

СОЧЕТАННАЯ ВСТРЕЧАЕМОСТЬ АУТОАНТИТЕЛ У БОЛЬНЫХ С ДИФФУЗНЫМИ БОЛЕЗНЯМИ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ

Созина А.В., Неустроева Ю.А., Тихомирова Т.А., Лапин С.В.

Научно-методический центр МЗиСР РФ по молекулярной медицине на базе Санкт-Петербургского медицинского университета им.акад.И.П. Павлова, Санкт-Петербург

Резюме. Характерной особенностью диффузных болезней соединительной ткани (ДБСТ), таких как системная красная волчанка (СКВ), синдром Шогрена (СШ), ревматоидный артрит (РА) является появление в сыворотке крови ряда антинуклеарных антител (АНА). Целью нашей работы было определить место каждого из используемых лабораторных показателей в диагностике ДБСТ.

Нами были исследованы сыворотки 1312 пациентов с подозрением на ДБСТ, 105 больных с СКВ, 163 больных РА, 15 с СШ и 100 доноров. Определялись антинуклеарный фактор (АНФ) (HEp-2-метод), антитела к экстрагируемому нуклеарному антигену (ЭНА), АНА с помощью лайнблота, антитела к двуспиральной ДНК IgG (дсДНК), к кардиолипину IgG и IgM (КЛ) и к бета 2 гликопротеину 1 (бета2ГП1). Для определения антител к дсДНК также использовалась иммунофлюоресценция на простейшем микроорганизме *Crithidia luciliae* (КЛИФ).

Встречаемость АНФ среди лиц в подозрением на ДБСТ составила 23,44% (309/1318). При СШ АНФ с гранулярным типом свечения отмечался в 100% (15/15) случаев. При СКВ и РА встречаемость АНФ составила 79% и 36% соответственно. В группе доноров АНФ был обнаружен у 3% обследованных, титр антител не превышал 1/80. Сыворотка 282 больных была обследована на наличие АНФ и антител к ЭНА. Сочетано АНФ и антитела к ЭНА определялись в 12% случаев (34/282), а в 7% случаев (20/282) были обнаружены только антитела к ЭНА. Из них при использовании лайнблота в 64% (7/11) случаев обнаруживались антитела к SS-A антигену, тогда как специфичность оставшихся 36% (4/11) сывороток установлена не была.

Для изучения сочетанной встречаемости АНФ и антител к дсДНК было обследовано 614 сывороток, из них антитела были обнаружены в 45,9% случаев. В 151 сыворотке АНФ и антитела к дсДНК сочетано обнаруживались в диагностических титрах. У 14,9% (42/282) обследованных при отсутствии АНФ, определялись антитела к дсДНК, при этом у 6,7% (19/282) в высокой концентрации (> 50 МЕ/мл). Таким образом, при концентрации дсДНК > 25 МЕ/мл чувствительность относительно АНФ составила 63% и специфичность 89%, а при содержании дсДНК > 50 МЕ/мл чувствительность составила 35% и специфичность – 95%.

Среди пациентов, обследованных на наличие антител к КЛ, АНФ и антител к дсДНК, высокое содержание антител к КЛ без АНФ и антител к дсДНК было обнаружено только у одного пациента, тогда как в остальных случаях повышение уровня антител к КЛ было связано с увеличением титров АНФ и антител к дсДНК, что указывает на наличие у данной группы больных ревматической патологии, вероятнее всего, СКВ.

Таким образом, информативность методов, применяемых для диагностики ДБСТ, повышается при сочетанном выявлении аутоантител, что позволяет оптимизировать иммунологическое обследование больных с ревматологической патологией.

Адрес для переписки:

197089, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6/8
НМЦ по молекулярной медицине на базе СПбГМУ
им. акад. И.П. Павлова
Тел.: +7 (812) 499-71-94
Созина Александра Васильевна
E-mail: alex.sozina@gmail.com

Ключевые слова: диффузные болезни соединительной ткани, системная красная волчанка, аутоантитела, антинуклеарный фактор, антитела к двуспиральной ДНК, антитела к кардиолипину.

Sozina A.V., Neustroeva Yu.A., Tikhomirova T.A., Lapin S.V.

COINCIDENCE OF AUTOANTIBODIES AMONG PATIENTS WITH DIFFUSE CONNECTIVE TISSUE DISORDERS

Abstract. Presence of some antinuclear antibodies (ANA) is a typical feature of connective tissue disorders (CTD), such as systemic lupus erythematosus (SLE), Sjogren's syndrome, rheumatoid arthritis (RA). The purpose of our work was to estimate the significance of laboratory tests commonly used in CTD.

We examined blood serum collected from 1312 patients with suspected connective tissue disorders, 105 patients with confirmed SLE, 163 patients with RA, 15 patient with Sjogren's syndrome (SS), and 100 healthy volunteers. Blood serum was tested for antinuclear factor (ANF) using HEp-2 method, antibodies against extractable nuclear antigens (anti-ENA), line blot ANA, IgG antibodies against double-stranded DNA (anti-dsDNA IgG), IgG and IgM antibodies against cardiolipin (CL) and beta-2-glycoprotein 1 (B2GPI). The *Crithidia luciliae* immunofluorescence (CLIF) assay was also used to detect antibodies to native dsDNA.

ANF prevalence in the patients with suspected CTD was 23,4% (309/1318). Speckled pattern of ANF was detected in 100% (15/15) of patients with SS. Prevalence of ANF in patients with SLE and RA was 79% and 36%, correspondingly. ANF was revealed only in 3% of healthy volunteers and its titer did not exceed 1/80. Blood serum from 282 patients was tested for ANF and anti-ENA. Coincidence of ANF and antibodies against ENA were found in 12% of cases (34/282), and isolated anti-ENA – in 7% of cases (20/282). In this group (anti-ENA-positive/ANF negative), antibodies to SS-A antigen were detected in 64% of patients, using ANA lineblot, 36% of patients were negative. Blood sera from 614 patients were tested, in order to evaluate coincidence of ANF and anti-dsDNA. The antibodies were revealed in 45.9% of cases, whereas a combination of ANF and anti-dsDNA in diagnostic titers was found in 151 patient. Anti-dsDNA in absence of ANF were detected in 14.9% (42/282) of patients; in 6.7% of the samples (19/282), higher concentrations of antibodies were detected (> 50 IU/ml). In conclusion, ANF sensitivity was 63% vs 35%, specificity – 89% vs 95% in the groups of patients with dsDNA antibodies, resp., > 25IU/ml, and > 50 IU/ml. In the patients examined for anti-CL, ANF and anti-dsDNA, high concentration of anti-CL without detectable ANF and anti-dsDNA was found only in one case; in the rest of patients, high titers of anti-CL were associated with higher titers of ANF and anti-dsDNA, thus indicating high probability of rheumatic diseases (most likely, SLE) in these patients.

Informativity of the methods used for CTD diagnostics is increased, when several autoantibodies are detected concomitantly, thus allowing optimized immunological examination of the patients with rheumatic diseases. (*Med. Immunol.*, 2007, vol. 9, N 1, pp 69-76)

Введение

Характерной особенностью диффузных болезней соединительной ткани (ДБСТ), таких как системная красная волчанка (СКВ), синдром Шогрена (СШ), ревматоидный артрит (РА) является наличие хронического воспалительного процесса неясной этиологии, поражающего внутренние органы. Среди вероятных причин заболевания рассматриваются воздействие хронической вирусной инфекции и повышенная частота заболевания у кровных родственников больных, что обусловлено носительством некоторых антигенов HLA [7, 9]. В основе протекающих процессов лежат единые иммунопатогенетические механизмы, одним из которых является активация патологического апоптоза, ведущего к гиперсенсibilизации иммунной системы [8, 10]. При этом иммунный ответ направлен против компонентов ядра и цитоплазмы клеток, что ведет к появлению в кровотоке широкого спектра аутоантител – антинуклеарных антител, определение которых входит в критерии диагностики ДБСТ и используется для дифференциальной диагностики, определения прогноза и тактики ведения пациентов.

Несмотря на то, что лабораторные методы диагностики ревматических заболеваний, такие как выявление антинуклеарного фактора (АНФ), антител к экстрагируемому нуклеарному антигену (ЭНА), антител к двуспиральной ДНК (дсДНК) и фосфолипидам используются в нашей стране для диагностики ревматологических заболеваний уже в течение ряда лет, отсутствуют данные о сочетанной встречаемости аутоантител при различных ДБСТ и о значении разных уровней позитивности выявляемых антител.

Целью нашей работы стало – определить место каждого из используемых лабораторных показателей в диагностике ДБСТ для оптимизации использования лабораторного обследования больных с ревматической патологией.

Материалы и методы

Нами были исследованы на наличие АНФ, антител к ЭНА, АНА, антител к дсДНК IgG, антител к кардиолипину IgG и IgM (КЛ) и антител к бета 2 гликопротеину 1 (бета2ГП1) сыворотки 1312 пациентов с подозрением на ДБСТ. Так-

же были исследованы сыворотки 105 больных с клинически подтвержденным диагнозом СКВ, 163 больных РА и 15 пациентов с СШ. В группу контроля вошли сыворотки 100 доноров.

АНФ выявлялся методом непрямой иммунофлюоресценции (нРИФ) с использованием в качестве субстрата перевиваемой клеточной линии аденокарциномы гортани человека HEp-2. При оценке результата описывались основные типы свечения клетки: гомогенный, периферический, гранулярный, ядрышковый, центромерный и цитоплазматический (рис. 1, III обложка). В качестве положительного оценивался результат, при котором наблюдалось свечение, схожее со свечением контрольных образцов при разведении сыворотки 1/80 и выше. Антиядерные антитела определялись с помощью лайнблота (Euroimmun, Германия), содержащего следующие рекомбинантные антигены: Sm, RNP/Sm, SS-A, SS-B, Scl-70, CENT-B, PCNA, дсДНК, нуклеосомы, гистоны, Jo-1, AMA-M2.

Антитела к дсДНК IgG, антитела к ЭНА (SS-A 52 и 60кДа, SS-B, Sm, RNP/Sm, Scl-70, Jo-1), антитела к КЛ IgG/IgM и антитела к бета2ГП1 IgG/IgM выявлялись методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих наборов (Orgentec, Германия). Также у части больных антитела к дсДНК параллельно определялись методом нРИФ с использованием в качестве субстрата простейшего жгутикового микроорганизма *Crithidia luciliae* (КЛИФ). Этот микроорганизм относится к роду трипаносом, он неприхотлив и хорошо поддается культивирова-

нию в лабораторных условиях. В основании жгутика в клетках критидий имеется кинетопласт, который состоит из гигантской митохондрии и содержит плотно упакованную кольцевую, суперспирализованную молекулу ДНК. Эта молекула митохондриальной дсДНК не содержит ассоциированной РНК и нуклеопротеинов, и представляет собой субстрат для нРИФ. Так как ядро критидии не обладает четкой мембраной, даже высокие титры АНФ не мешают оценить специфическое свечение кинетопласта. При наличии у больного антител к дсДНК, реагирующих с ДНК в кинетопласте, определяется яркая флюоресценция на конце клетки, несущем жгутик (рис. 2, III обложка).

Результаты

Для того чтобы оценить частоту встречаемости АНФ среди лиц в подозрении на ДБСТ направленных на обследование в иммунологическую лабораторию, нами были исследованы сыворотки 1318 человек, из которых 76,56% (1009/1318) образцов оказались серонегативны. У остальных 23,44% (309/1318) был обнаружен АНФ в титре 1/80 и выше. Нами была выделена группа лиц с высокоположительными результатами АНФ – 1/320 и выше, которая составила 172 человека (рис. 3). Чаще всего в этой группе описывался гранулярный тип свечения АНФ – 48% (82/172), гомогенный тип свечения был выявлен у 36% лиц (62/172), реже встречались пациенты с цитоплазматическим, центромерным и ядрышковым типами свечения АНФ.

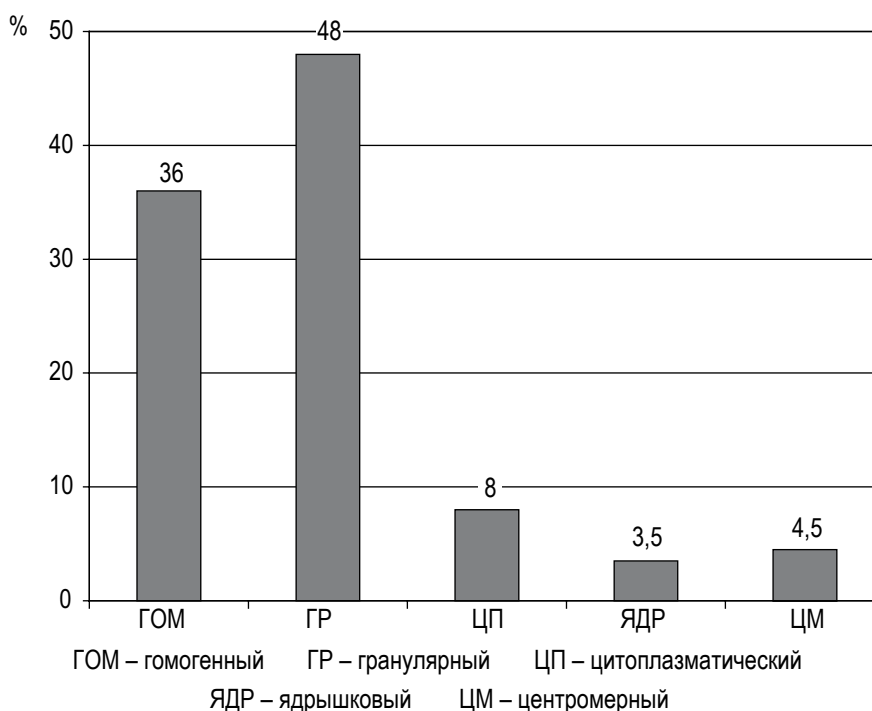


Рисунок 3. Частота встречаемости типов свечения АНФ у лиц с подозрением на ДБСТ (n = 172)

ТАБЛИЦА 1. ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ АНФ В ГРУППАХ С ДБСТ И У ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ

ДБСТ	n	АНФ		АНФ позитивный, %			
		негативный	позитивный	тип свечения			
				ГОМ	ГР	ЯДР	ЦП
Синдром Шогрена	15	0	15 (100%)	0	100	0	0
Системная красная волчанка	105	22	83 (79%)	52	47	1	0
Ревматоидный артрит	163	105	58 (36%)	70	21,5	3,5	5
Здоровые доноры	100	95	3 (3%)	0	67	33	0

Мы оценили встречаемость АНФ среди больных с ДБСТ (табл. 1). У пациентов с СШ в 100% (15/15) случаев описывался АНФ с гранулярным типом свечения ядра. У больных с СКВ АНФ встречался у 79% (83/105), из них у 51% (43/83) был описан гомогенный, а у 46,5% – гранулярный тип свечения АНФ. Серопозитивны по АНФ были 36% больных (58/163) с РА. При этом гомогенный тип свечения АНФ встречался в 3,5 раза чаще, чем гранулярный 71% (41/58) и 21% (12/58) соответственно. В группе доноров АНФ был обнаружен у 3% обследованных лиц (3/100), при этом титр антител не превышал 1/80.

При анализе сочетанной встречаемости АНФ и антител к ЭНА 74% больных (210/280) были серонегативными (табл. 2). Сочетано АНФ и антитела к ЭНА определялись у 12% обследованных лиц (34/280), а у 7% (20/280) были обнаружены антитела к ЭНА при отсутствии АНФ.

Это позволяет рассчитать клинико-лабораторные параметры определения антител к ЭНА методом ИФА при его сопоставлении с АНФ [1, 2]. Чувствительность метода выявления антител к ЭНА составила 68% при специфичности 91%. Для уточнения антигенной мишени АНА 11 пациентов положительных по антителам к ЭНА и отрицательным по АНФ было назначено дополнительное уточняющее обследование методом лайнблота. У 36% (4/11) и них АНА обнаружено не было, а у 64% (7/11) были выявлены только антитела к SS-A/SS-B антигену.

Отдельно нами были проанализированы данные по группе больных из 246 человек объем обследования которых, включал определение АНФ, антител к ЭНА и лайнблот АНА. У 56% пациентов (138/246) сыворотки были серонегативны. Среди серопозитивных больных наиболее часто встречался АНФ с гранулярным типом свечения ядра –

ТАБЛИЦА 2. СОЧЕТАННАЯ ВСТРЕЧАЕМОСТЬ АНФ И АНТИТЕЛ К ЭНА У ЛИЦ С ПОДОЗРЕНИЕМ НА ДБСТ (n = 280)

Антитела к ЭНА	АНФ	
	негативный	позитивный
> 5 МЕ/мл	20	34
< 5 МЕ/мл	210	16
Σ	280	

45% (49/108), при использовании лайнблота в этих сыворотках наиболее часто определялись антитела к SS-A антигену (рис. 4). У 18% больных (20/108) был обнаружен гомогенный тип свечения АНФ. В этой группе, наряду с антителами к дсДНК, нуклеосомам и гистонам, определялись также антитела к SS-A антигену. Антитела к Scl-70 и CENT-B антигенам были обнаружены в сыворотке 13% (14/108) пациентов преимущественно с центромерным и ядрышковым типом свечения ядра. У трех больных с гранулярным типом свечения АНФ антитела к Scl-70 и CENT-B определялись сочетано с антителами к рибонуклеопротеиновым антигенам. У 10% больных (11/108), обследованных с помощью лайнблота, АНФ обнаружен не был, однако выявлялись антитела к SS-A/SS-B и антитела к ЭНА. Результаты лайнблота и антител к ЭНА были отрицательны у 13% (14/108) пациентов с гранулярным или ядрышковым типом свечения АНФ.

У 54,1% (332/614) пациентов, обследованных на встречаемость АНФ и антител к дсДНК, данные аутоантитела выявлены не были (табл. 3). У 151 больного в этой группе сочетанно обнаруживались АНФ и антитела к дсДНК в диагностических титрах, причем у 58,9% (89/151) этих пациентов был выявлен гомогенный, а у 38% (58/151) – гранулярный тип свечения ядра. В 19% (59/89) сывороток, отрицательных по антителам к дсДНК, определялся АНФ с гранулярным типом свечения ядра. У 14,9% (42/282) обследованных лиц при отсутствии АНФ определялись антитела к дсДНК, при этом у 6,7% (19/282) в высокой концентрации (> 50 МЕ/мл).

Таким образом, при концентрации дсДНК > 25 МЕ/мл чувствительность составила 63% и специфичность 89%, а при содержании дсДНК > 50 МЕ/мл: чувствительность составила 35% и специфичность 95%.

Отдельно нами были проанализирована группа больных из 28 человек, у которых при отсутствии АНФ выявлялись антитела к дсДНК в высокой концентрации. Сыворотка данных пациентов была исследована на наличие антител к дсДНК методом КЛИФ. Лишь у 11% больных (3/28) было обнаружено специфическое свечение кинетопласта, тогда как результаты

тип свечения АНФ	антиген антинуклеарных антител													
	nRNP/Sm	Sm	SS-A 60кДа	SS-A 52кДа	SS-B	Pm-Sci	PCNA	Sci-70	Jo-1	CENT-B	дсДНК	нуклеосомы	гистоны	Rib. P-prot.
гранулярный														
гомогенный														
ядрышковый/ центромерный														
АНФ отрицательный, антитела к ЭНА позитивные														
АНФ отрицательный, антитела к ЭНА негативные														

Рисунок 4. Сочетанная встречаемость АНФ и антинуклеарных антител (n = 108)

теста у остальных 89% больных (25/28) были отрицательными.

Также мы обследовали группу больных СКВ из 59 человек на сочетанную встречаемость АНФ и антител к дсДНК. Антитела к дсДНК определялись двумя методами – ИФА и КЛИФ (табл. 4). У 20% пациентов, позитивных по АНФ (12/59), был описан гомогенный тип свечения ядра, а также выявлялись антитела к дсДНК обоими методами. Лишь в одной сыворотке, позитивной по АНФ с гомогенным типом свечения ядра, было

обнаружено специфическое свечение кинетоплата, тогда как антитела к дсДНК методом ИФА выявлены не были. У 10% (6/59) пациентов с СКВ был описан гранулярный тип свечения АНФ, положительный КЛИФ, при этом результаты теста на дсДНК методом ИФА были отрицательные.

Только один пациент из данной группы был негативен по всем трем тестам. В сыворотке двух больных при отрицательном результате АНФ и КЛИФ определялась высокая концентрация антител к дсДНК методом ИФА.

ТАБЛИЦА 3. СОЧЕТАННАЯ ВСТРЕЧАЕМОСТЬ АНФ И АНТИТЕЛ К дсДНК У ЛИЦ С ПОДОЗРЕНИЕМ НА ДБСТ (n = 614)

Антитела к дсДНК	АНФ		АНФ позитивный, %				
	негативный	позитивный	тип свечения				
			ГОМ	ГР	ЯДР	ЦМ	ЦП
> 25 МЕ/мл (> 50 МЕ/мл)	42 (19)	151 (85)	59 (67)	38 (32)	3 (1)	0 –	0 –
< 25 МЕ/мл	332	89	19	67	1	11	2
Σ			614				

ТАБЛИЦА 4. СХОДИМОСТЬ ТЕСТОВ ПО ВЫЯВЛЕНИЮ АНФ, АНТИТЕЛ К дсДНК МЕТОДОМ ИФА И НРИФ У БОЛЬНЫХ СКВ (n = 59)

КЛИФ	АНФ									Σ
	негативный			гомогенный тип свечения			гранулярный тип свечения			
	анти-дсДНК, МЕ/мл			анти-дсДНК, МЕ/мл			анти-дсДНК, МЕ/мл			
	< 25	25-50	> 50	< 25	25-50	> 50	< 25	25-50	> 50	
позитивный	0	0	0	1	1	11	6	1	2	22
негативный	1	0	2	9	0	6	12	2	5	37
Σ	59									

В группе больных, обследованных на сочетанную встречаемость АНФ, антител к дсДНК и антител к КЛ у 72,8% (118/162) аутоантител обнаружено не было (табл. 5). При этом 4,93% обследованных лиц (8/162) были серопозитивны по всем трем аутоантителам. В 3,7% (6/162) обследованных образцах были обнаружены антитела к КЛ при отрицательных результатах АНФ и антител к дсДНК, при этом высокие титры антител к КЛ определялись только в одной из этих сывороток.

Таким образом, при содержании антител к КЛ класса IgG > 10 GPL/мл и IgM > 10 MPL/мл чувствительность составила 38% и специфичность 95%, а при концентрации антител к КЛ класса IgG > 10 GPL/мл и IgM > 10 MPL/мл чувствительность составила 38% и специфичность – 99%.

Для оценки диагностического значения изолированного выявления антител к КЛ нами была отдельно исследована группа из 10 образцов, которые были серонегативны по АНФ, но положительны по антителам к КЛ. Мы исследовали данные сыворотки на наличие антител к бета2ГП1. Совместно с антителами к КЛ антитела к бета2ГП1 были обнаружены только в одном из образцов, при этом данная сыворотка была позитивна только по антителам к бета2ГП1 класса IgG.

Обсуждение

Развитие ДБСТ связано с выработкой широкого спектра аутоантител, преимущественно антиядерных антител [14]. Основным методом

выявления АНА является определение АНФ методом нРИФ с использованием в качестве субстрата клеточной линии HEp-2. Встречаемость и значимость определения АНФ варьирует в зависимости от конкретного заболевания. Так, при СКВ и СШ обнаружение АНФ входит в критерии постановки диагноза [11, 13]. При СКВ АНФ по данным литературы встречается у 95-100% больных [6], в обследованной нами группе больных СКВ АНФ встречался у 83% пациентов. При РА частота выявления АНФ в 2 раза ниже, чем при СКВ, при этом обнаружение данных аутоантител не входит в критерии постановки диагноза и оценку активности течения заболевания. Среди лиц с подозрением на ДБСТ АНФ регистрировался в 23,5% случаев, что в 10 раз выше, чем популяционная встречаемость этого показателя. Необходимо учитывать, что встречаемость АНФ у здоровых лиц меняется в зависимости от титра [6, 12]. По данным нашего исследования АНФ был обнаружен у 3% лиц в титрах не выше, чем 1/80. Это позволяет использовать титр 1/320 как высокоположительный, указывающий на высокую вероятность наличия ДБСТ. Тогда как титры 1/40-1/160 выделяются как серая зона, однозначная клиническая интерпретация которых затруднена.

С помощью АНФ выявляются антитела преимущественно к нерастворимым компонентам ядра. Это связано с тем, что при фиксации монослоя клеточной линии происходит частичная утрата ряда растворимых антигенных мишеней ядра. Основным растворимым антигеном является SS-A/Ro, на что обращают внимание многие

ТАБЛИЦА 5. СОЧЕТАННАЯ ВСТРЕЧАЕМОСТЬ АНФ, АНТИТЕЛ К дсДНК И АНТИТЕЛ К КЛ У ЛИЦ С ПОДОЗРЕНИЕМ НА ДБСТ (n = 162)

Антитела к КЛ	Сочетание АНФ и антител к дсДНК		
	АНФ позитивный, антитела к дсДНК позитивные	АНФ позитивный, антитела к дсДНК негативные	АНФ негативный, антитела к дсДНК негативные
позитивные	8	0	6
низкие титры	0	0	5
высокие титры	8	0	1
негативные	13	17	118
Σ	162		

авторы [5]. Для его обнаружения используется ряд методов, наиболее распространенным из которых является определение антител к ЭНА методом ИФА. Наборы разных производителей для выявления антител к ЭНА отличаются по технологии производства антигенов и их составу. Антигены могут быть получены путем экстракции либо представлять собой смесь рекомбинантных белков. В лунке могут быть сорбированы либо изолированные антигены, либо смесь из 6-13 имеющих диагностическую значимость антигенов. Антигены, полученные путем очистки из ткани или клеточных культур, обычно контаминированы структурными компонентами клеток, что увеличивает число ложноположительных результатов при их использовании. Большое количество сорбированных в лунку антигенов приводит к росту числа их конформационных изменений, что ведет к возникновению ложноположительных результатов. Поэтому нами была выбрана система, состоящая из 6 антигенов, которые не выявляются при определении АНФ из-за их высокой растворимости. Действительно, по нашим данным, АНФ был обнаружен у 50 человек, а антитела к ЭНА — у 54. При дополнительном обследовании сывороток, позитивных по антителам к ЭНА и негативных по АНФ, с помощью лайнблота в 64% случаев обнаруживались антитела к SS-A антигену, тогда как специфичность оставшихся 36% сывороток установлена не была, что свидетельствует о ложноположительной реакции при определении антител к ЭНА.

Для того чтобы определить антигенные мишени у больных с положительным АНФ и/или антител к ЭНА, могут быть использованы другие уточняющие тесты, например лайнблот АНА. В сыворотке позитивных по АНФ при гранулярном типе свечения АНФ преобладают антитела к SS-A антигену, а также выявляются антитела к Sm, RNP/Sm, SS-B антигенам. При этом подавляющее число больных имеет положительный результат при обследовании на антитела к ЭНА. У пациентов с гомогенным типом свечения АНФ с помощью лайнблота выявляются антитела к нуклеосомам, гистонам и дсДНК. Следует обратить внимание, что у многих из них определяются антитела к рибонуклеопротеинам: SS-A, реже SS-B, Sm и RNP/Sm. Таким образом, гомогенный тип свечения ядра, связанный с наличием антител к компонентам хроматина, т.е. к дсДНК не исключает наличие в сыворотке больных антител к рибонуклеопротеинам, поэтому целесообразно дополнительно обследовать сыворотки таких пациентов с помощью лайнблота.

Наличие антител к дсДНК обуславливает развитие люпус-нефрита у больных с СКВ. Поэтому по изменению концентрации антител

к дсДНК можно оценивать как риск развития нефрита, так и усугубление уже существующего поражения почек. При определении антител к дсДНК методом ИФА одной из причин ложноположительных результатов является контаминация односпиральными участками ДНК, антитела к которым не имеют диагностического значения при СКВ. Также может наблюдаться неспецифическое связывание антител с другими веществами, применяемыми для изготовления тест-систем для определения антител к дсДНК, например, протаминам [4]. Простейшее *Crithidia luciliae* имеет в составе кинетопласта суперспирализованную стабильную молекулу нативной ДНК, лишенную односпиральных последовательностей, поэтому специфичность определения антител к дсДНК с помощью КЛИФ для диагностики СКВ выше, чем методом ИФА [3]. По данным нашего исследования, только у трех из 28 больных с отсутствием АНФ и наличием высокой концентрации антител к дсДНК было обнаружено специфическое свечение кинетопласта в КЛИФ.

Антитела к КЛ являются основным представителем семейства антифосфолипидных антител. В обследованной нами группе лиц с подозрением на ДБСТ антитела к КЛ выявлялись сочетано с АНФ и антителами к дсДНК, что указывает на наличие у них ревматической патологии, прежде всего СКВ. В то же время высокое содержание антител к КЛ без АНФ и антител к дсДНК было обнаружено только у одного пациента. Это может свидетельствовать о преобладании вторичного антифосфолипидного синдрома над первичным, что требует более внимательного отношения к лицам с наличием высоких титров антител к КЛ и подозрением на это заболевание. В этом случае целесообразно комбинированное определение АНФ и других разновидностей АНА.

Список литературы

1. Комаров Ф.И., Коровкин Б.Ф., Меньшиков В.В. Биохимические исследования в клинике. — Элиста: Джангар, 2001. — 216 с.
2. Лапин С.В., Тотолян Арег А. Иммунологическая лабораторная диагностика ревматических заболеваний: Пособие для врачей. — СПб.: Человек, 2006. — 128 с.
3. Bootsma H., Spronk P.E., Hummel E.J., de Boer G., ter Borg E.J., Limburg P.C., Kallenberg C.G. Anti-double stranded DNA antibodies in systemic lupus erythematosus: detection and clinical relevance of IgM-class antibodies // Scand. J. Rheumatol. — 1996. — Vol. 25, N 6. — P. 352-359.
4. Egner W. The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE // J. Clin. Pathol. — 2000. — Vol. 53, N 6. — P. 424-432.

5. Hoffman I.E., Peene I., Veys E.M., De Keyser F. Detection of specific antinuclear reactivities in patients with negative antinuclear antibody immunofluorescence screening tests // *Clin. Chem.* – 2002. – Vol. 48, N 12. – P. 2171-2176.
6. Kavanaugh A., Tomar R., Reveille J., Solomon D.H., Homburger H.A. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. American College of Pathologists // *Arch. Pathol. Lab. Med.* – 2000. – Vol. 124, N 1. – P. 71-81.
7. Reveille J.D. The genetic basis of autoantibody production // *Autoimmun. Rev.* – 2006. – Vol. 5, N 6. – P. 389-398.
8. Rosen A., Casciola-Rosen L. Autoantigens as substrates for apoptotic proteases: implications for the pathogenesis of systemic autoimmune disease // *Cell Death Differ.* – 1999. – Vol. 6, N 1. – P. 6-12.
9. Scheinfeld N. Sjogren syndrome and systemic lupus erythematosus are distinct conditions // *Dermatol. Online J.* – 2006. – Vol. 12, N 1. – P. 4.
10. Tan E.M. Autoimmunity and apoptosis // *J. Exp. Med.* – 1994. – Vol. 179, N 4. – P. 1083-1086.
11. Tan E.M., Cohen A.S., Fries J.F., Masi A.T., McShane D.J., Rothfield N.F., Schaller J.G., Talal N., Winchester R.J. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus // *Arthritis Rheum.* – 1982. – Vol. 25, N 11. – P. 1271-1277.
12. Tan E.M., Feltkamp T.E., Smolen J.S., Butcher B., Dawkins R., Fritzler M.J., Gordon T., Hardin J.A., Kalden J.R., Lahita R.G., Maini R.N., McDougal J.S., Rothfield N.F., Smeenk R.J., Takasaki Y., Wiik A., Wilson M.R., Koziol J.A. Range of antinuclear antibodies in «healthy» individuals // *Arthritis Rheum.* – 1997. – Vol. 40, N 9. – P. 1601-1611.
13. Vitali C., Bombardieri S., Moutsopoulos H.M., Balestrieri G., Bencivelli W., Bernstein R.M., Bjerum K.B., Braga S., Coll J., de Vita S., Drosos A.A., Ehrenfeld M., Harton P.Y., Hay E.M., Isenberg D.A., Janin A., Kalden R.J., Kater L., Kontinen Y.T., Maddison P.J., Maini R.N., Manthorpe R., Mayer O., Ostuni P., Pennec Y., Prause J.U., Richards A., Sauvezie B., Sciuto M., Scully C., Shoenfeld Y., Skopouli F.N., Smolen J.S., Snaith M.L., Tishler M., Todesco S., Valesini G., Venables P.J.W., Wattiaux M.J., Youinou P. Preliminary criteria for the classification of Sjogren's syndrome. Results of a prospective concerted action supported by the European Community // *Arthritis Rheum.* – 1993. – Vol. 36, N 3. – P. 340-347.
14. von Muhlen C.A., Tan E.M. Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases // *Semin. Arthritis Rheum.* – 1995. – Vol. 24, N 5. – P. 323-358.

поступила в редакцию 25.12.2006

принята к печати 19.01.2007

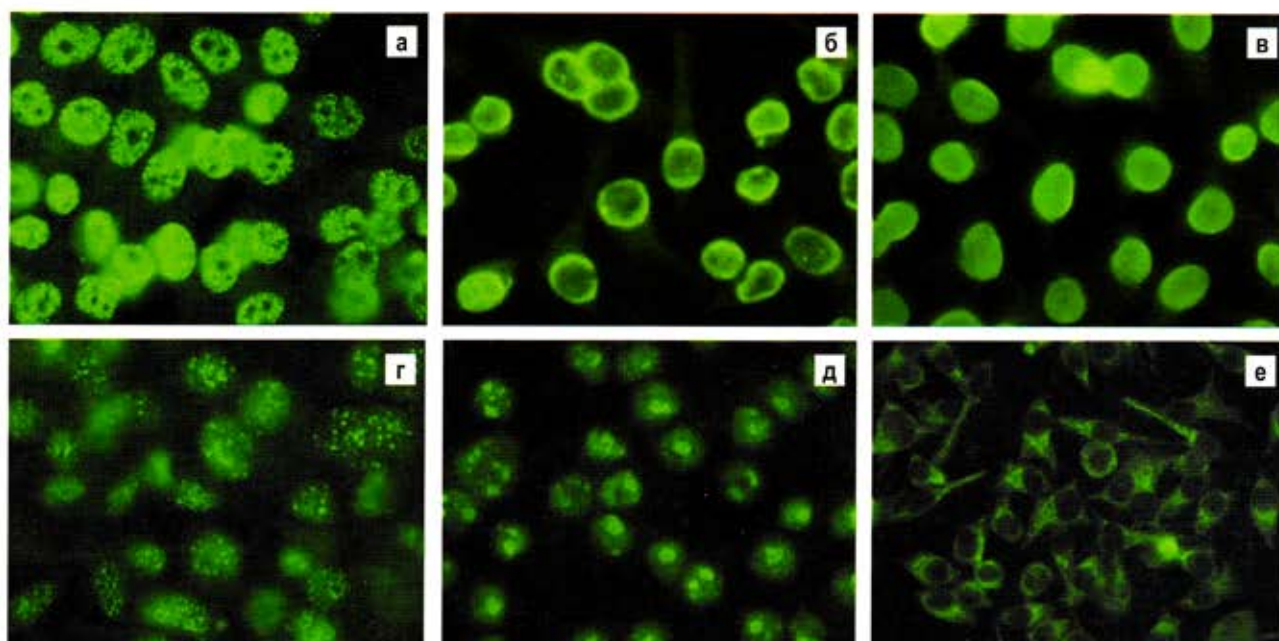


Рисунок 1. Основные типы свечения АНФ, а-е – гранулярный, периферический, гомогенный, центромерный, ядрышковый, цитоплазматический; монослой клеточной линии HEp-2, непрякая иммунофлюоресценция, x400

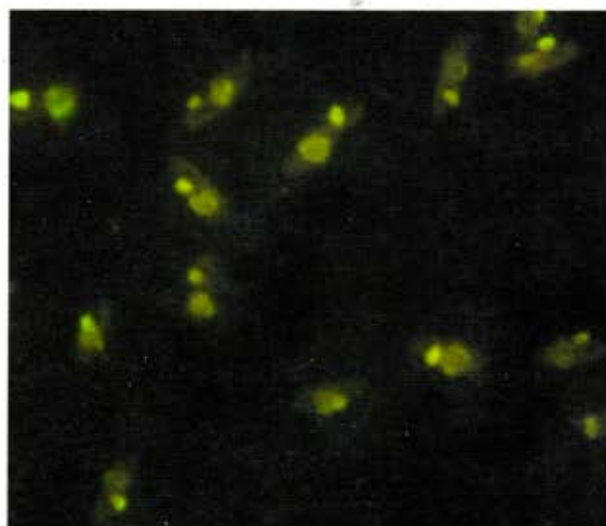


Рисунок 2. Специфическое окрашивание кинетопласта клеток *Crithidia luciliae* антителами к дсДНК, второй конъюгат IgG, x1000