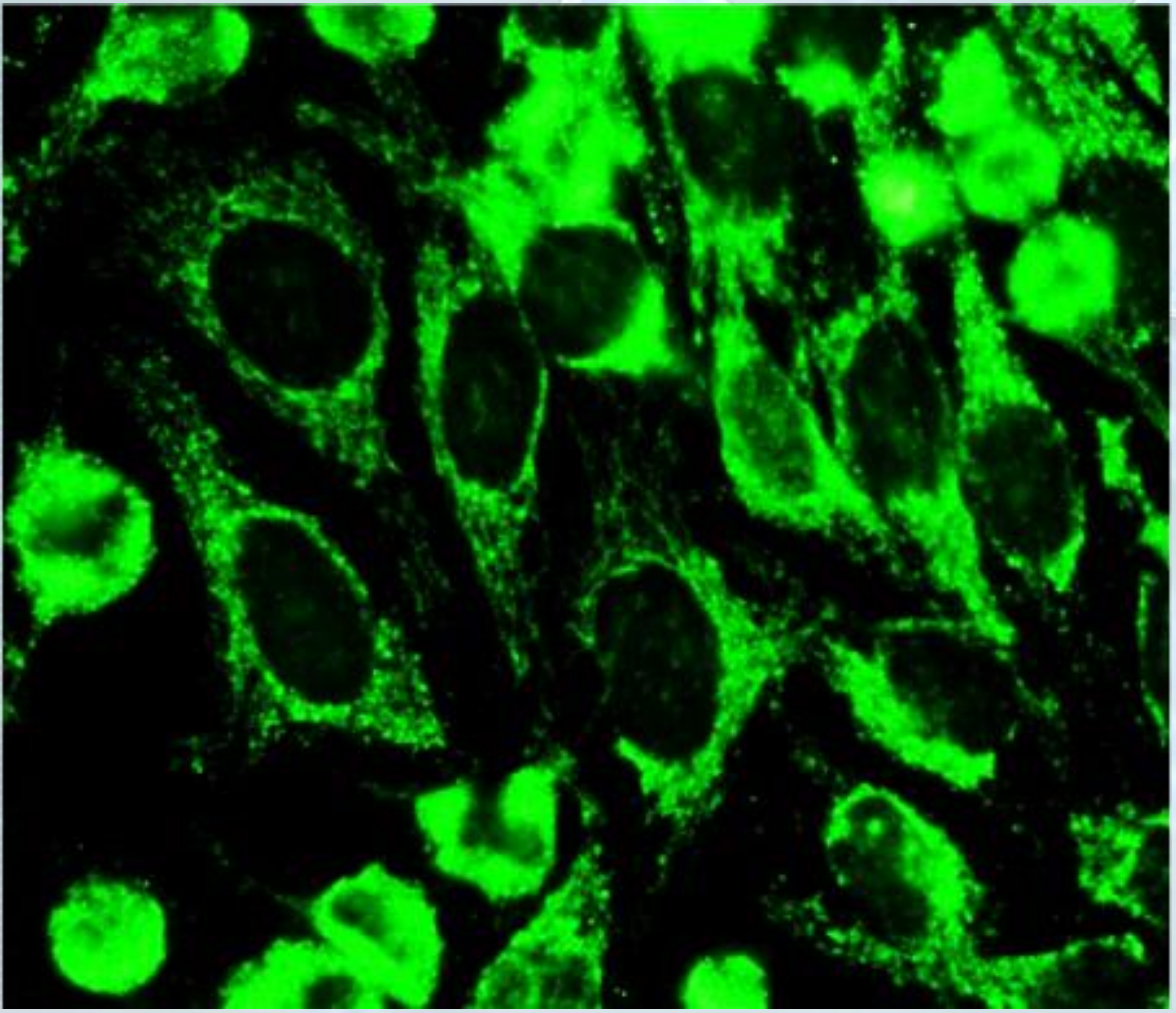
Основные специфичности:

- ✓ sp100 – 80%
- ✓ PML – 30%

Наиболее часто встречается при аутоиммунных заболеваниях печени

Био-лайн

Цитоплазматический тип свечения



Подразделяют на свечение:

- ✓ митохондрий
- ✓ цитосклета
- ✓ органелл

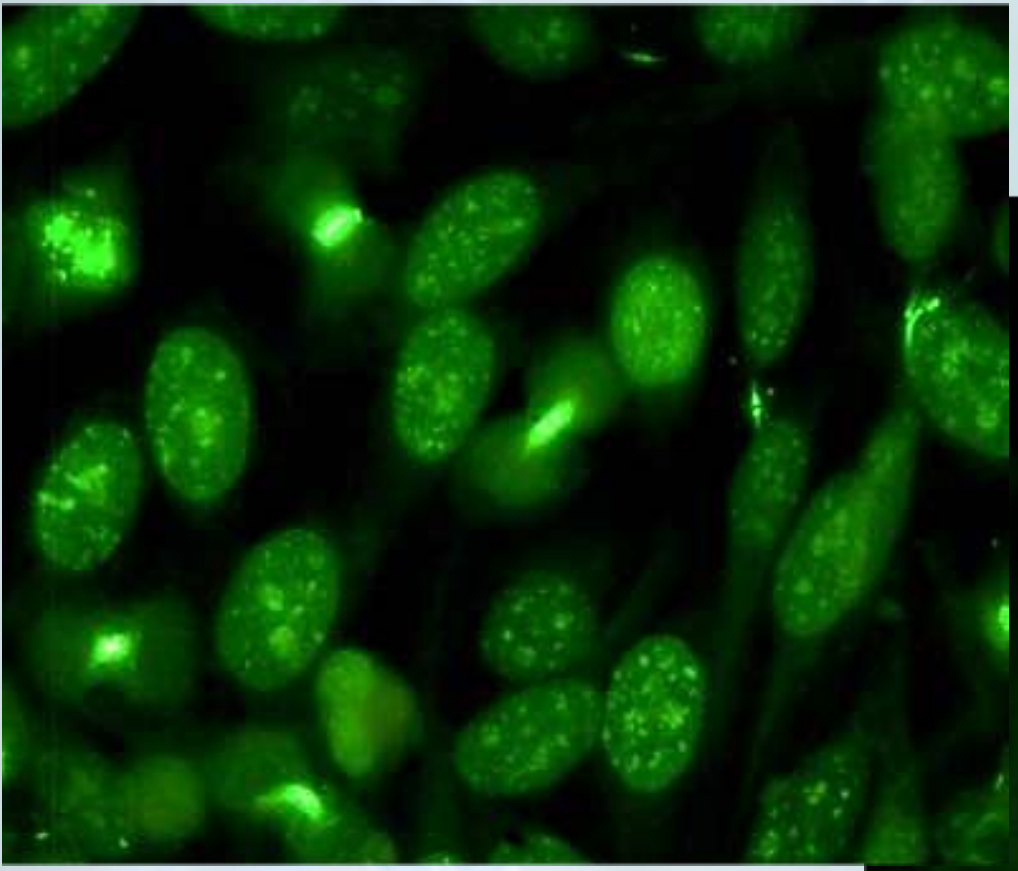
Основные специфичности:

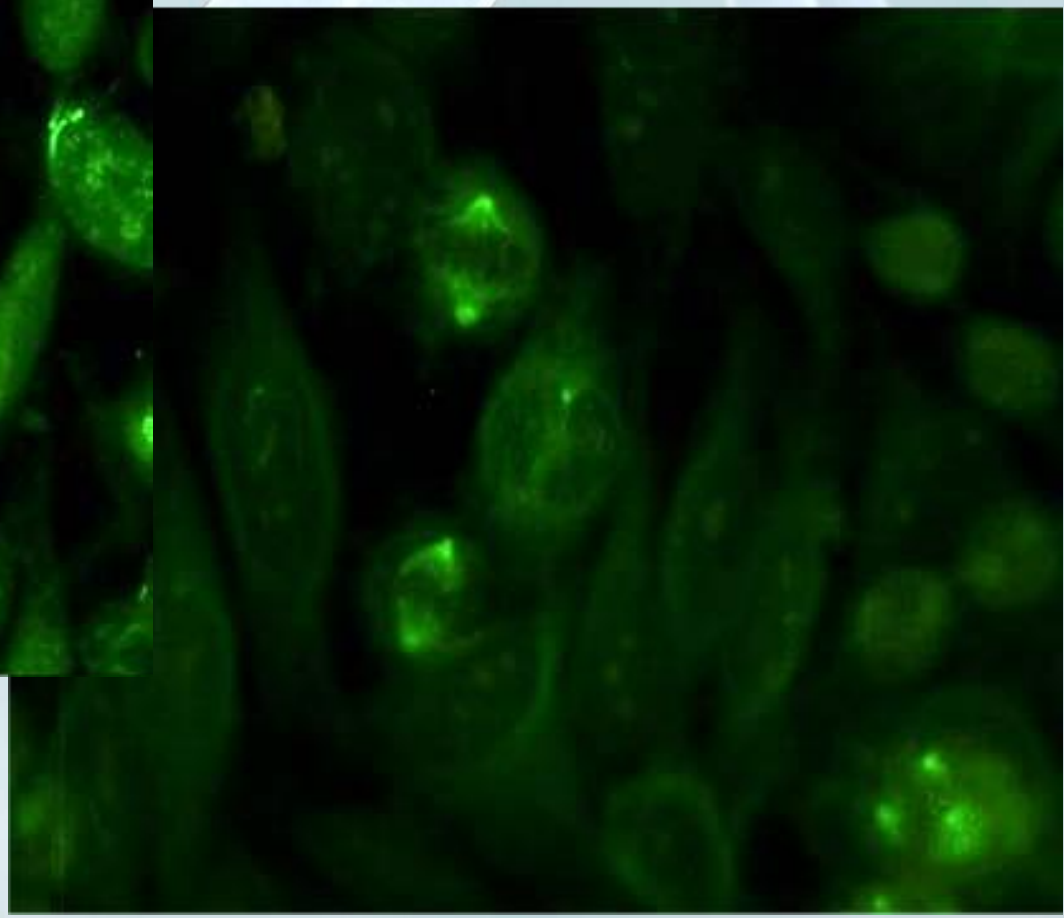
- ✓ AMA M2 – 40%
- ✓ F-актин – 25%
- ✓ RiboP – 20%
- ✓ Jo-1 – 10%

Наиболее часто встречается при аутоиммунных заболеваниях печени

Био-лайн

Веретено деления – редкие типы без самостоятельного клинического значения





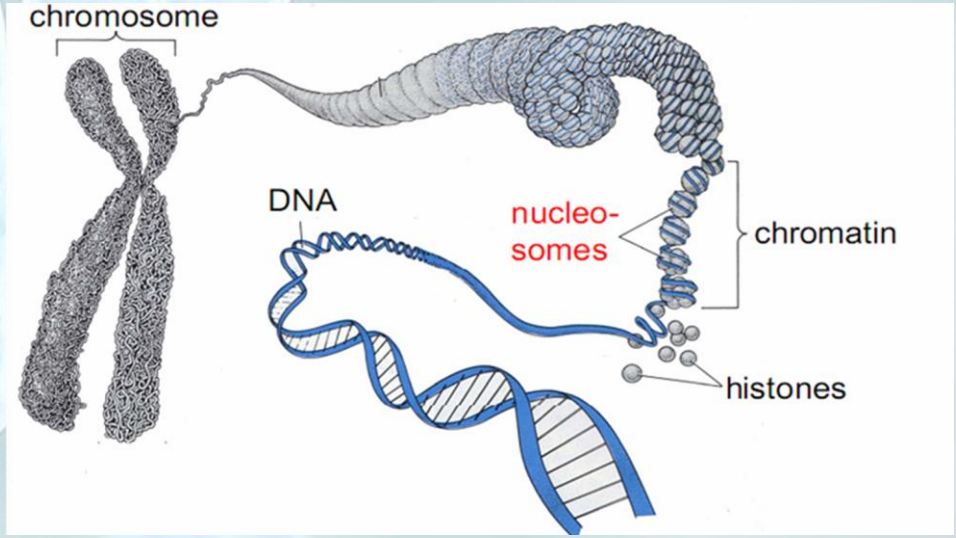
ТИП СВЕЧЕНИЯ	ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ
Гомогенный (Диффузный)	СКВ, нефрит, лекарственная волчанка склеродермия
периферический	Аутоиммунные заболевания печени
Мелкогранулярный	Неспецифичен, ревматические заболевания, ревматоидный артрит, инфекции и онкология, норма
Крупногранулярный	Смешанное заболевание соединительной ткани
Ядрышковый	Склеродермия/Полимиозит
Центромерный	Склеродермия
Цитоплазматический	Неспецифичен, за исключением митохондриальных антител СКВ,
рибосомальный/синтетазный	полимиозит
митохондриальный	Билиарный цирроз
цитофиламенты	Аутоиммунные заболевания печени
Точки в ядре (MND/FND)	Аутоиммунные заболевания печени
PCNA	СКВ, нефрит
Веретено деления/центриоли	Неспецифичены

Антитела к двуспиральной ДНК

- играют роль в поражении почек при СКВ и являются ее основным серологическим маркером
- отмечаются у 30-60% больных СКВ в зависимости от специфичности тест-системы
- ДНК – “-” заряжена, плохо связывается с пластиком
- при использовании ИФА одновременно выявляются антитела к осДНК и дсДНК – ИФА тест системы отличаются между собой
- антитела к осДНК низкоспецифичны
- клиническое значение имеет определение антител класса IgG

Антитела к гистонам и нуклеосомам

- Ядро нуклеосомы — H1, H2A/B, H3, H4 — основные мишени H1 и H2B
- Отмечаются при лекарственной волчанке, склеродермии, аутоиммунном гепатите
- При лекарственной волчанке появляются на фоне лечения и исчезают в течении 0,5 года после отмены
- Нуклеосомы представляют основную иммунологическую мишень при СКВ
- Отмечаются у 50-60% больных СКВ, очень специфичны, могут использоваться совместно с антителами к дсДНК в диагностики СКВ



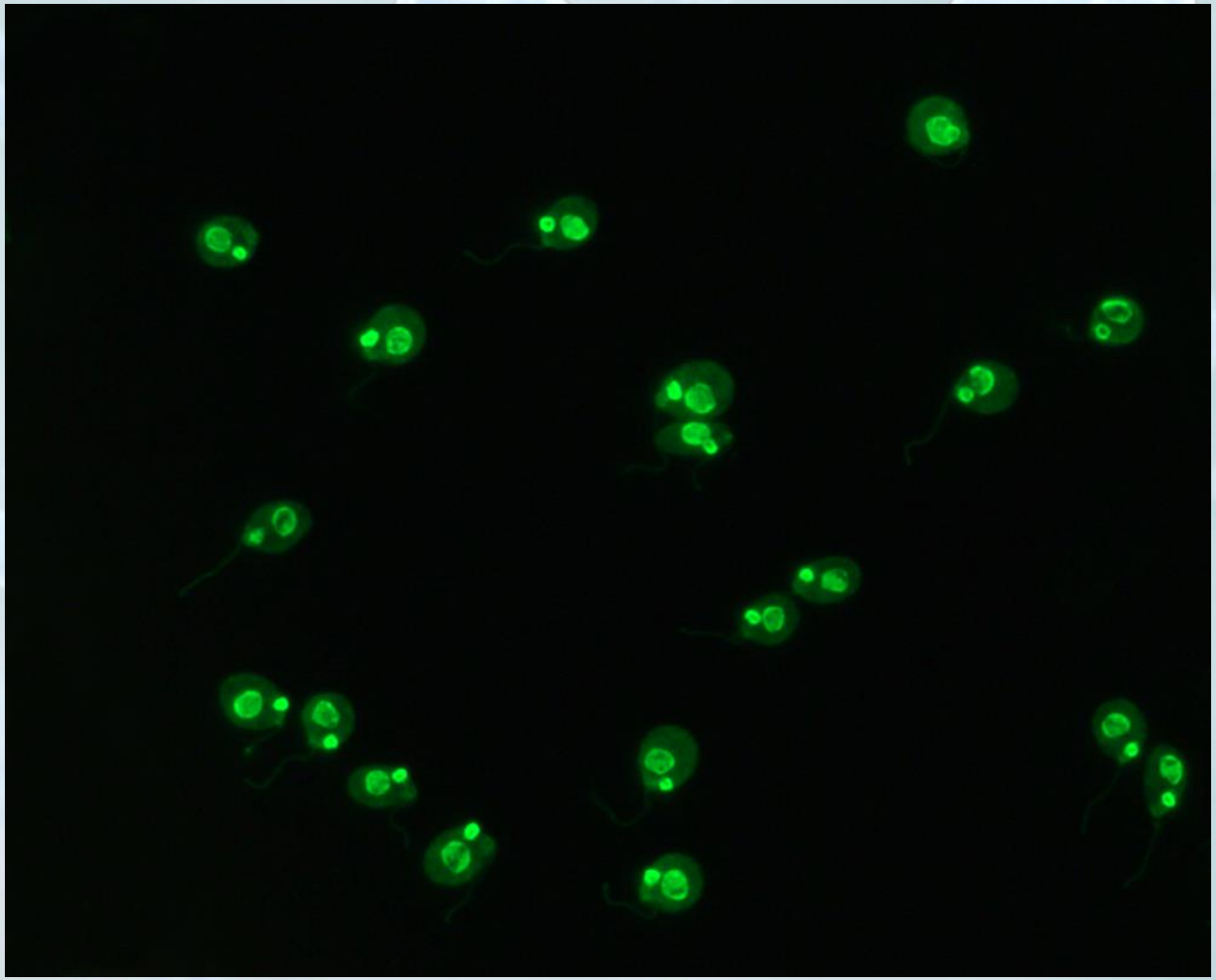
Рекомендации 14-18

Выявление антител к дсДНК

14	**При обнаружении АНФ и клиническом подозрении на СКВ следует рекомендовать выявление антител к дсДНК**
15	**При выявлении антител к дсДНК наилучшую специфичность имеют радиоиммунный тест (тест Фарр/Farr) и непрямая иммунофлюоресценция на *Crithidia* luciliae(CLIFT). Положительные результаты других тестов следует подтверждать этими методами**
16	**Метод, используемый для выявления антител к дсДНК, следует указывать в форме результата лабораторного теста**
17	**Результат выявления антител к дсДНК должен предоставляться в количественном виде**
18	**При мониторинге СКВ с помощью количественного измерения антител к дсДНК должен использоваться один и тот же лабораторный метод**

Био-лайн

Выявление высокоаффинных антител к дсДНК на кинетопласте *Crithidia luciliae*



Рекомендации 19-25: Определение специфичности АНА

19	В случае положительного результата АНФ, следует использовать лабораторные тесты для определения специфичности АНА
20	Для выявления антител к ЭН А следует указывать метод выявления. В случае расхождения с результатами АНФ или клинической картиной, рекомендуется использование альтернативного метода выявления антител
21	Результаты определения специфичности антител к ЭНА следует указывать отдельно (включая отрицательный результат выявления антител). При интерпретации результатов скрининговых тестов выявления антител достаточно указать какие разновидности ЭНА присутствуют в составе тест-системы
22	При подозрении на смешанное заболевание соединительной ткани рекомендуется количественное определение антител к RNP
23	В случае подозрения на конкретное СЗСТ следует проводить углубленное исследование конкретной специфичности АНА. Например, антител к Jo-1 при воспалительных миопатиях, антител к рибосомам и SS-A антигену при различных формах волчанки и синдроме Шегрена
24	Каждая лаборатория должна верифицировать референтные пределы скрининговых методов выявления АНА с помощью сывороток здоровых лиц известного пола и возраста. Референтные пределы должны быть сопоставлены с 95 перцентилем результатов измерений в сыворотках здоровых лиц.
25	Каждая лаборатория должна верифицировать (подтвержать) референтные значения методов выявления антител к дсДНК и антител к ЭНА. Следует использовать достаточное количество образцов от пациентов с разными аутоиммунными

Био-лайн

Антитела к дсДНК и нуклеосомам в диагностике СКВ

- ✓ Антитела к НКС выявлялись преимущественно у больных с поражением почек (85%) и цитопениями (75%)
- ✓ Использовать анти-НКС и анти-дсДНК для выявления больных СКВ с тяжелым течением волчанки
- ✓ Могут использоваться для диагностики СКВ при выявлении высоких титров АНФ

Био-лайн

Антитела к экстрагируемому нуклеарному антигену — extractible nuclear antigen - ENA

- ✓ Исторически ЭНА использовался в методе преципитации в геле для описания различных специфичностей антител
- ✓ При использовании тотального экстракта ЭНА в методе ИФА специфичность низка (много прекрестных реакций)
- ✓ В ИФА системах используют смесь очищенных/рекомбинантных антигенов (не содержит ДНК/РНК)
- ✓ Ограниченный набор обусловлен сложностью сенсибилизации ИФА планшета антигенами — разная сорбция антигенов, образование неоантигенов — низкая чувствительность и специфичность
- ✓ Обычно качественный результат - индекс
- ✓ **Изолированное определение антител к ЭНА обладает плохими параметрами для диагностики системных заболеваний – нет многих антигенов**

Тесты для определения антител к ДНК

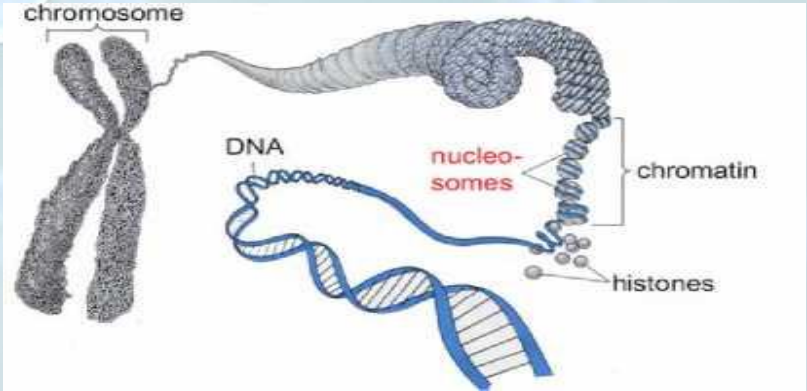
Антитела к двуспиральной ДНК (нативной)- маркер СКВ, антитела к односпиральной ДНК (денатурированной) - неспецифичны

- Сорбция антигена на пластике является слабым местом всех ИФА тест-систем для выявления анти-дсДНК
- Традиционные методы сорбции ДНК: поли-Ь-лизин, протамин-сульфат, авидин-биотин

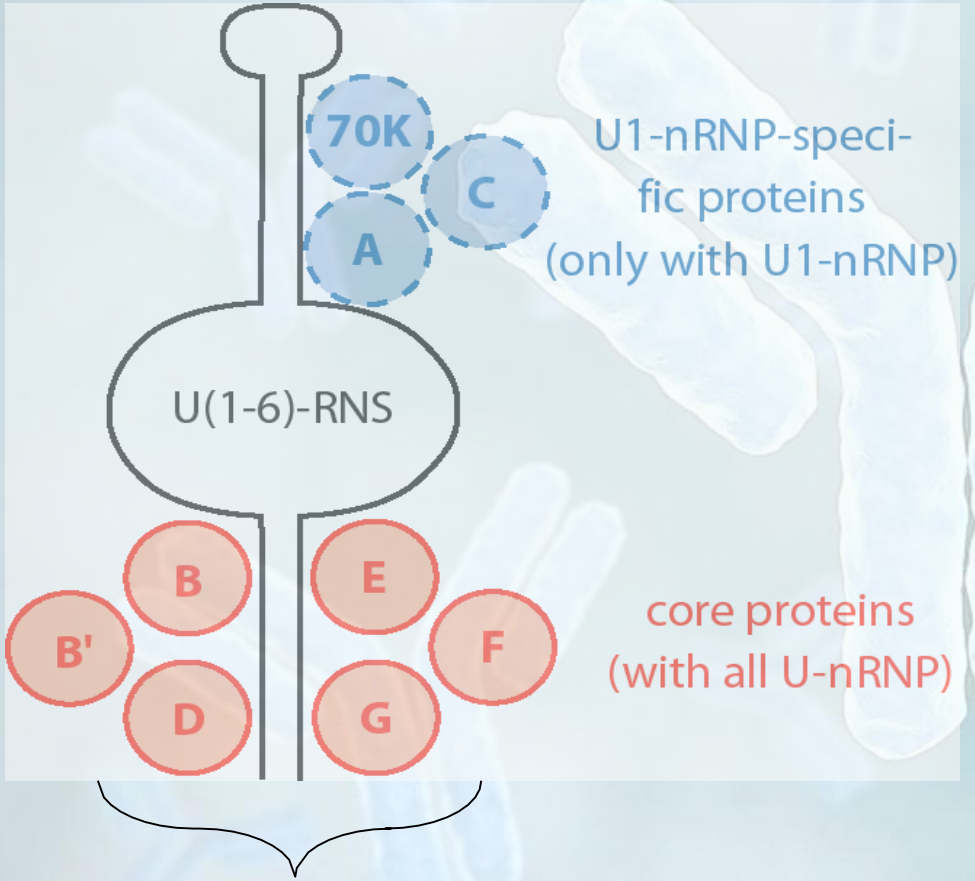
- ИФА обладает низкой специфичностью, при этом чувствительность 40%

Тест **dsDNA-NcX** для выявления антител к дсДНК - дсДНК сорбирована на нуклеосомах - увеличение чувствительности с 30-40% до 60-70% при СКВ при сохранении высокой специфичности

при сохранении высокой специфичности

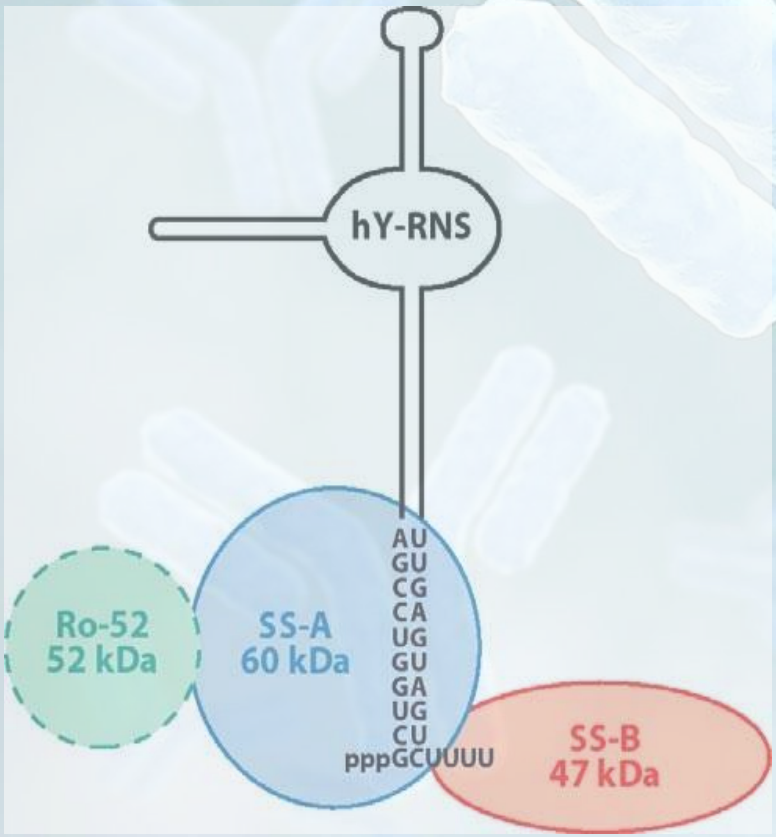


Антитела к рибонуклеопротеинам (RNP-Sm комплекс)



- ✓ Крупные ядерные гранулы — крупногранулярный тип свечения ядра
- ✓ состоит из комплекса нуклеиновой кислоты (РНК) и белков, составляющих антигены RNP (U1-RNP) в оболочкеи Sm — антиген в серцевине
- ✓ Sm — встречается изолировано -основной маркер СКВ
- ✓ U1-RNP — встречаются совместно с Sm — основной серологический маркер смешанного заболевания соединительной ткани
- ✓ Sm-антиген

Антитела к рибонуклеопротеинам: SSA/SSB комплекс



Мелкогранулярный тип свечения — наиболее частый

- ✓ Антигены растворимы —
- ✓ утрачиваются из HEp2 клеток
- ✓ 3 антигена:
  - ✓ SSA 52 kDa — Ro 52
  - ✓ SSA 60 kDa — Ro 60
  - ✓ SSB - La
- ✓ SSA 52 — наиболее частое АНА, неспецифичный, маркер большинства аутоиммунных заболеваний
- ✓ SSA 60 — изолировано — СКВ, совместно с SSB — синдром Шегрена

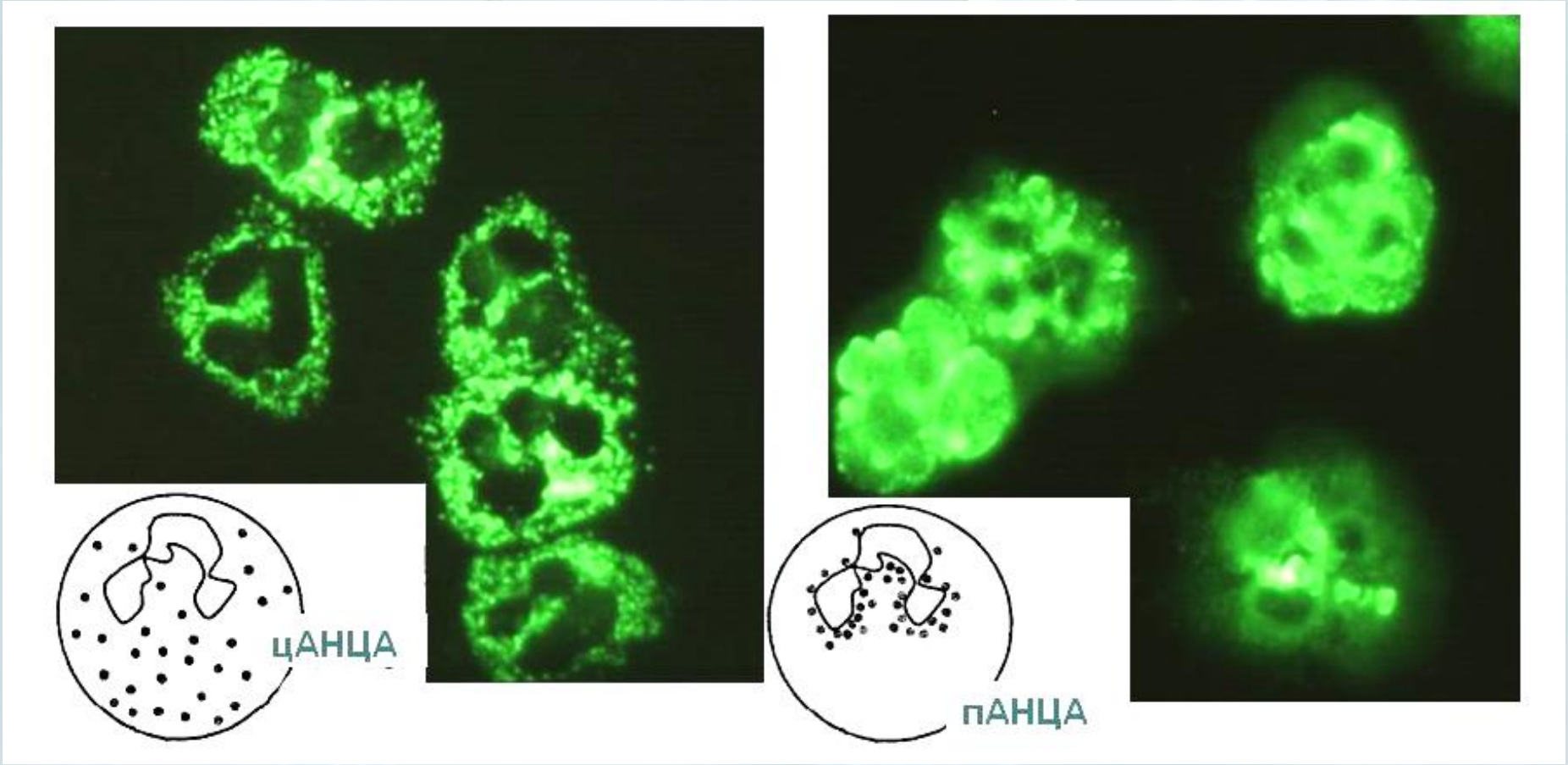
Био-лайн

Другие рибонуклеопротеины

- Scl-70 — фрагмент топоизомеразы-1 — маркер диффузной склеродермии
- CENT A,B,C - центромеры - CREST синдром
- PCNA- белок циклин p32 — маркер СКВ
- RiboP — белок рибосом— нейролюпус
- Белок Ku — белки ядерного матрикса — СКВ
- Белки ядрышка — PM-Scl, фибриллярин,NOR —
- склеродермия
- Jo-1 - тРНК-синтетазы — полимиозит
- Mi2 — 240 кДа белок ядра - дерматомиозит

Био-лайн

Антинейтрофильные цитоплазматические антитела



Био-лайн

Антигенная специфичность основных типов АНЦА и приблизительная частота их обнаружения

цАНЦА	Протеиназа-3	90%
	Миелопероксидаза	5%
	Белок BPI	4%
пАНЦА	Миелопероксидаза	70%
	Лактоферрин	10%
	Эластаза	8%
	Катепсин G	5%
	Протеиназа-3	2%
хАНЦА	Лактоферрин	10%
	Эластаза	10%
	Неуточненные антигены	

Системные васкулиты

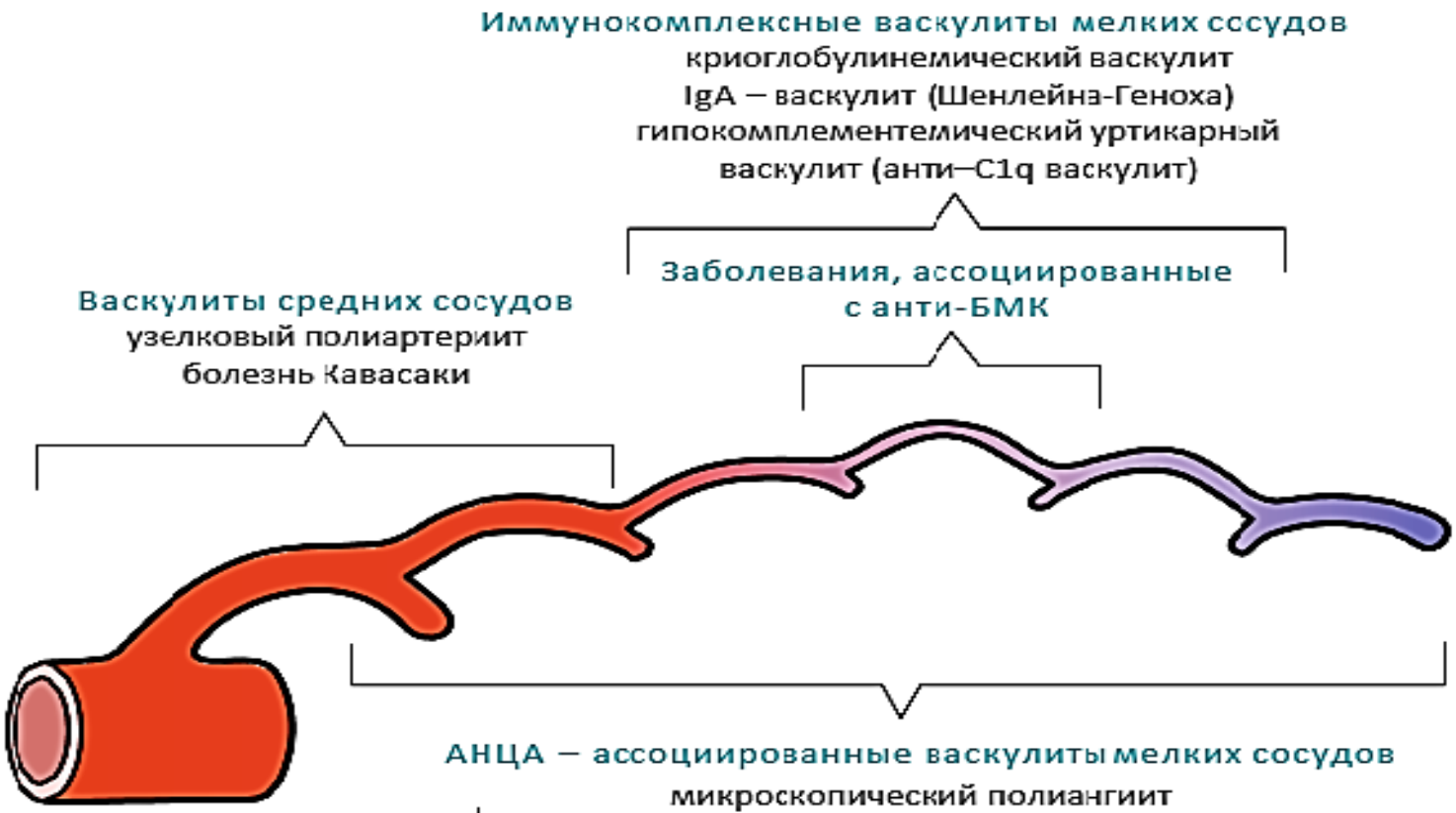
Системные васкулиты (СВ) – гетерогенная группа заболеваний, основным морфологическим признаком которых является воспаление сосудистой стенки, а клинические проявления определяются типом, калибром, локализацией пораженных сосудов и тяжестью иммуновоспалительных изменений.

- **Современная классификация СВ**, принятая в 2012 г на Согласительной Конференции в Чэпел Хилле (Chapel Hill, USA), выделяет основные группы СВ, в первую очередь, в зависимости от калибра преимущественно пораженных сосудов (крупные, средние, мелкие) и по возможности учитывает особенности иммунных механизмов

Системные васкулиты

Био-лайн

Chapel Hill Consensus Conference 2012



Основные группы СВ (Согласительная Конференция в Чэпел Хилле, 2012 г)

Иммуноблоттинг

Иммуноблоттинг (иммуноблот)

Метод выявления антител к отдельным антигенам

Основан на постановке ИФА на нитроцеллюлозных мембранах, на которые предварительно в виде отдельных полос нанесены специфические белки-антигены

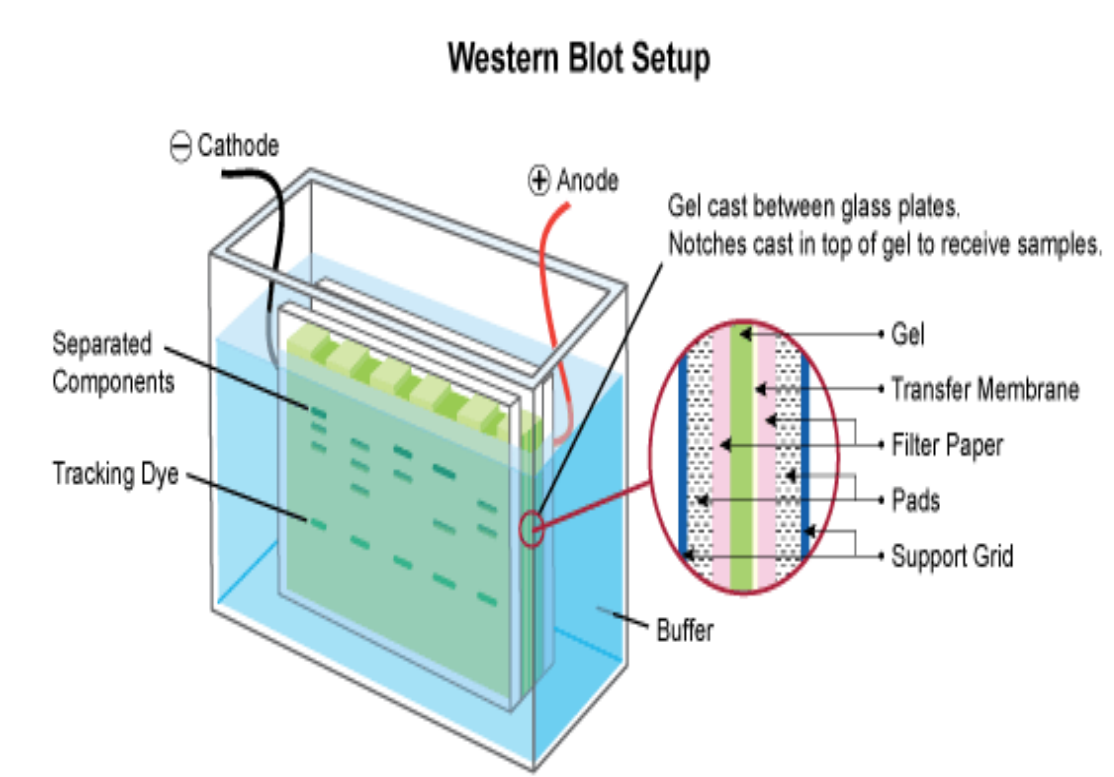
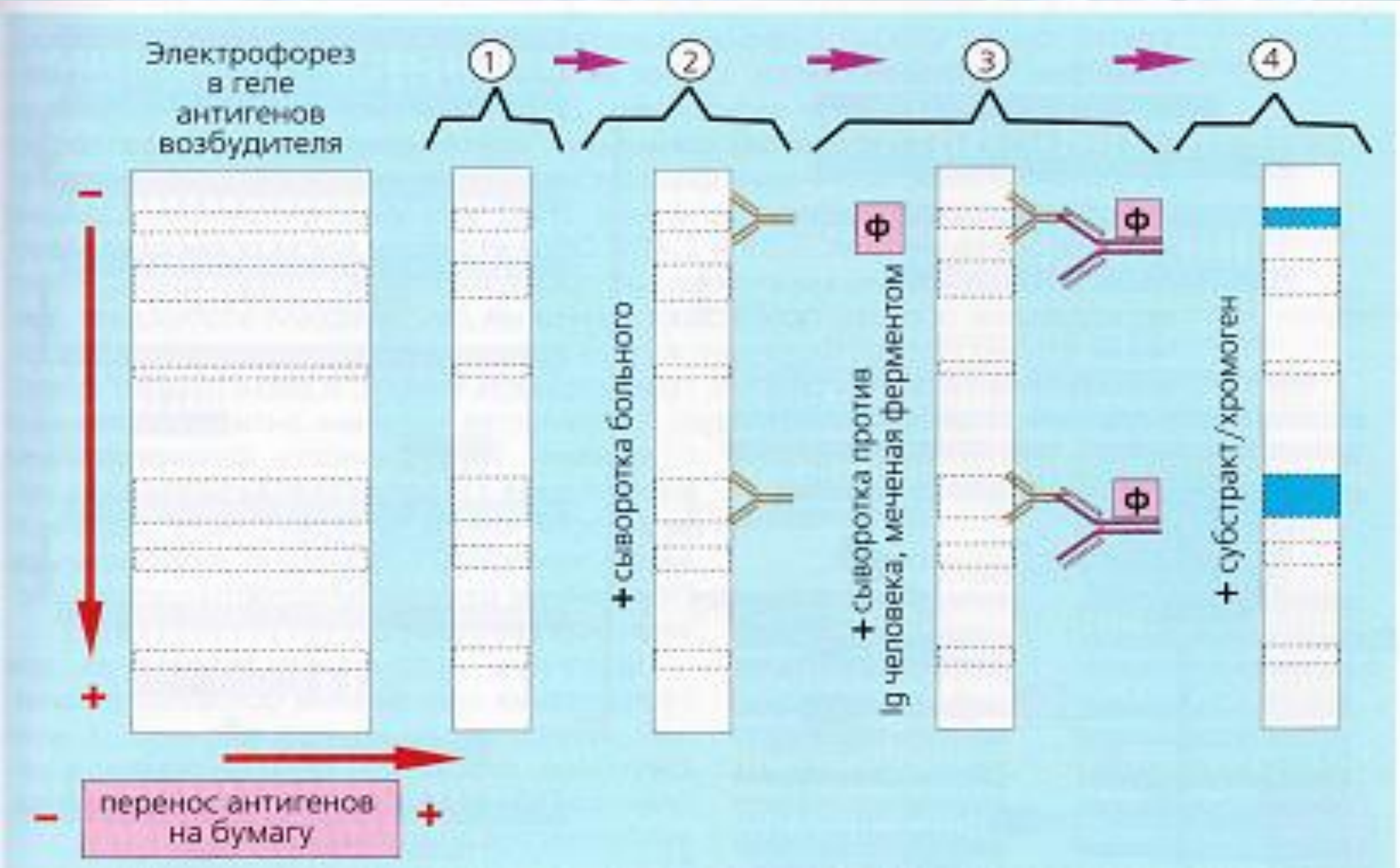


Diagram 1: *Illustration of Western Blot Setup.*

Схема иммуноблота



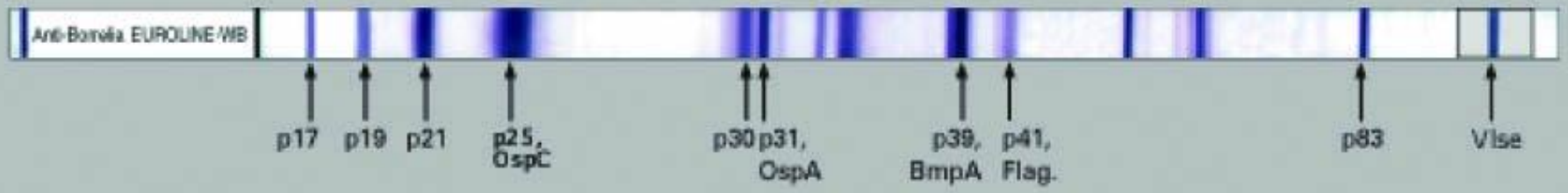
Био-лайн

Иммуноблоттинг (иммуноблот)

Преимущество техники иммуноблота

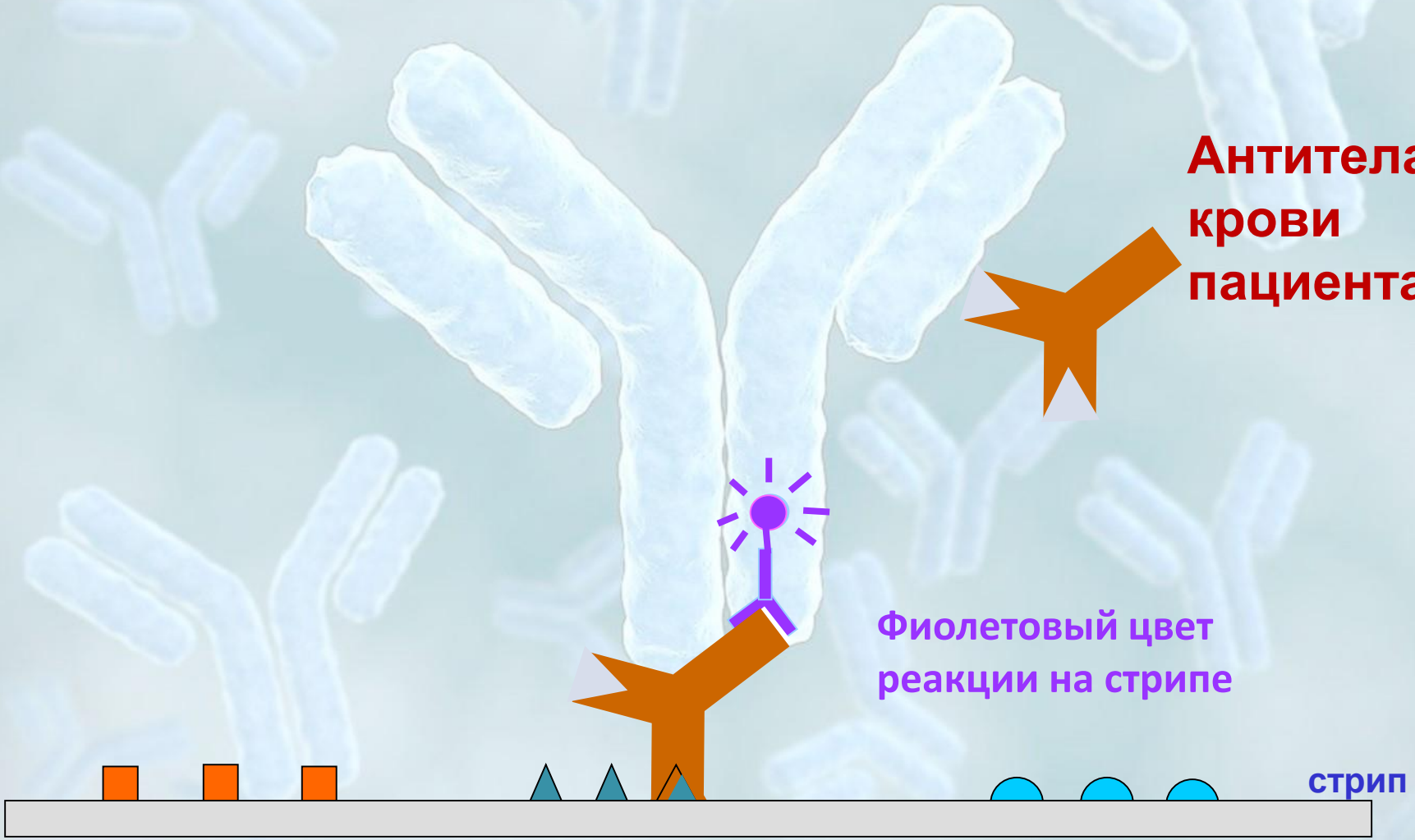
Возможность получить более специфические (по сравнению с ИФА) результаты, т.к. определяется наличие специфических антител к каждому клинически значимому антигену

- **Уникальность :** высокая информативность и достоверность получаемых результатов
- **Специфичность и чувствительность метода 99-100%**

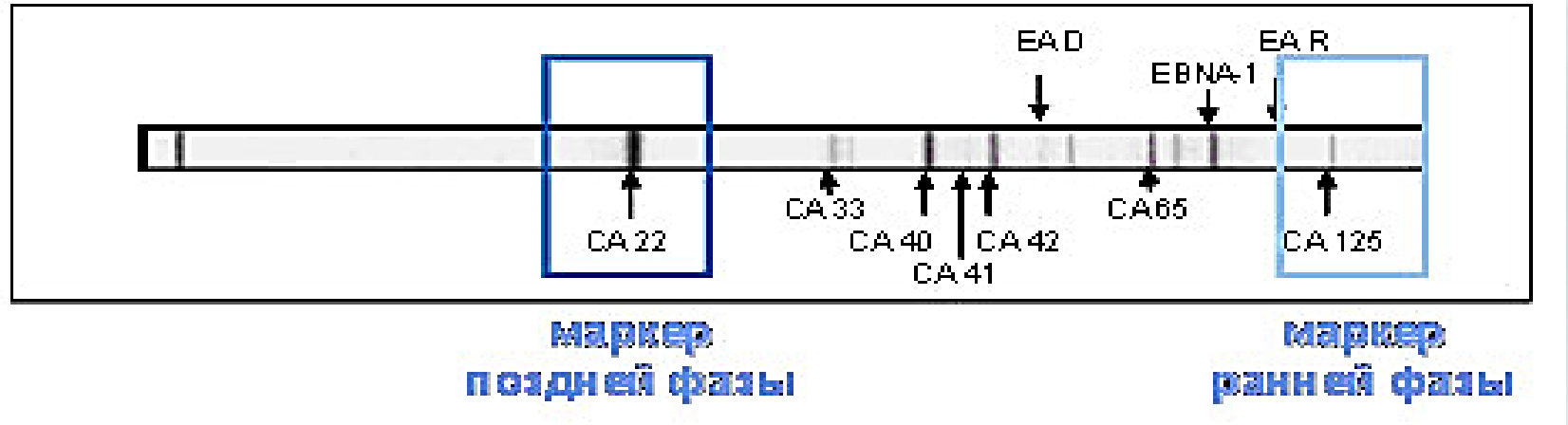


Био-лайн

Принцип метода иммуноблоттинга



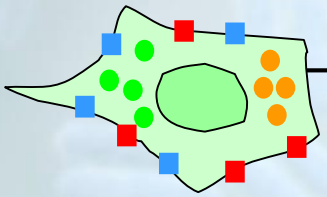
Вестерн-блот



Вестерн-блот для диагностики ВЭБ-инфекции

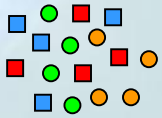
стрипы-мембраны с электрофоретически разделенными нативными антигенами соответствующих инфекционных агентов

Био-лайн



Клетка
(с белками)

гомогенизация



Микс белков



Изолирование белков



методом ВЭЖХ



Отдельные белки

Нанести на стрипы



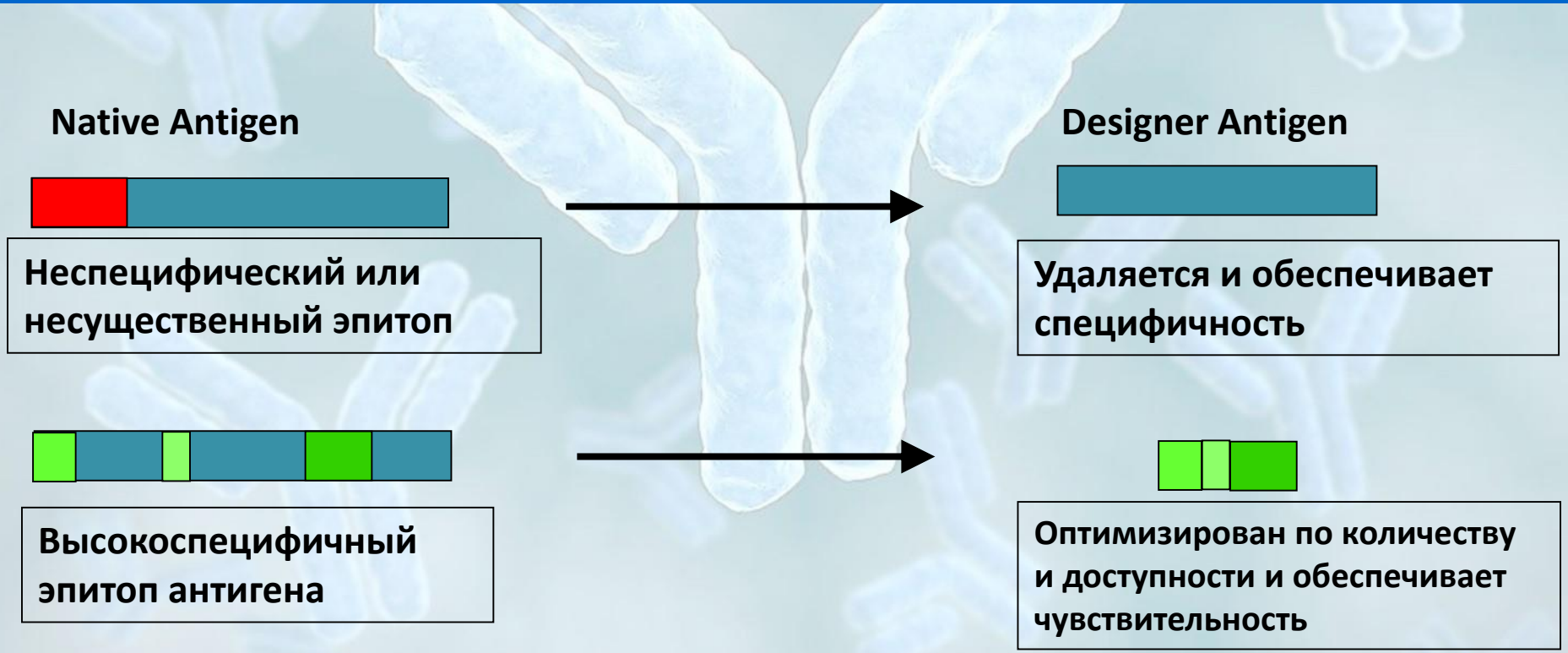
Lineblot

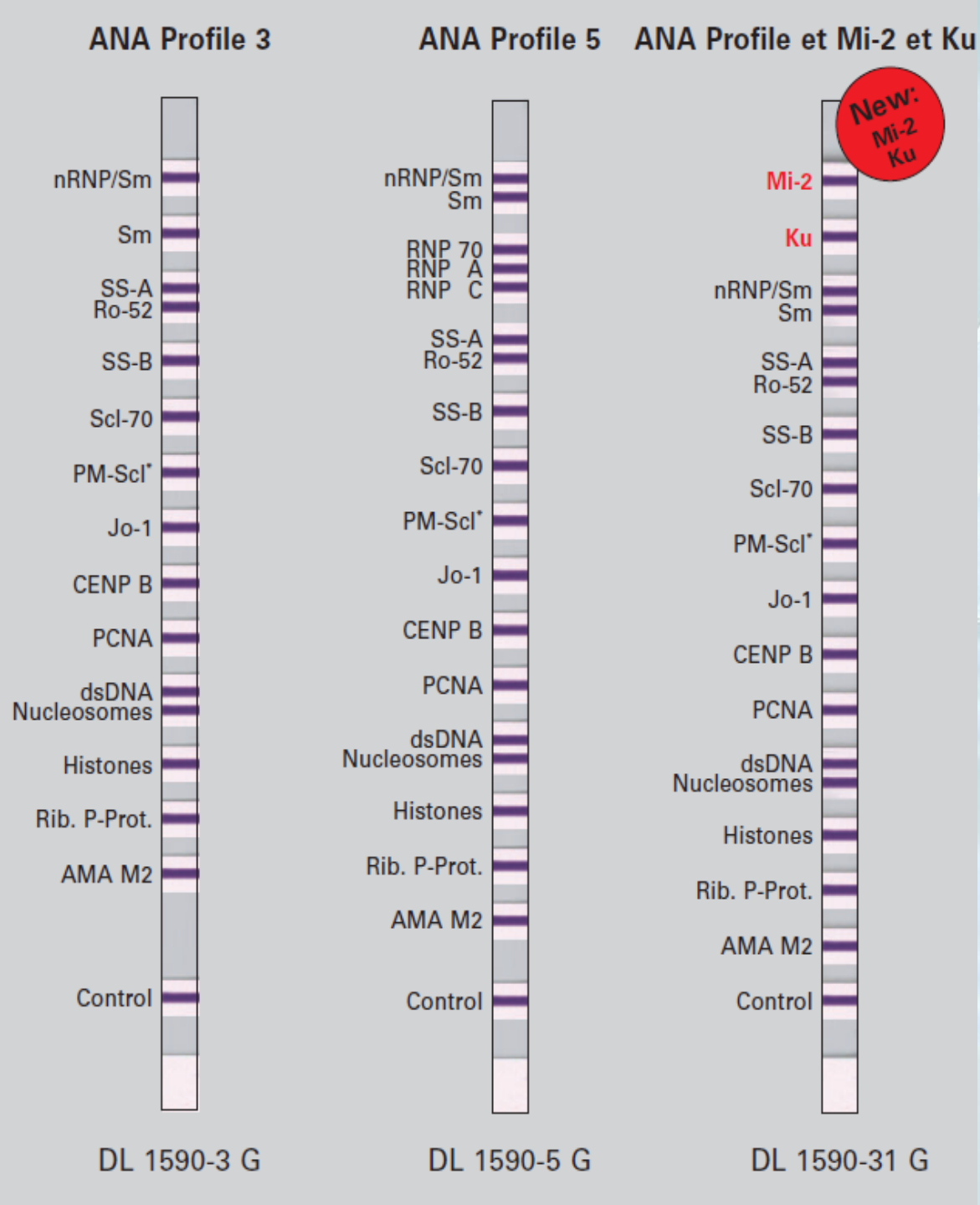
Lineblot стрипы

Био-лайн

Искусственно созданные антигены

Искусственно созданные антигены – созданные по эмпирической зависимости их специфической реакции с (ауто-) антителами, оптимизируют их использование в диагностических тест-системах





Био-лайн

до 17 антигенов + RNP

на одной тестовой полоске

автоматическая инкубация

на EUROBlotMaster

полностью

атоматизированный

процесс идентификации

с помощью программы

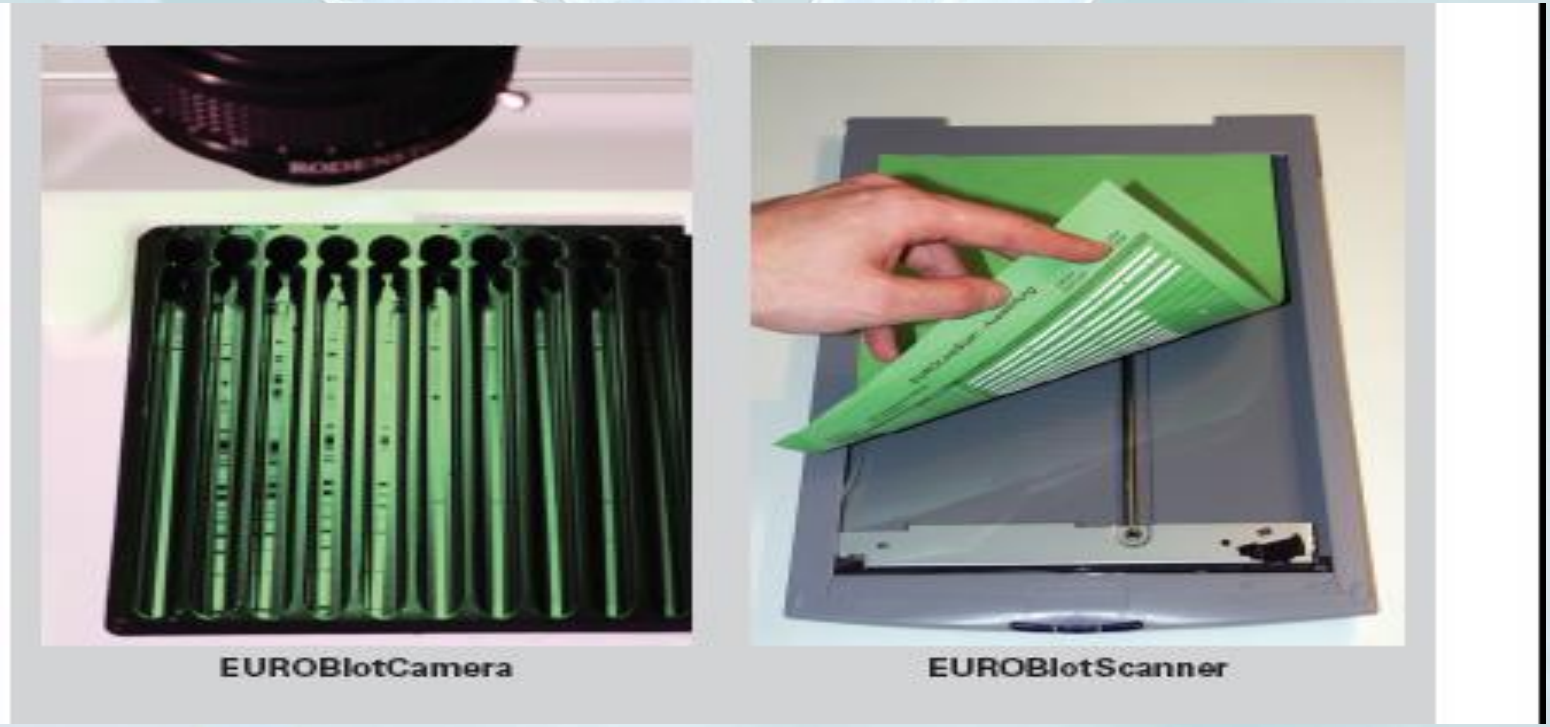
EUROLineScan

Био-лайн

Иммуноблоттинг (иммуноблот)

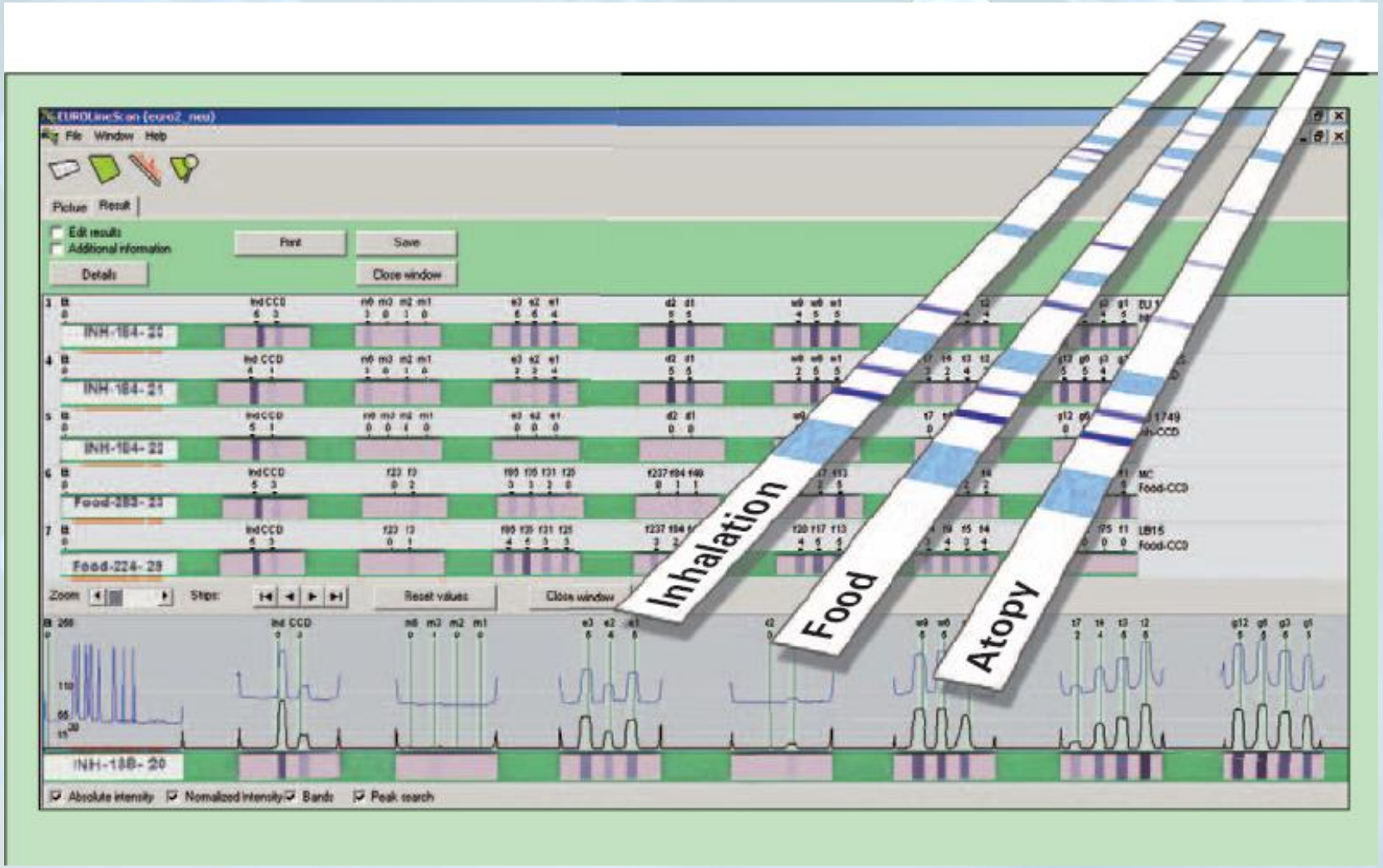
Преимущество техники иммуноблота

Возможность постановки единичных исследований



Био-лайн

Иммуноблоттинг (иммуноблот)



Диагностика аутоиммунных заболеваний

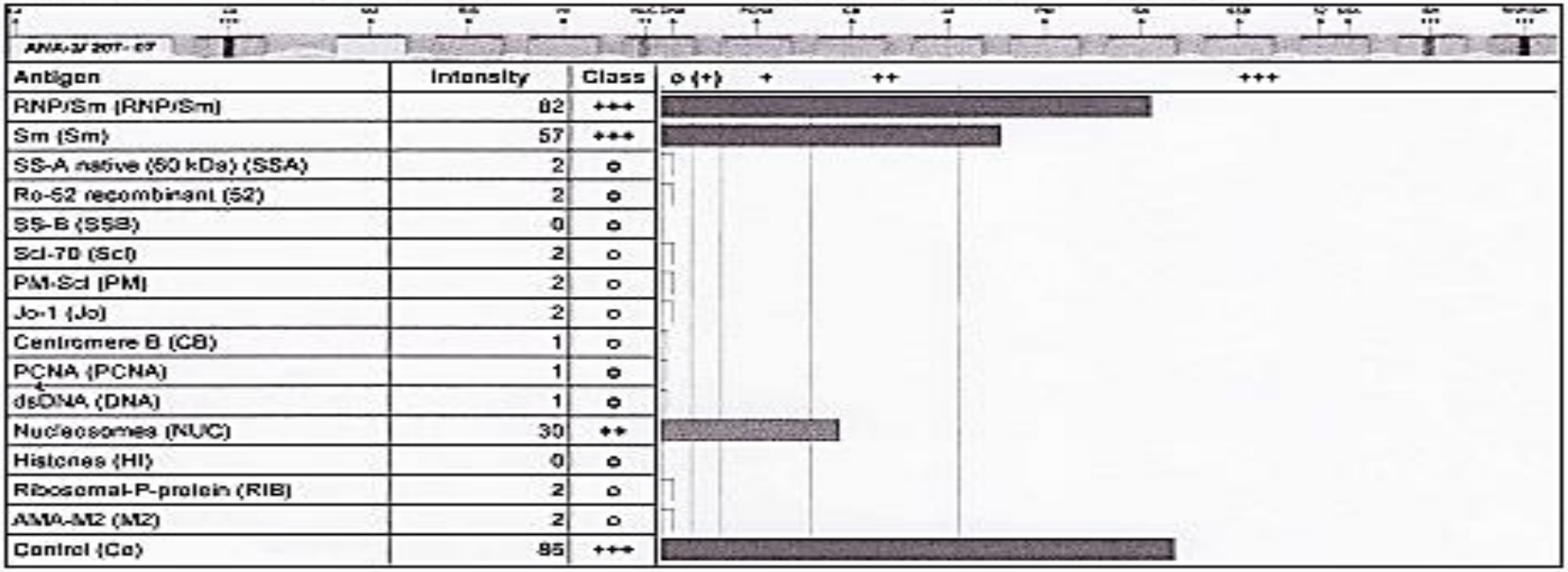
Био-лайн

Page 1

ANA-профиль

Patients IDs:
Name:
Date of birth
Lab number:
Number:
Sent from: ООО "Био-Лайн"

Test: Ana Profile3 (14 Ag, PCNA)
Strip number: ANA-3/207-07
Testkit: ANA 3G
Date of receipt: 31.05.2012
Results from: 12.09.2012
Receipt of sample: 30.05.2012



Antigen	Intensity	Class
RNP/Sm (RNP/Sm)	82	+++
Sm (Sm)	57	+++
SS-A native (60 kDa) (SSA)	2	o
Ro-52 recombinant (52)	2	o
SS-B (SSB)	0	o
Scl-70 (Scl)	2	o
PM-Scl (PM)	2	o
Jo-1 (Jo)	2	o
Centromere B (CB)	1	o
PCNA (PCNA)	1	o
dsDNA (DNA)	1	o
Nucleosomes (NUC)	30	++
Histones (HI)	0	o
Ribosomal-P-protein (RIB)	2	o
AMA-M2 (M2)	2	o
Control (Co)	95	+++

Заключение: Обнаружены аутоантитела класса IgG к нативному антигену U1-nRNP , нативному антигену Sm, нативным нуклеосомам. Результат сильно-положительный.

Био-лайн

Диагностика аутоиммунных заболеваний

ANA-профиль

Обеспечивает качественное определение in vitro в сыворотке крови аутоантител класса IgG к 14 различным антигенам (белки ядра, нуклеосомы, гистоны, dsDNA и др.)

Показания к применению

- **Смешанное заболевание соединительной ткани (Sharp-синдром)**
- **СКВ**
- **Синдром Шегрена,**
- **Прогрессирующий системный склероз,**
- **Поли-/дерматомиозит,**
- **Ограниченная форма - прогрессирующего системного склероза (CREST синдром**
- **Перекрестный или смешанный синдром (overlap syndrome)**
- **Первичный билиарный цирроз печени**

Диагностика аутоиммунных заболеваний

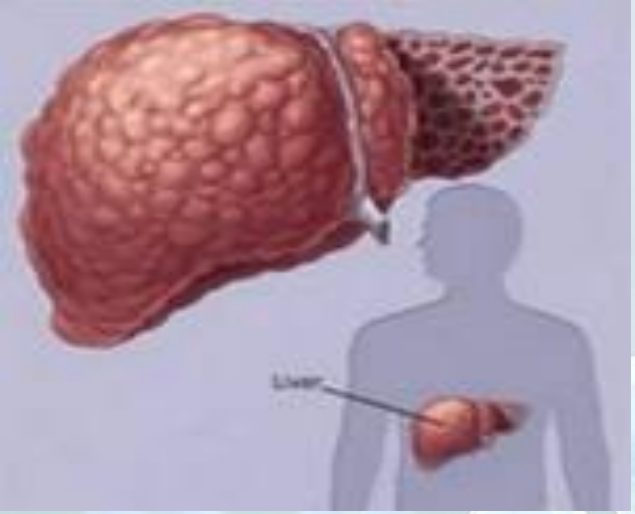
ANCA-профиль

Определение аутоантител класса IgG к миелопероксидазе, протеиназе 3 и базальной мембране клубочков почек

Показания к применению:

системные васкулиты

- Гранулематоз Вегенера
- Полиартериит
- Синдром Гудпасчера



Био-лайн

Диагностика аутоиммунных заболеваний

Печеночный профиль

Определение аутоантител класса IgG к антигенам печени

AMA-M2, M2-3E(BPO), Sp100, PML, SLA/LP и др.

Показания к применению

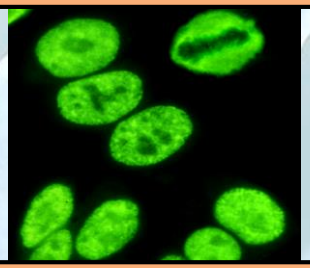
- Первичный билиарный цирроз печени
- Повышение трансаминаз с невыясненной причиной
- Подозрение на аутоиммунный гепатит

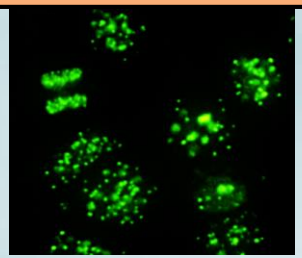
Общая стратегия

1. Скрининг

2. Подтверждение/
   Дифференциация

мультиспецифический анализ
(иммунофлюоресценция)





моноспецифический анализ
(иммуноблот, ИФА, ИХЛ)





Результат

Био-лайн

БЛАГОДАРЮ ЗА ВНИМАНИЕ!