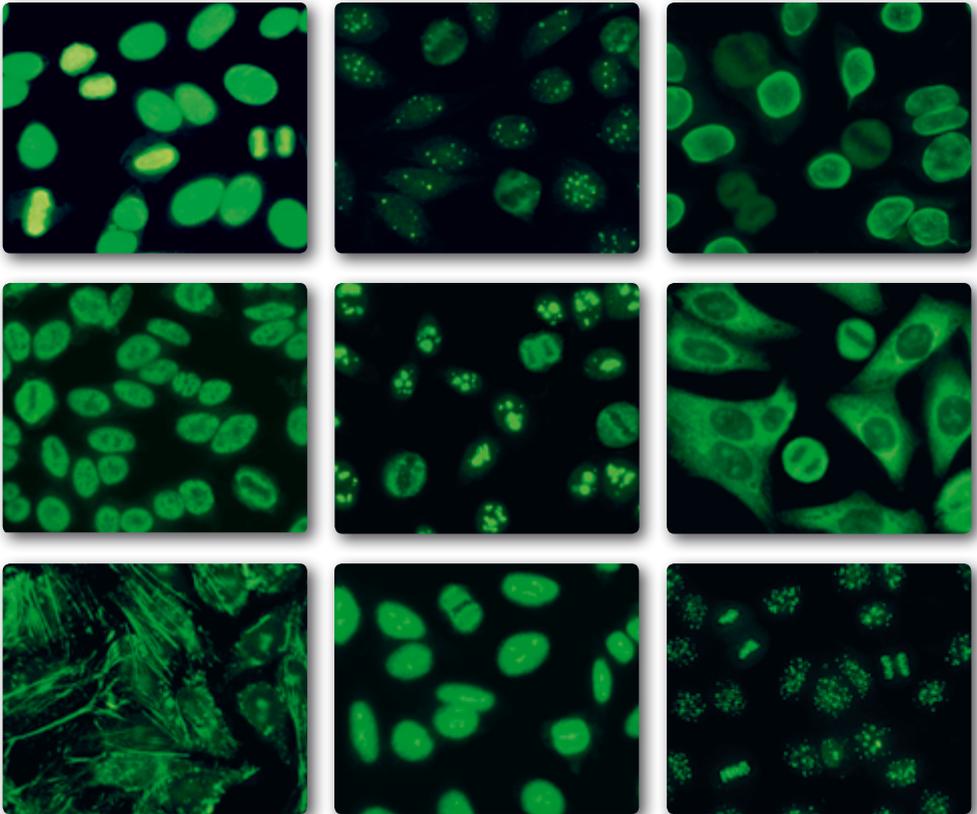




# Выявление антиядерных антител (ANA) методом непрямой иммунофлуоресценции



EUROIMMUN AG ( ) - " www.analytica.ru  
129343, , . , .2, .1, . (495) 737 0363, info@analytica.ru



## Оглавление

Аутоантитела к антигенам клеточного ядра (ANA)	3
Аутоантитела к антигенам клеточного ядра (ANA), гомогенное свечение	10
Аутоантитела к дсДНК	11
Аутоантитела к антигену DFS70	12
Аутоантитела к антигенам ядерной мембраны	13
Аутоантитела к нуклеоплазме, крупногранулярное свечение	14
Аутоантитела к нуклеоплазме, мелкогранулярное свечение	15
Аутоантитела к антигену Ku	16
Аутоантитела к антигену Mi-2	17
Аутоантитела к антигену PM-Scl	18
Аутоантитела к антигену РНК-полимеразе I	19
Аутоантитела к U3-nRNP/фибрилларину	20
Аутоантитела к антигену Scl-70	21
Аутоантитела к ядерным точкам	22
Аутоантитела к центромерам	23
Аутоантитела к PCNA	24
Аутоантитела к центриолям	25
Аутоантитела к антигенам митотического веретена	26
Аутоантитела к антигенам клеточной пластинки	27
Аутоантитела к митохондриям	28
Аутоантитела к рибосомальным Р-белкам	29
Аутоантитела к антигену Jo-1	30
Аутоантитела к антигенам SRP и PL-12	31
Аутоантитела к комплексу Гольджи	32
Аутоантитела к лизосомам	33
Аутоантитела к F-актину	34
Аутоантитела к виментину	35
Цитоплазматические кольца и палочки	36
Титрование образцов для реакции непрямой иммунофлуоресценции	37



## Аутоантитела к антигенам клеточного ядра (ANA)

### Определение

Антядерные аутоантитела направлены против антигенов ядра клетки. Наименование этих аутоантигенов происходит:

- от их биохимической сущности (ДНК, гистоны, рибонуклеопротеины (RNP), или

- от названия заболеваний, ассоциированных с наличием соответствующих аутоантител (SS-A, SS-B – синдром Шегрена, антигены А и В; PM-Scl – полимиозит, системная склеродермия), или

- от имени больного, у которого впервые были выделены соответствующие аутоантитела (Sm, Ro, La).

**Клетки культуры Нер-2 содержат более 100 аутоантигенов.**

#### Наиболее важные из них:

Полинуклеотиды:	Двуспиральная ДНК, односпиральная ДНК, РНК
Гистоны:	H1, H2A, H2B, H3, H4, комплекс H2A-H2B
Рибонуклеопротеины:	U1-(n)RNP, Sm, SS-A (Ro), SS-B (La)
Антигены ядрышка:	U3-(n)RNP/фибрилларин, РНК-полимераза I, PM-Scl (PM-1), 7-2-RNP (To), 4-6-S-РНК, NOR-90 (ядрышковый организатор)
Центромеры:	Белки кинетохора
Другие белки:	Scl-70, PCNA (циклин I), белки ядерных гранул, Ku, Mi-2, ламинины, рецепторы ламин

### Особенности метода определения

Золотым стандартом для определения антиядерных аутоантител (ANA) является метод непрямой иммунофлуоресценции (НРИФ) с использованием культуры клеток человека Нер-2 и препарата печени обезьяны; это обусловлено высокой чувствительностью и специфичностью



метода. Интенсивность регистрируемого свечения в положительных и отрицательных образцах значительно различается, что позволяет точно определять с помощью флуоресцентного микроскопа распределение индикатора (обычно флуоресцеина) в ткани или клетках. Связывание каждого аутоантитела приводит к образованию характерного типа (паттерна) свечения, обусловленного локализацией соответствующего аутоантигена.

При получении положительного результата для дальнейшего исследования используют другие тесты, предназначенные для выявления антител к индивидуальным антигенам (ИФА, Вестерн-блот, лайн-блот). Использование только таких моноспецифических тестов для выявления ANA не является достаточным, поскольку не все необходимые для исследования антигены доступны в очищенном виде. Для надлежащей верификации результата моноспецифические тесты должны всегда проводиться в паре с НРИФ.

### Клиническое значение

Антиядерные аутоантитела выявляются в сыворотках больных при многих заболеваниях, в частности (но не только), при ревматологических. Наиболее распространенными являются следующие:

Аутоиммунное заболевание	Частота выявления ANA, %
Системная красная волчанка (СКВ)	80–100
Лекарственная волчанка	100
Смешанные заболевания, соединительной ткани (синдром Шарпа)	100
Ревматоидный артрит	20–40
Другие ревматические заболевания	20–50
Системная склеродермия	85–95
Полимиозит/дерматомиозит	30–50
Синдром Шёгрена	70–80
Аутоиммунный гепатит	30–40
Язвенный колит	26



Обнаружение антиядерных аутоантител является важным диагностическим показателем при многих аутоиммунных заболеваниях. Они специфически связываются с различными компонентами (биохимическими структурами) клеточного ядра: нуклеиновыми кислотами, ядерными белками и рибонуклеопротеинами. При многих заболеваниях, в частности, ревматологических, их наличие является диагностически важным фактором. Выявляемость антиядерных антител при воспалительных ревматологических заболеваниях составляет от 20% до 100%; меньше других – при ревматоидном артрите (20%–40%). Поэтому определение аутоантител и точная идентификация соответствующих аутоантигенов является обязательным методом при диагностике, в том числе дифференциальной, конкретных ревматических заболеваний

### Системная красная волчанка

Наиболее важным диагностическим критерием при системной красной волчанке (СКВ) является выявление антител к двуспиральной ДНК (дсДНК). Иммуные комплексы, состоящие из дсДНК и соответствующих аутоантител, вызывают поражение подкожного слоя, почек и других органов. Титр антител коррелирует с активностью заболевания. Антитела к нуклеосомам и антигену Sm также имеют диагностическое значение при СКВ. Могут обнаруживаться антитела и к другим полинуклеотидам, рибонуклеотидам, гистонам и другим белковым антигенам.

При лекарственной волчанке (ее клинические симптомы: артралгия, артрит, экзантема, серозит, миалгия, гепатомегалия, спленомегалия) всегда выявляются антитела к гистонам. Эта обратимая форма СКВ может возникать как результат реакции на антибиотики (например, пенициллин, стрептомицин, тетрациклины), химиотерапевтические агенты (изониазид, сульфонамиды), антисудорожные (например, фенитоин, гидантоины), антиаритмические препараты (например, прокаинамид, практолол), симпатолитики (резерпин, гидралазин), психотропные препараты (хлорпромазин), анти-тироидные (производные тиурацила), базовые антиревматические (D пеницилламин), другие препараты (контрацептивы, аллопуринол).



### Аутоантитела при системной красной волчанке

Антиген	Выявляемость, %
Двуспиральная ДНК	60–90
Односпиральная ДНК	70–95
Нуклеосомы	50–95
РНК	50
РНК-хеликаза А	6
Гистоны	50–80
U1-nRNP	15–40
Sm	5–40
SS-A (Ro)	20–60
SS-B (La)	10–20
PCNA (циклин)	3
Ku	10
Рибосомальные Р-белки	10
(Белок теплового шока, 90кДа – Hsp-90)	50)
(Кардиолипид)	40–60)

### Смешанное заболевание соединительной ткани

Высокий титр аутоантител к антигену U1-nRNP характерен для смешанного заболевания соединительной ткани (MCTD), или синдрома Шарпа. Титр антител коррелирует с активностью заболевания.

### Аутоантитела при смешанном заболевании соединительной ткани

Антиген	Выявляемость, %
U1-nRNP	95–100
Односпиральная ДНК	20–50

### Ревматоидный артрит

При ревматоидном артрите примерно в половине образцов обнаруживаются антитела к гистонам, тогда как антитела к U1-nRNP выявляются реже. Антитела к антигену RANA («ядерный антиген, связанный с ревматоидным артритом»), на клетках Нер-2 обнаружить нельзя.

### Антиядерные антитела при ревматоидном артрите

Антиген	Выявляемость, %
Фибрилларин	5–10
PM-Scl (PM-1): основной антиген 75 кДа/100 кДа	13 (10/7)
U1-nRNP	3
(RANA)	90–95)



### Аутоантитела при системной склеродермии (диффузная форма)

Антиген	Выявляемость, %
Scl-70	25–75
РНК-полимераза I	
Ku, в т.ч. при перекрестном синдроме	
7-2-RNP (To)	Редко
NOR-90 (ядрышковый организатор)	Редко

### Полимиозит/дерматомиозит

При поли- и дерматомиозите присутствуют аутоантитела к антигену PM-Scl. Также могут быть выявлены антитела к ядерным антигенам Mi-1, Mi-2, Ku и к антигену Jo-1.

### Аутоантитела при полимиозите и дерматомиозите

Антиген	Выявляемость, %
PM-Scl (PM-1), в т.ч. перекрестный синдром с ПСС	50–70
Jo-1 (гистидил-тРНК-синтетаза)	25–35
Mi-1	10
Mi-2	5
Ku, в т.ч. при перекрестном синдроме	50
Односпиральная ДНК	40–50
PL-7 (треонил-тРНК-синтетаза)	4
PL-12 (аланил-тРНК-синтетаза)	3

### Синдром Шёгрена

При (первичном) синдроме Шёгрена выявляются антитела к антигенам SS-A и SS-B, обычно в сочетании. Кроме того, в 40-60% случаев обнаруживаются аутоантитела к протокам слюнных желез

### Аутоантитела при синдроме Шёгрена

Антиген	Выявляемость, %
SS-A (Ro)	40–95
SS-B (La)	40–95

**Аутоантитела при синдроме Шёгрена**

Антиген	Выявляемость, %
Односпиральная ДНК (RANA)	13 (70)
(Антигены протоков слюнных желез)	40–60
(Ревматоидный фактор)	60–80

**Первичный билиарный цирроз**

Помимо антител к митохондриям, при первичном билиарном циррозе выявляются аутоантитела к различным ядерным антигенам. Часть из них может рассматриваться как патогномоничные. Часто также выявляются антитела к SS-A и центромерам. Их присутствие, а также наличие антител к GP210, указывает на неблагоприятный прогноз.

**Аутоантитела при первичном билиарном циррозе**

Антиген	Выявляемость, %
Ядерные точки	25–40
Ядерная мембрана	20–40
SS-A	20
Центромеры	20–30

Иногда антитела к ядерным антигенам обнаруживаются у здоровых (бессимптомных) лиц, с выявляемостью до 5%, обычно в низком титре (разные классы иммуноглобулинов, но в основном IgM)

**Антитела к ядерным антигенам: основные ассоциированные заболевания**

Заболевание	Выявляемость (%)	
dsDNS Системная красная волчанка (СКВ)	60–90	
ssDNS	СКВ	70–95
	Лекарственная СКВ	
	Смешанное заболевание соединительной ткани (синдром Шарпа), Полимиозит/дерматомиозит,	
	Системная склеродермия, синдром Шёгрена, ревматоидный артрит	
RNS	СКВ	50
	ПСС, Синдром Шёгрена	65

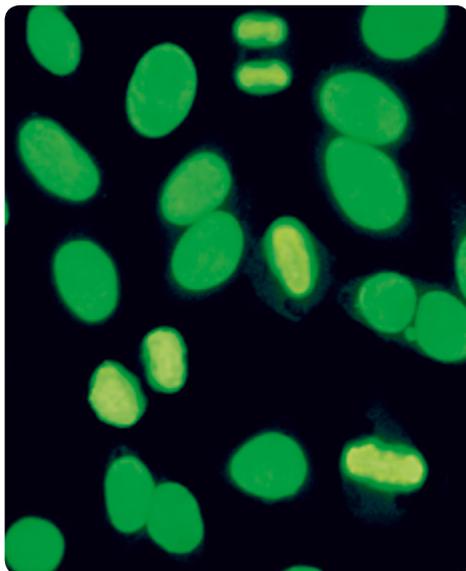
**Антитела к ядерным антигенам: основные ассоциированные заболевания**

Антиген	Заболевание	Выявляемость, %
Гистоны	Лекарственная СКВ	95
	СКВ	50–80
	Ревматоидный артрит	15–50
U1-nRNP	Синдром Шарпа	95–100
	СКВ	15–40
	Ревматоидный артрит	3
Sm	СКВ	5–40
SS-A (Ro)	Синдром Шёгрена	40–95
	СКВ	20–60
	Волчанка новорожденных	100
SS-B (La)	Синдром Шёгрена	40–95
	СКВ	10–20
Фибрилларин	ПСС, диффузная форма	5–10
РНК полимеразы I	ПСС, диффузная форма	4
	Иполимераза I	
РНК-хеликаза A	СКВ	6
PM-Scl (PM-1)	Поли/дерматомиозит/перекрестный синдром	50–70
	ПСС, диффузная форма	5–10
Центромеры	ПСС, ограниченная форма	80–95
Scl-70	ПСС, диффузная форма	25–75
Циклин (PCNA)	СКВ	3
Ku	СКВ	10
	Поли-/дерматомиозит, ПСС	30–55
Mi-1, Mi-2	Дерматомиозит	5–10

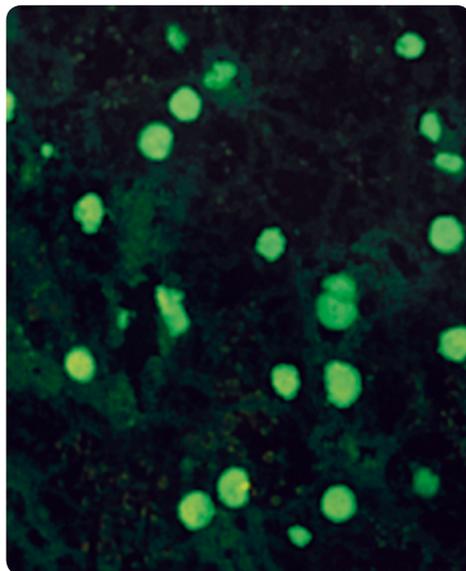
Антитела к цитоплазматическим компонентам клеток Нер-2 не всегда могут быть четко дифференцированы по связанным с ними типам иммунофлуоресцентного свечения. Только немногие из них могут быть ассоциированы с конкретными заболеваниями, например, антитела к митохондриям при первичном билиарном циррозе и антитела против белков Jo-1, PL-7 и PL-12 при полимиозите и дерматомиозите. Другие антитела, редко выявляемые при полимиозите, направлены против антигенов OJ, EJ и частиц, распознающих сигнальные пептиды (SRP). Антитела к другим антигенам цитоплазмы - рибосомам, комплексу Гольджи, лизосомам, компонентам цитоскелета (таким, как виментин и цитокератины) – клинически мало значимы. Диагностическое значение к митоз-ассоциированным антигенам также еще окончательно не прояснено. Учитывая это, становится особенно ясно, насколько иммунологически значимым и ценным с диагностической точки зрения является метод определения антител к ядерным антигенам. 9



## Аутоантитела к антигенам клеточного ядра, гомогенное свечение



Клетки HEp-2



Печень обезьяны

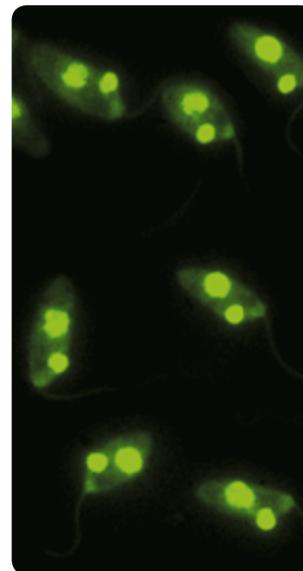
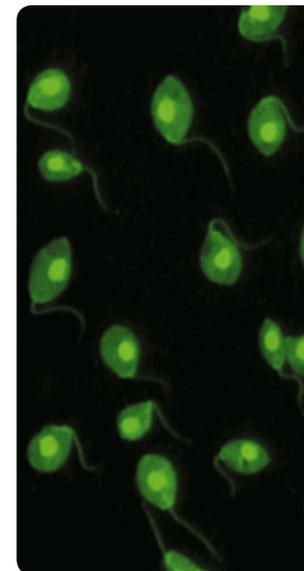
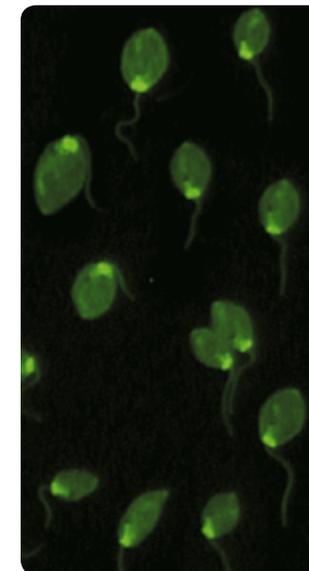
Наблюдается гомогенное свечение ядер **клеток HEp-2**. В клетках, находящихся в состоянии митоза, четко выделяются конденсированные хромосомы, которые окружены темной областью.

При использовании в качестве субстрата среза печени обезьяны наблюдается гомогенное свечение ядер в виде комковидных структур, разных по величине

Известные антигены-мишени: дсДНК, осДНК, нуклеосомы и гистоны.



## Аутоантитела к дсДНК

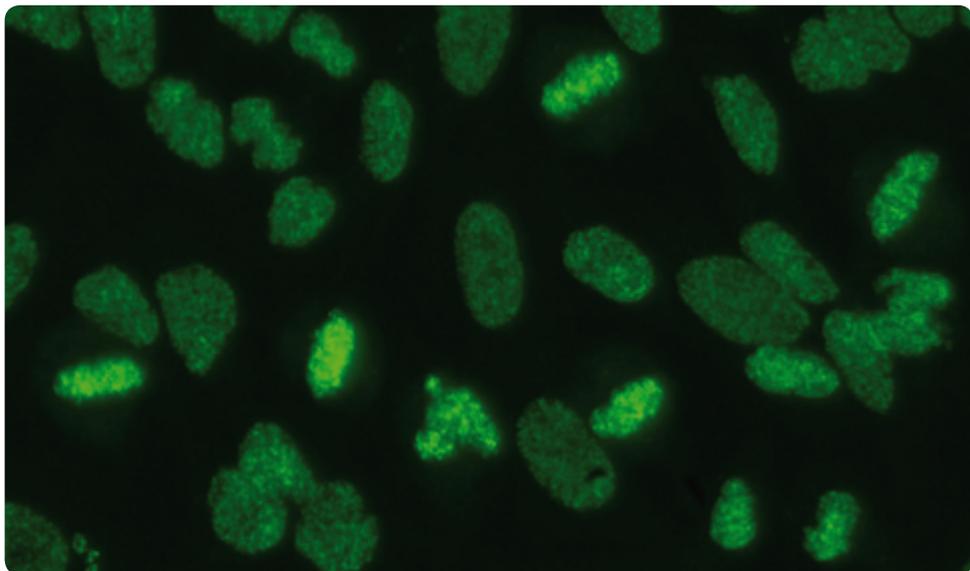
Анти-дсДНК  
положительный  
результат  
(кинетопласт)Анти-дсДНК  
отрицательный  
результат (ядро  
клетки)Анти-дсДНК  
отрицательный  
результат  
(базальное тельце)

Стандартным субстратом для этого иммунофлуоресцентного теста является простейшее жгутиковое *Crithidia luciliae*. Она имеет гигантскую митохондрию (кинетопласт), в которой содержится дсДНК, но практически нет других антигенов, присутствующих в ядре клетки. Поэтому антитела, реагирующие с кинетопластом, направлены исключительно к дсДНК. При их взаимодействии с *C. luciliae* наблюдается гомогенное, иногда подчеркнутое по краям, свечение кинетопласта. Реакция с ядрами клеток не оценивается. Свечение базальных телец жгутиков также не имеет значения. Антитела к осДНК кинетопласт не окрашивают.

Клиническое значение: Аутоантитела к дсДНК выявляются только при системной красной волчанке в 40-90% случаев, в зависимости от метода исследования и активности заболевания



## Аутоантитела к антигену DFS70



Клетки HEp-2

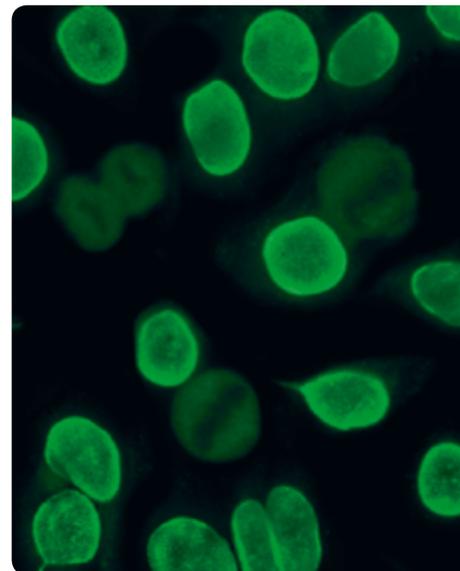
Наблюдается гомогенное свечение ядер **клеток HEp-2** в виде мелких плотных крапинок, с гранулярным свечением хроматина в метафазных клетках.

Известные антигены-мишени: DFS70 или LEDGF (фактор роста эпителия хрусталика)

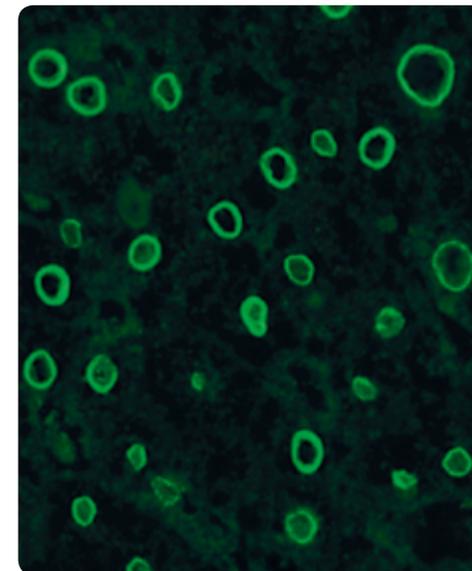
Клиническое значение: Аутоантитела к DFS70 обнаруживаются при многих заболеваниях: атопическом дерматите, бронхиальной астме и интерстициальном цистите, а также и в сыворотках здоровых доноров. Поскольку при системных аутоиммунных ревматических заболеваниях они встречаются редко, обсуждался вопрос, может ли быть выявление этих аутоантител критерием исключения диагноза. Однако недавно было показано, что антитела к PFS70 также присутствуют и при ревматических заболеваниях с частотой до 11%. Поэтому их клиническое значение остается неясным.



## Аутоантитела к антигенам ядерной мембраны



Клетки HEp-2



Печень обезьяны

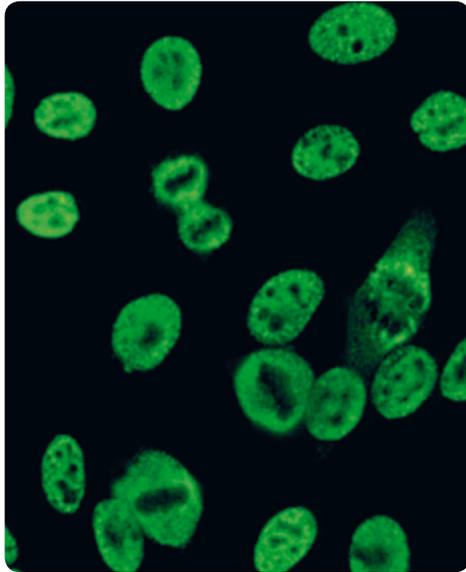
Наблюдается гомогенное свечение ядер клеток HEp-2, усиленное по границе ядер. Хромосомы в митотических клетках остаются темными. На срезах печени обезьяны можно наблюдать характерное линейное окрашивание ядерной мембраны.

Известные антигены-мишени: GP210, ламин А, ламин В, ламин С, рецептор ламина В

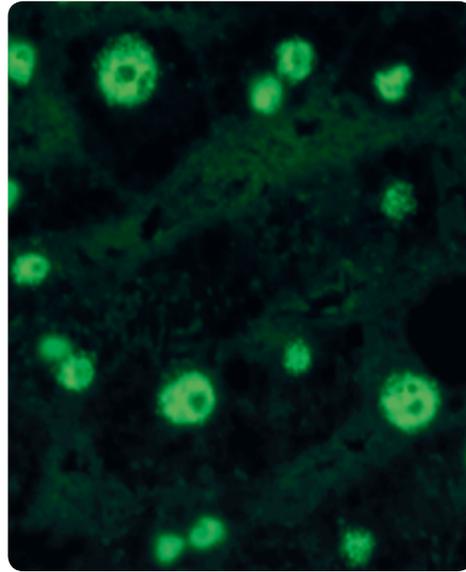
Клиническое значение: Аутоантитела к антигенам ядерной мембраны присутствуют при первичном билиарном циррозе.



### Аутоантитела к нуклеоплазме, крупногранулярное свечение



Клетки HEp-2



Печень обезьяны

При окрашивании клеток HEp-2 наблюдается крупногранулярное (иногда – средне- и мелкогранулярное) свечение всего ядра, за исключением ядрышек. В митотических клетках хромосомы остаются темными, а периферия равномерно окрашена.

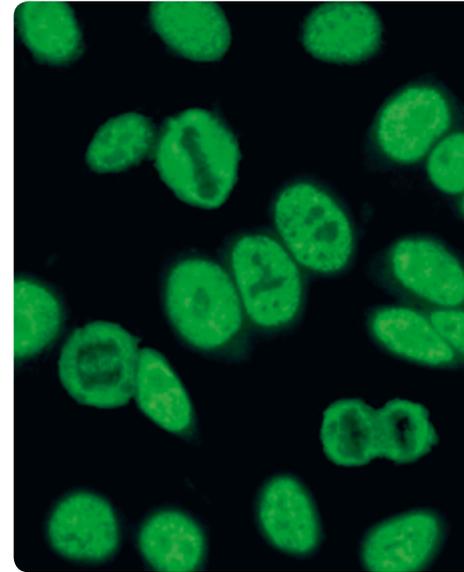
На срезах печени обезьяны также наблюдается гранулярное свечение. С антигенами ядрышек реакции нет. Реакция с ядрами клеток печени обезьяны имеет примерно ту же интенсивность, что и с ядрами клеток HEp-2.

Известные антигены-мишени: U1-nRNP и Sm

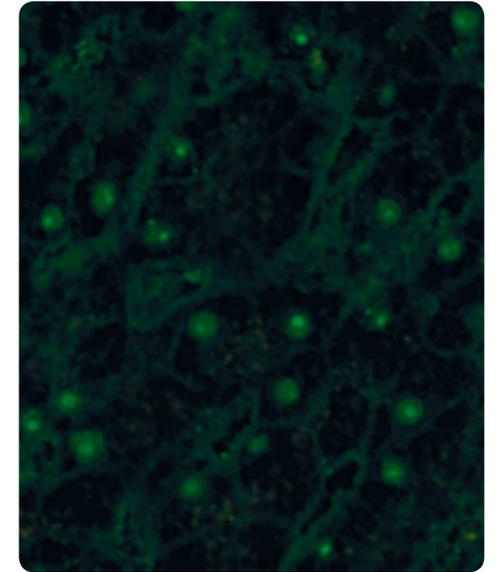
Клиническое значение: Системная красная волчанка и смешанное заболевание соединительной ткани.



### Аутоантитела к нуклеоплазме, мелкогранулярное свечение



Клетки HEp-2



Печень обезьяны

При окрашивании клеток HEp-2 наблюдается мелкогранулярное свечение ядер клеток, находящихся в интерфазе. Ядрышки также светятся, причем они слегка выделяются на фоне кариоплазмы; в некоторых образцах ядрышки могут вообще не окрашиваться. В митотических клетках можно видеть гранулярное окрашивание, не затрагивающее хромосомы.

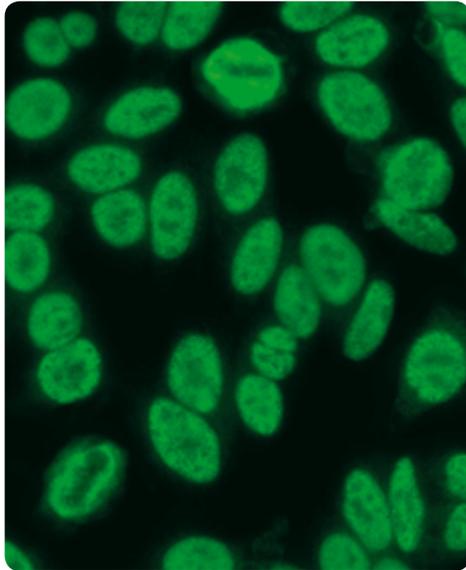
На срезах печени обезьяны не наблюдается гранулярное свечение ядер гепатоцитов, но в образцах с высоким титром антител может быть равномерное свечение ядрышек.

Известные антигены-мишени: SS-A и SS-B

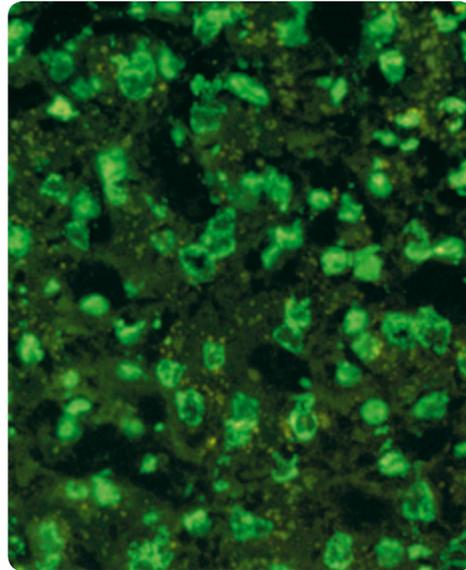
Клиническое значение: Синдром Шёгрена, системная красная волчанка и лекарственная волчанка новорожденных.



## Аутоантитела к антигену Ku



Клетки HEp-2



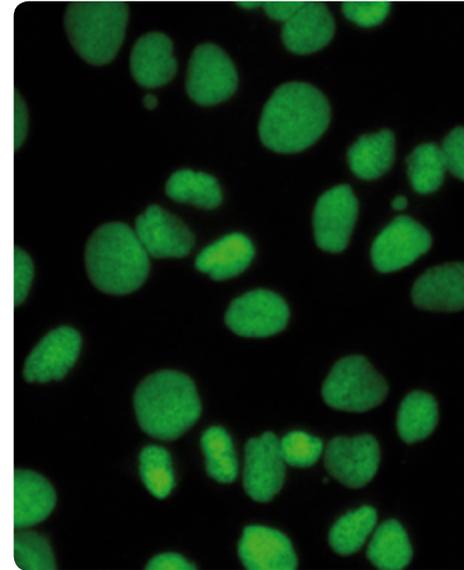
Печень обезьяны

На клетках HEp-2: свечение ядер клеток в виде мелких крапинок; ядрышки окрашиваются частично. По характеру свечения реакцию с Ku трудно отличить от реакции с антигенами SS-A, SS-B, Sm и RNP. Однако при параллельном тестировании образца на срезах печени обезьяны видны типичные крапчатые комочки, наличие которых является почти стопроцентным доказательством присутствия антител к антигену Ku.

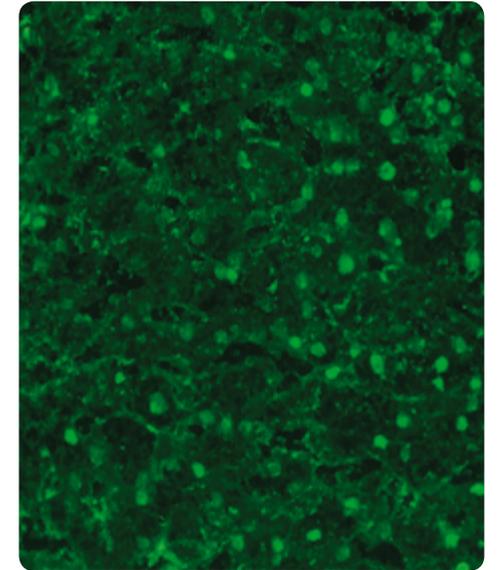
Клиническое значение: Антитела к Ku встречаются в 25-50% случаев перекрестного синдрома поли-/дерматомиозита и системной склеродермии (с частым присоединением первичной легочной гипертензии), в 10% случаев СКВ и до 5% случаев системной склеродермии.



## Аутоантитела к антигену Mi-2



Клетки HEp-2



Печень обезьяны

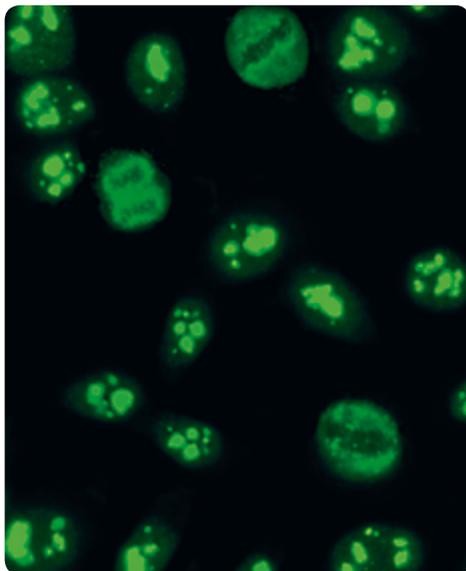
На клетках HEp-2: свечение ядер клеток в виде мелких крапинок. часть ядрышек не окрашена.

На срезах печени обезьяны: мелкогранулярное свечение ядер гепатоцитов.

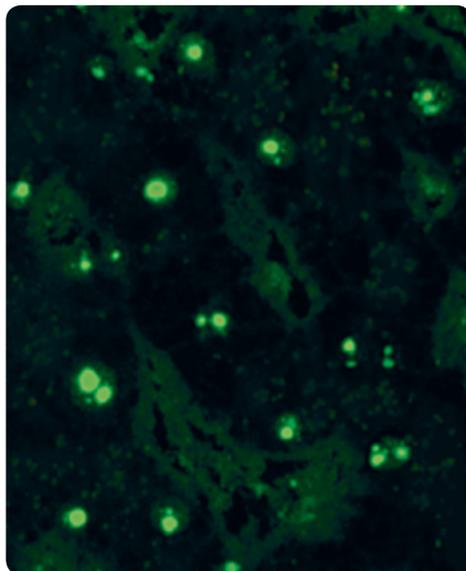
Клиническое значение: Антитела к Mi-2 — высокоспецифический маркер дерматомиозита с гипертрофией ногтевого валика. Они выявляются у 15-30% больных дерматомиозитом и в 8-12% - идиопатическим миозитом.



## Аутоантитела к антигену PM-Scl



Клетки HEp-2



Печень обезьяны

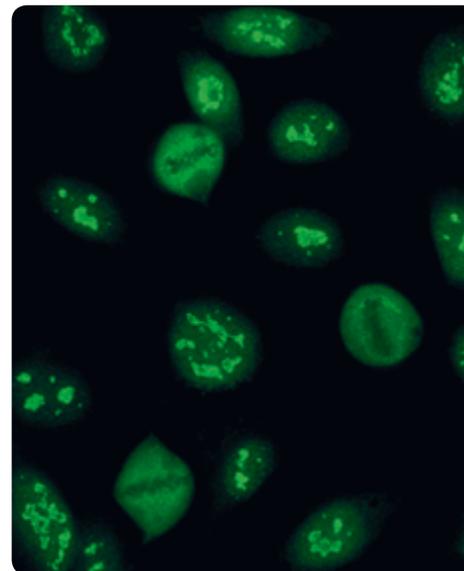
На клетках HEp-2: гомогенное свечение ядрышек и одновременно более слабое, с мелкими крапинками, свечение нуклеоплазмы. В митотических клетках хромосомы не окрашиваются и окружены областями мелко-крапчатого свечения.

На срезах печени обезьяны: гомогенное свечение ядрышек, а также очень слабое, от мелко-крапчатого до сетчатого свечения клеточных ядер.

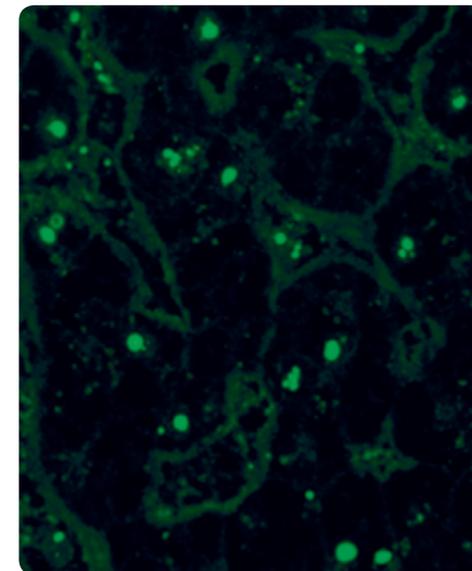
Клиническое значение: Антитела к PM-Scl встречаются в 18% случаев перекрестного синдрома полимиозита и системной склеродермии. В этом случае они обычно направлены на оба основных антигена PM-Scl75 и PM-Scl100. У больных только с системной склеродермией антитела к PM-Scl75 выявляются в 10% случаев, а к PM-Scl100 – в 7% случаев. При работе с тест-системами, выявляющими антитела только к PM-Scl100, некоторые больные с системной склеродермией не будут обнаружены.



## Аутоантитела к РНК-полимеразе I



Клетки HEp-2



Печень обезьяны

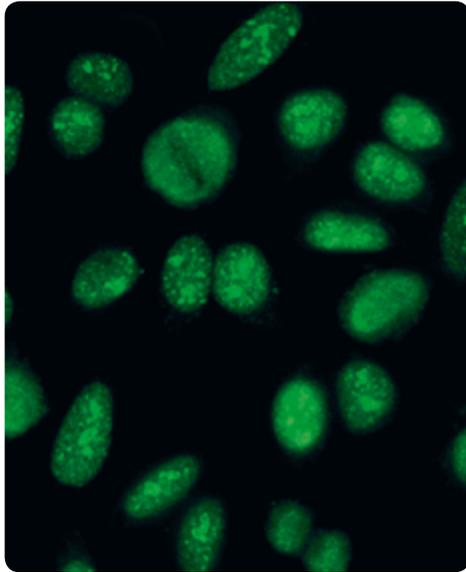
На клетках HEp-2: гранулярное свечение ядрышек. Нуклеоплазма почти темная.

В митотических клетках область конденсированных хромосом не окрашена, вокруг них наблюдается равномерное или мелкогранулярное свечение. Также могут присутствовать одна или несколько светящихся точек, соответствующих ядрышковому организатору.

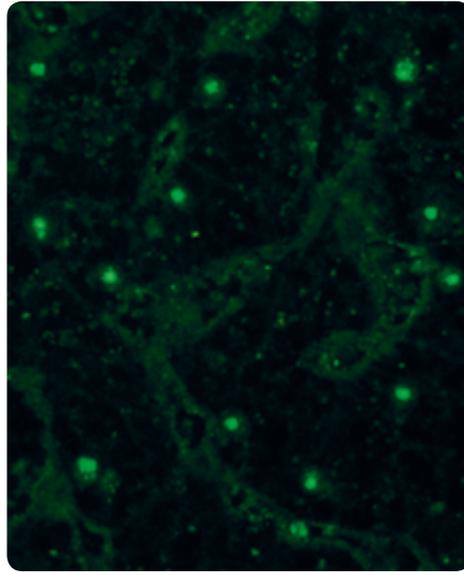
Клиническое значение: Антитела к РНК-полимеразе I на сегодняшний день обнаружены только при диффузной форме системной склеродермии с частотой встречаемости 4%.



## Аутоантитела к U3-nRNP/фибрилларину



Клетки HEp-2



Печень обезьяны

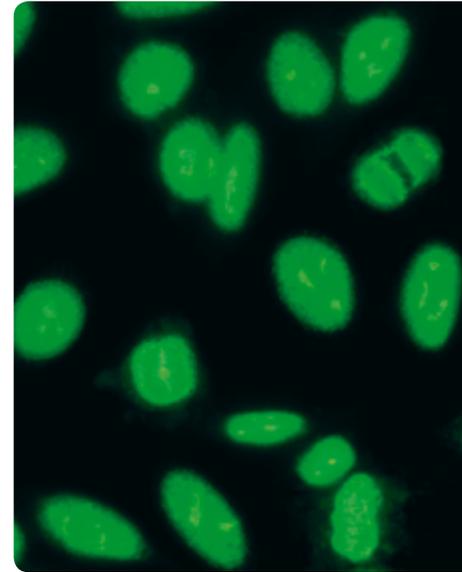
На клетках HEp-2: гранулярный тип свечения ядрышек в интерфазных клетках. В митотических клетках — свечение около хромосом в виде венца.

На срезах печени обезьяны: гомогенное свечение клеточных ядер.

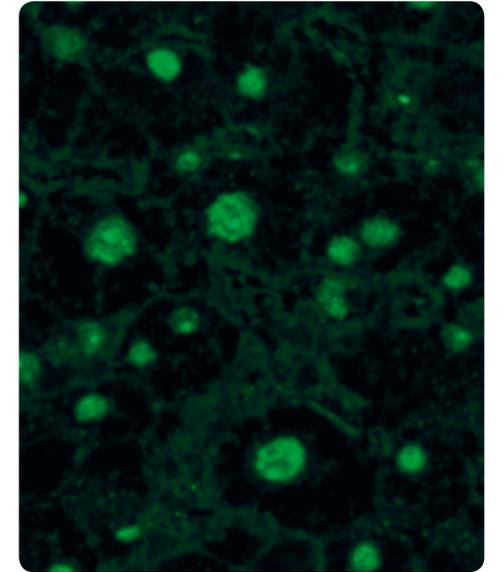
Клиническое значение: Антитела к фибрилларину на сегодняшний день обнаружены только при диффузной форме системной склеродермии с частотой встречаемости 5–10%.



## Аутоантитела к антигену Scl-70



Клетки HEp-2



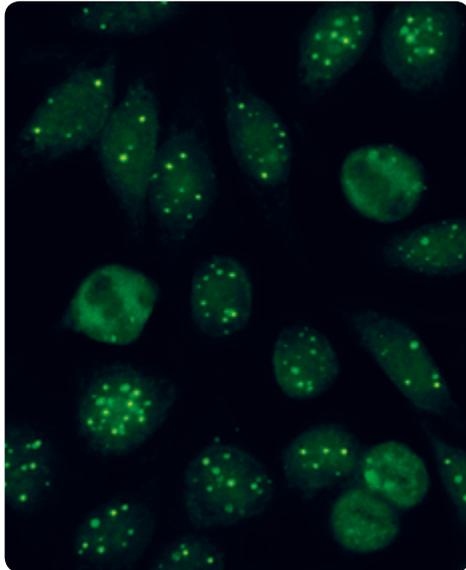
Печень обезьяны

На клетках HEp-2: в интерфазных клетках — почти гомогенное свечение ядер. Ядрышки также гомогенны и выделяются на фоне нуклеоплазмы. Цитоплазма остается темной. В митотических клетках флуоресцирует только граничная часть конденсированных хромосом.

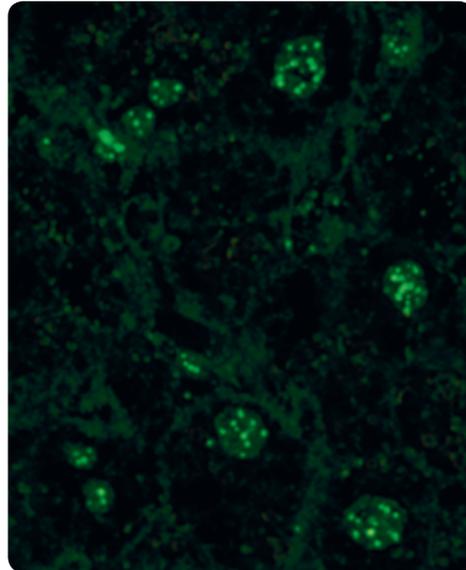
Клиническое значение: Антитела к Scl-70 выявляются при диффузной форме системной склеродермии с частотой встречаемости 25–75%, в зависимости от используемого метода анализа и активности заболевания.



## Аутоантитела к ядерным точкам



Клетки Нер-2



Печень обезьяны

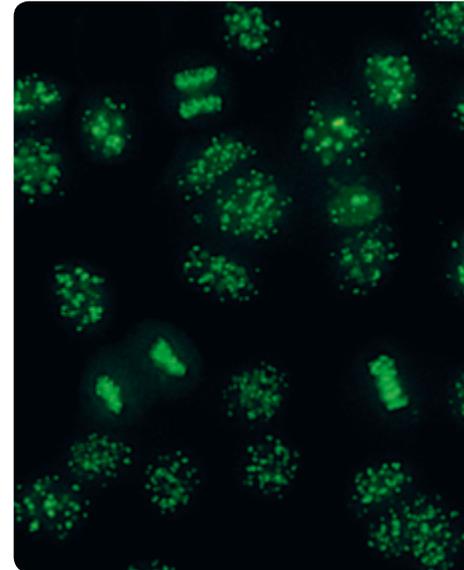
На клетках Нер-2: в интерфазных клетках – от пяти до более, чем двадцати гранул разных размеров, распределенных по ядру (ядерные точки). Цитоплазма остается темной, если только в образце не присутствуют антитела к митохондриям, ассоциированные с первичным билиарным циррозом. В митотических клетках ядерные точки исчезают. Могут светиться только изолированные гранулы вне неокрашенных хромосом.

Известные антигены-мишени: Sp100, Sp140, PML, SUMO

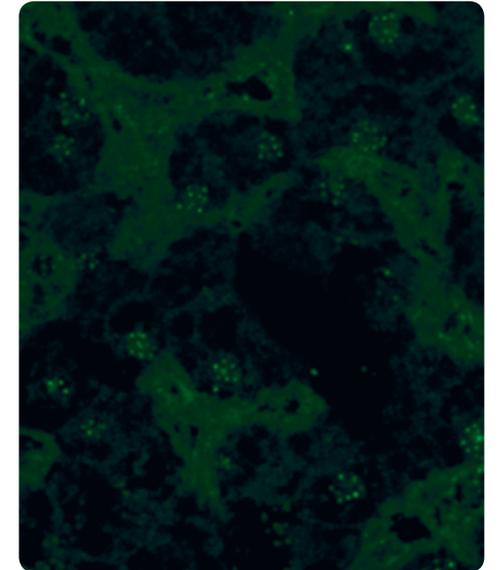
Клиническое значение: Первичный билиарный цирроз; выявляются у 10–30% больных.



## Аутоантитела к центромерам



Клетки Нер-2



Печень обезьяны

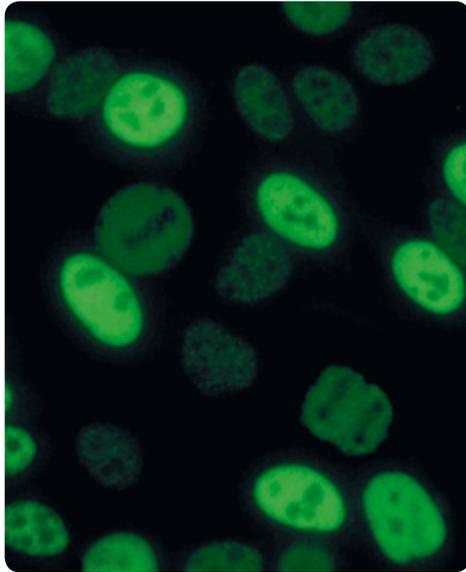
На клетках Нер-2: очень характерный тип свечения: гранулы небольшого и примерно одинакового размера (обычно 46 или 92 центромер на ядро). В интерфазных клетках эти гранулы равномерно распределены в ядре, тогда как в митотических клетках они образуют лентовидную структуру — одну посередине ядра (метафаза) или две параллельные (анафаза).

На срезах печени обезьяны: 10–20 гранул, распределенных в ядре. Их свечение значительно слабее, чем в клетках Нер-2, поэтому его легко не заметить. Митотические клетки на этом субстрате обнаруживаются редко.

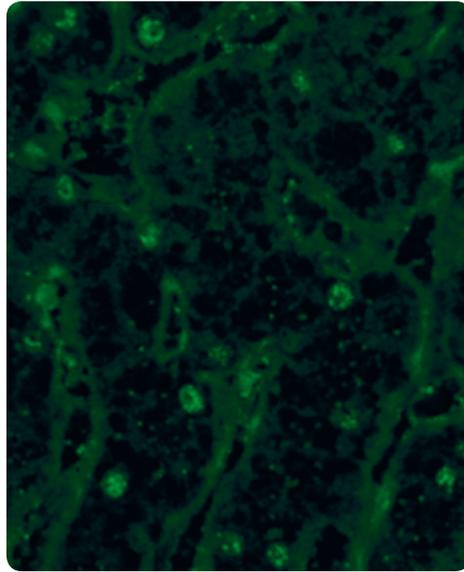
Клиническое значение: Наличие антител к центромерам с высокой специфичностью свидетельствует об ограниченной форме системной склеродермии с частотой встречаемости 80–95%. При этой форме заболевания в большей степени затронуты конечности, в меньшей степени внутренние органы.



## Аутоантитела к PCNA



Клетки HEp-2



Печень обезьяны

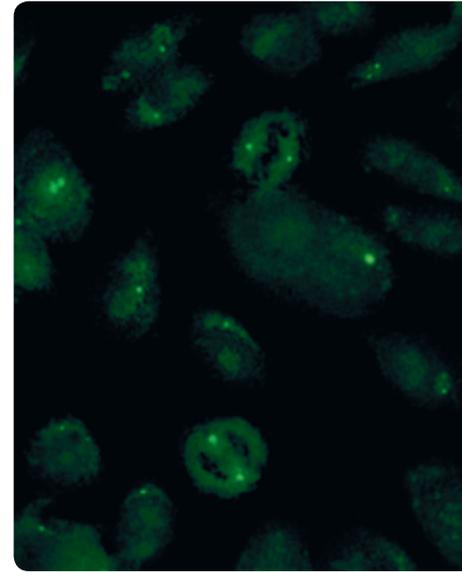
На клетках HEp-2: тип свечения зависит от стадии клеточного цикла. Для половины ядер интерфазных клеток характерно яркое, с мелкими крапинками свечение, без окрашивания ядрышек. У другой половины клеток тип свечения тот же, но интенсивность меньше примерно в 10 раз. В митотических клетках конденсированные хромосомы не окрашиваются. Окружающая их часть клетки дает слабое мелко-крапчатое свечение, соответствующее по типу и интенсивности слабо окрашиваемой фракции ядер интерфазных клеток.

На срезах печени обезьяны: чаще всего отрицательная реакция

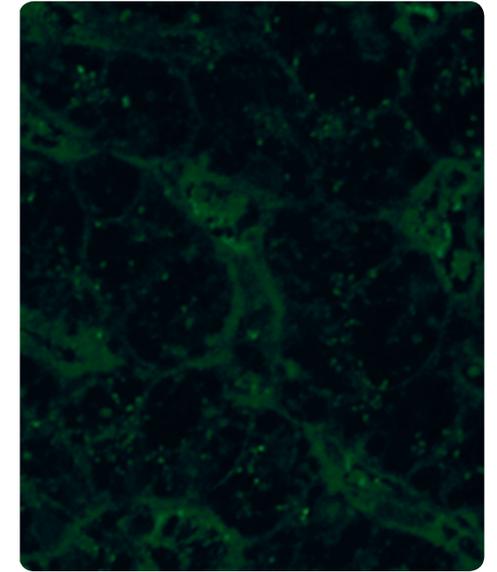
Клиническое значение: Антитела к PCNA специфичны для системной красной волчанки, но встречаются только в 3% случаев.



## Аутоантитела к центриолям



Клетки HEp-2



Печень обезьяны

Клетки HEp-2; Печень обезьяны

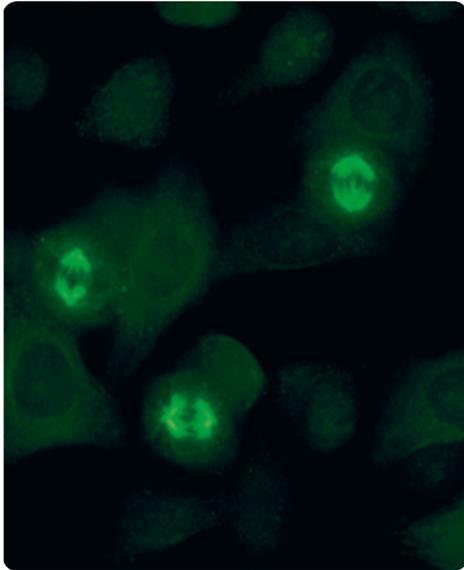
На клетках HEp-2: типичное свечение флуоресцирующие центриоли в цитоплазме, одна или две на клетку. В митотических клетках центриоли расположены на противоположных полюсах.

На срезах печени обезьяны: в образцах с высоким титром антител выявляются мелкие флуоресцирующие точки в цитоплазме гепатоцитов.

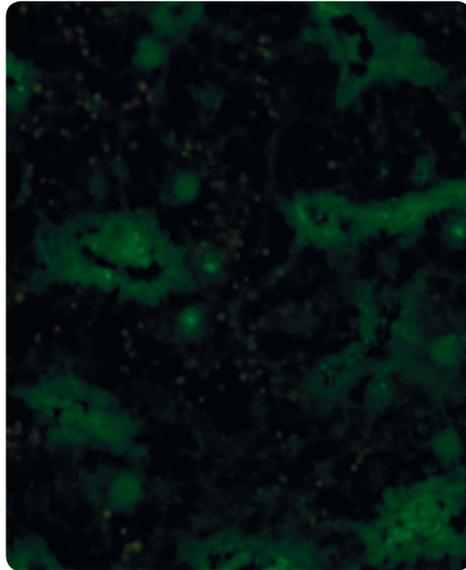
Клиническое значение: Высокий титр антител к центриолям (> 1:1000) указывает на системную склеродермию или синдром Рейно. Но частота встречаемости составляет всего несколько процентов.



## Аутоантитела к антигенам митотического веретена



Клетки HEp-2



Печень обезьяны

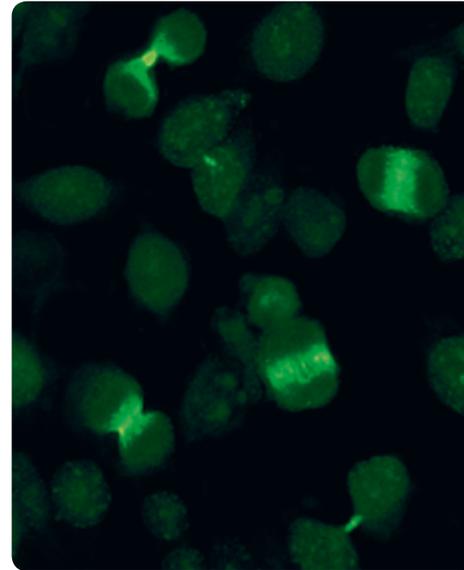
На клетках HEp-2: выявляются антитела к антигенам MSA1 и MSA2 (HSAG5). Антитела к MSA1 дают мелкогранулярное или сетчатое свечение ядерного матрикса в интерфазных клетках. Ядрышки не светятся. Антитела к MSA-2 ядра интерфазных клеток не окрашивают.

На срезах печени обезьяны: можно наблюдать гранулярное свечение клеточных ядер.  
мелкие флуоресцирующие точки в цитоплазме гепатоцитов.

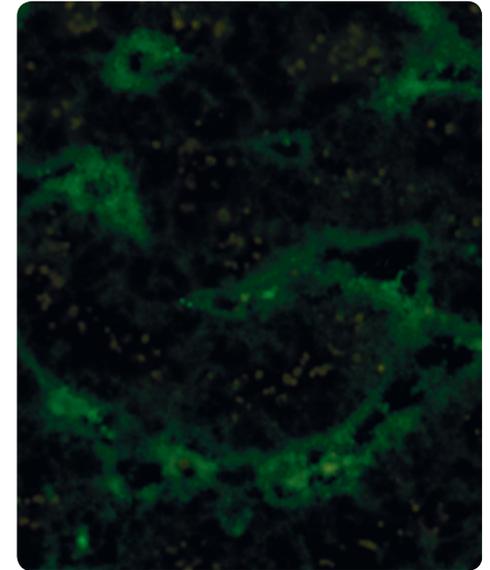
Клиническое значение: Антитела к MSA-1 ассоциированы с синдромом Шёгрена, но они выявляются и при других ревматических заболеваниях. Антитела к MSA-2 встречаются преимущественно при системной красной волчанке.



## Аутоантитела к антигенам клеточной пластинки



Клетки HEp-2



Печень обезьяны

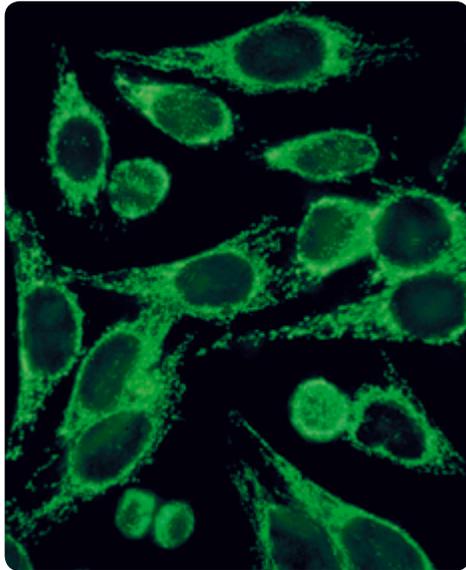
На клетках HEp-2: в клетках, находящихся в метафазе, при наличии антител к антигенам клеточной пластинки наблюдается мелкогранулярное свечение срединной плоскости клетки. В противоположность типу свечения, вызванному антителами к центромерам, эта светящаяся полоса остается в середине клетки до завершения митоза. Ее длина соответствует ширине клетки в зоне деления и постепенно укорачивается, пока в телофазе не превращается в светящуюся точку в месте последнего контакта делящихся клеток («прощальный поцелуй»). Примерно половина интерфазных клеток содержит более крупные светящиеся пятна; другая половина не окрашивается.

На срезах печени обезьяны: только неспецифическая флуоресценция.

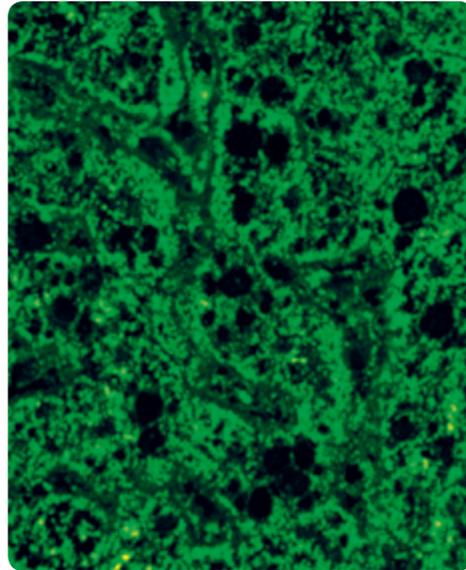
Клиническое значение: Диагностическое значение этих антител все еще неизвестно.



## Аутоантитела к митохондриям



Клетки HEp-2



Печень обезьяны

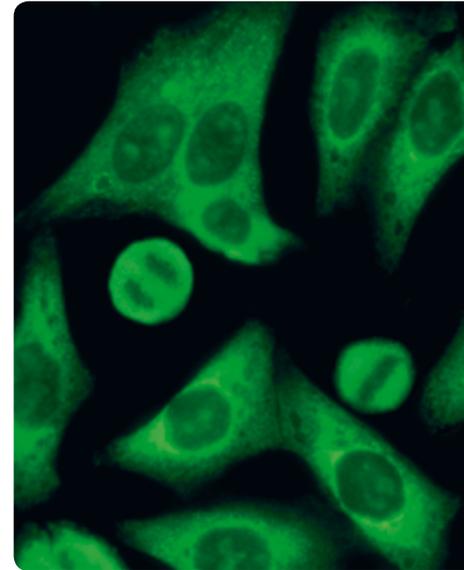
Клетки HEp-2 содержат антигены M2, M3, M5 и M9; антитела к ним вызывают крупногранулярное свечение цитоплазмы клеток, но не ядер (ранее свечение в виде ядерных точек, также ассоциированное с первичным билиарным синдромом, ошибочно оценивалось как реакция с отдельными митохондриями)

На срезах печени обезьяны: гранулярное свечение цитоплазмы. Ядра остаются темными. Свечение обычно менее выраженное, чем в клетках HEp-2.

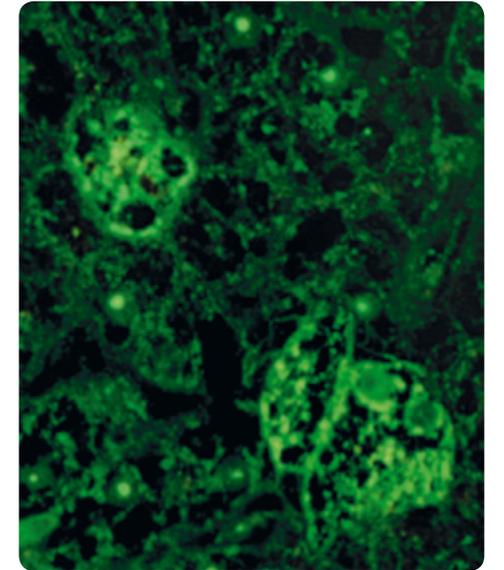
Клиническое значение: Антитела к митохондриям присутствуют при различных заболеваниях, часто вместе с другими аутоантителами, например, против антигенов клеточного ядра. Антитела к антигенам митохондрий особенно важны для диагностики первичного билиарного цирроза. Частота встречаемости — до 98%.



## Аутоантитела к рибосомальным Р-белкам



Клетки HEp-2



Печень обезьяны

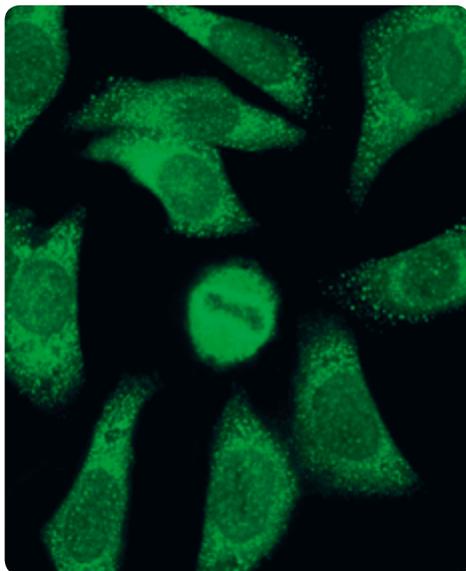
На клетках HEp-2: равномерное или мелкогранулярное окрашивание цитоплазмы

На срезах печени обезьяны: свечение всей цитоплазмы, более выраженное в некоторых участках. При низком титре антител реакция отсутствует.

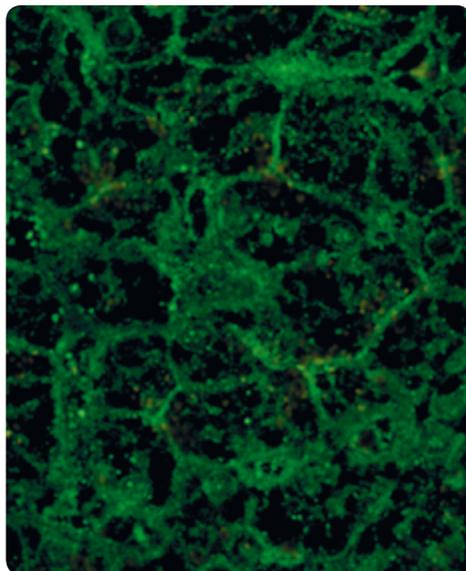
Клиническое значение: Наличие антител к рибосомальным Р-белкам – отличительный признак системной красной волчанки. Встречаются примерно в 10% случаев.



## Аутоантитела к антигену Jo-1



Клетки HEp-2



Печень обезьяны

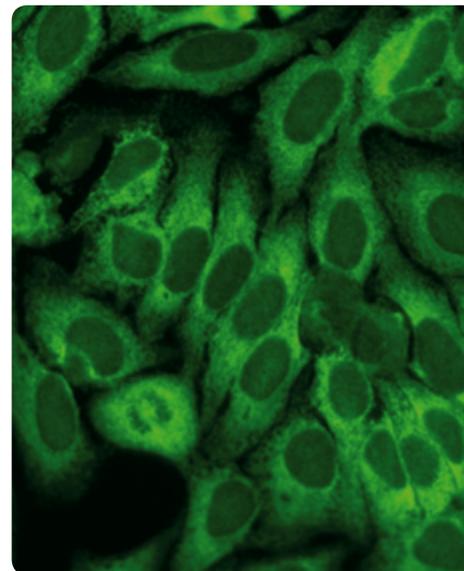
На клетках HEp-2: мелкогранулярное или равномерное окрашивание цитоплазмы. Во многих случаях в ядрах видны окрашенные четкие точки. По современным данным, эти ферменты локализуются не только в цитоплазме, но и найдены в клеточных ядрах некоторых видов животных.

На срезах печени обезьяны: цитоплазма окрашивается слабо. В диагностических целях не используют.

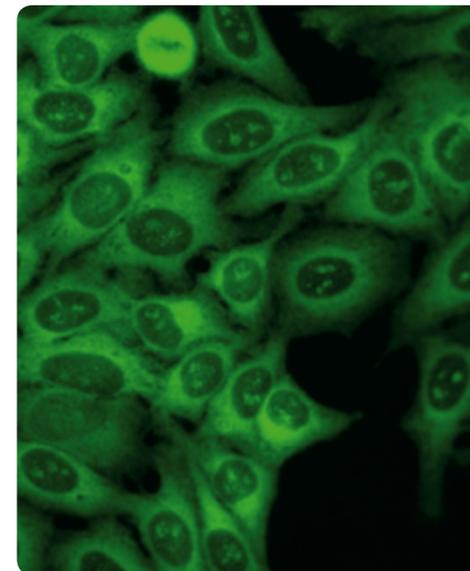
Клиническое значение: Антитела к Jo-1 присутствуют в сыворотках больных полимиозитом в 25–35% случаев. Они часто обнаруживаются и при других аутоиммунных заболеваниях – системной красной волчанке, системной склеродермии, интерстициальном фиброзе легких, синдроме Рейно и полисиновите.



## Аутоантитела к антигенам SRP и PL-12



Клетки HEp-2



Клетки HEp-2

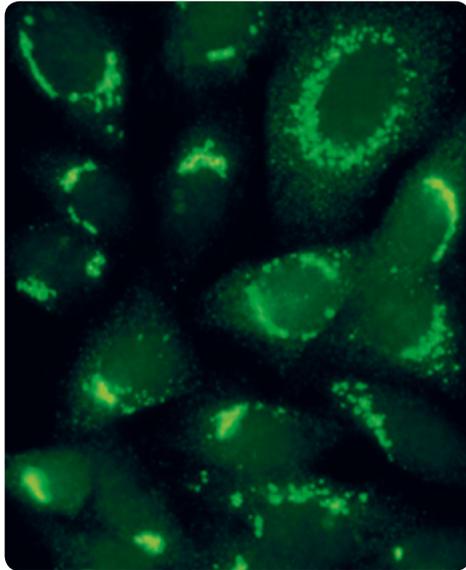
На клетках HEp-2: реакция с аутоантителами к SRP (слева) приводит к равномерному или мелкогранулярному окрашиванию цитоплазмы. В митотических клетках хромосомы не окрашены, тогда как свечение областей вокруг них усилено.

Аутоантитела к PL-12 (справа) дают мелкогранулярное окрашивание цитоплазмы. Во многих случаях выявляются четкие точки в области клеточных ядер. По современным данным, эти ферменты локализуются не только в цитоплазме, но и найдены в клеточных ядрах некоторых видов животных.

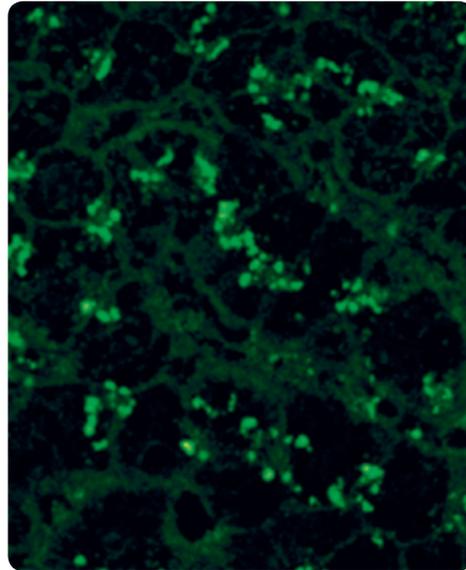
Клиническое значение: Антитела к SRP могут присутствовать в сыворотках больных полимиозитом дерматомиозитом примерно в 5% случаев. Они также являются маркерами некротизирующей миопатии, аутоиммунного заболевания, отличного от полимиозита, но имеющего ту же кожную симптоматику, что и дерматомиозит. Антитела к PL-12 выявляются при миозитах с частотой 3%.



## Аутоантитела к комплексу Гольджи



Клетки HEp-2



Печень обезьяны

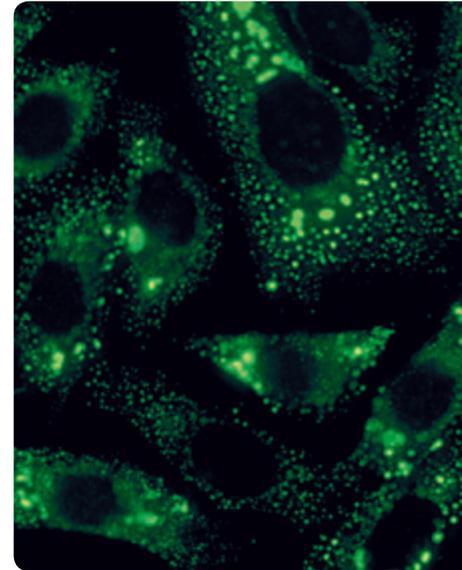
На клетках HEp-2: сетчато-гранулярные структуры в цитоплазме, контактирующие с ядром. В митотических клетках мембраны комплекса Гольджи в большой степени измельчены. Поэтому антитела к ним не дают реакции.

На срезах печени обезьяны: цитоплазма гепатоцитов также окрашивается.

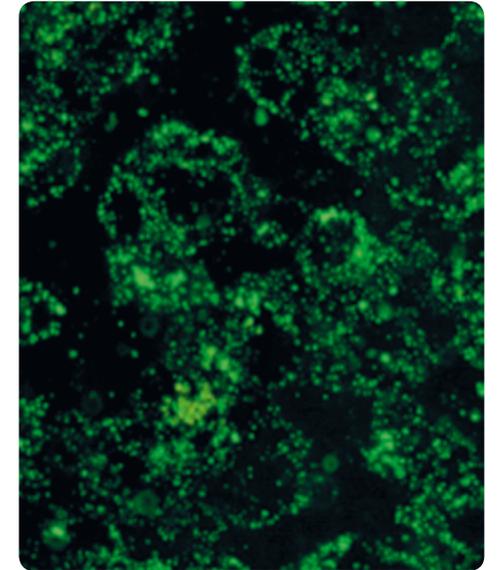
Клиническое значение: Антитела к комплексу Гольджи присутствуют при аутоиммунных заболеваниях, в особенности при системной красной волчанке и синдроме Шегрена. Из-за низкой клинической специфичности выявление этих антител большого диагностического значения не имеет.



## Аутоантитела к лизосомам



Клетки HEp-2



Печень обезьяны

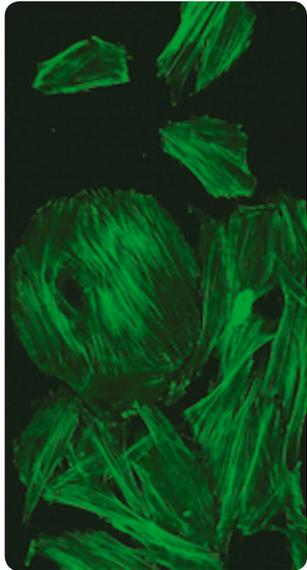
На клетках HEp-2: в цитоплазме наблюдается свечение каплевидных структур разного размера.

На срезах печени обезьяны: только неспецифическая флуоресценция.

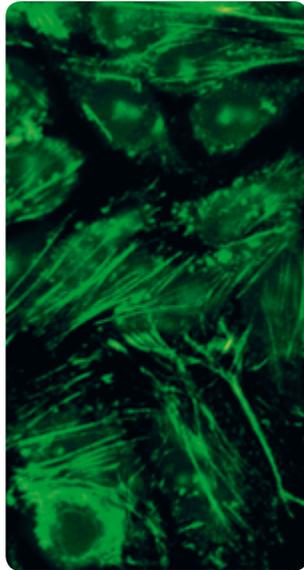
Клиническое значение: Диагностическое значение не установлено. Иногда обнаруживаются и в сыворотках здоровых лиц.



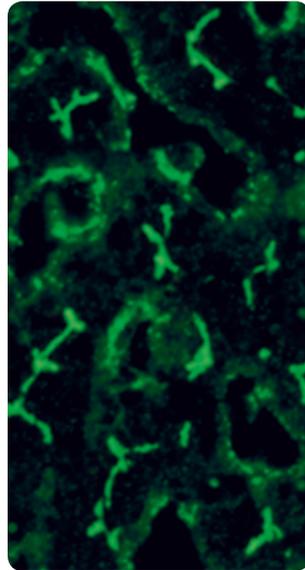
## Аутоантитела к F-актину



Клетки VSM47



Клетки HEp-2



Печень обезьяны

На клетках VSM47 (от “vascular smooth muscle” - гладкомышечные клетки сосудов): наблюдается свечение в виде тонких нитей (микрофиламентозное)

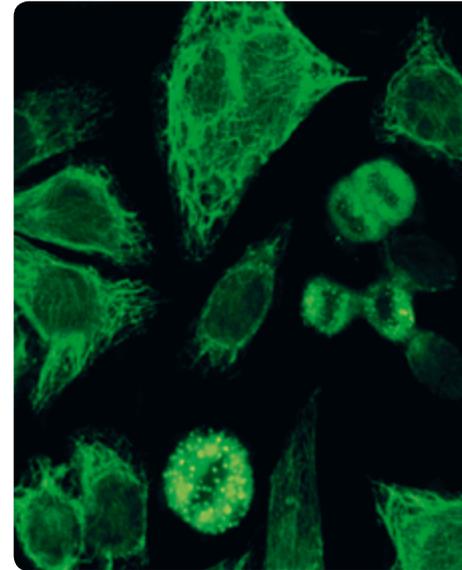
На клетках HEp-2: окрашиваются волокнистые структуры, отдельные или собранные в пучок. Эти структуры в основном расположены в цитоплазме, но могут также и пересекать клеточные ядра.

На срезах печени обезьяны: сильная реакция с желчными канальцами.

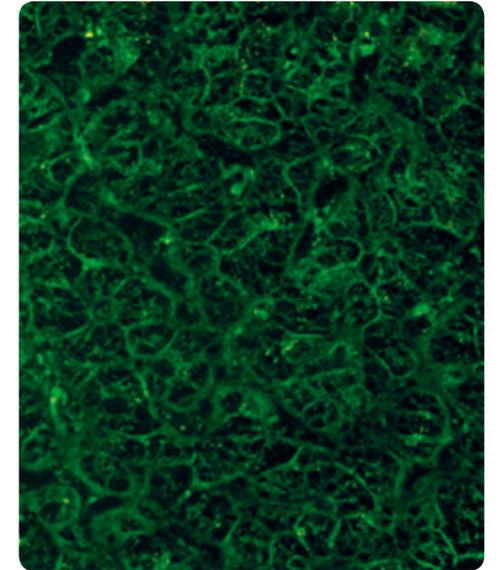
Клиническое значение: Определение антител к F-актину особенно важно для диагностики аутоиммунного гепатита (встречаются в примерно 50% случаев), исключения комбинированного заболевания печени (перекрестный синдром) и для дифференциальной диагностики между аутоиммунным гепатитом и алкогольным или лекарственным циррозом печени, а также другими хроническими воспалительными заболеваниями: вирусными гепатитами, первичным билиарным циррозом печени, первичным склерозирующим холангиитом.



## Аутоантитела к виментину



Клетки HEp-2



Печень обезьяны

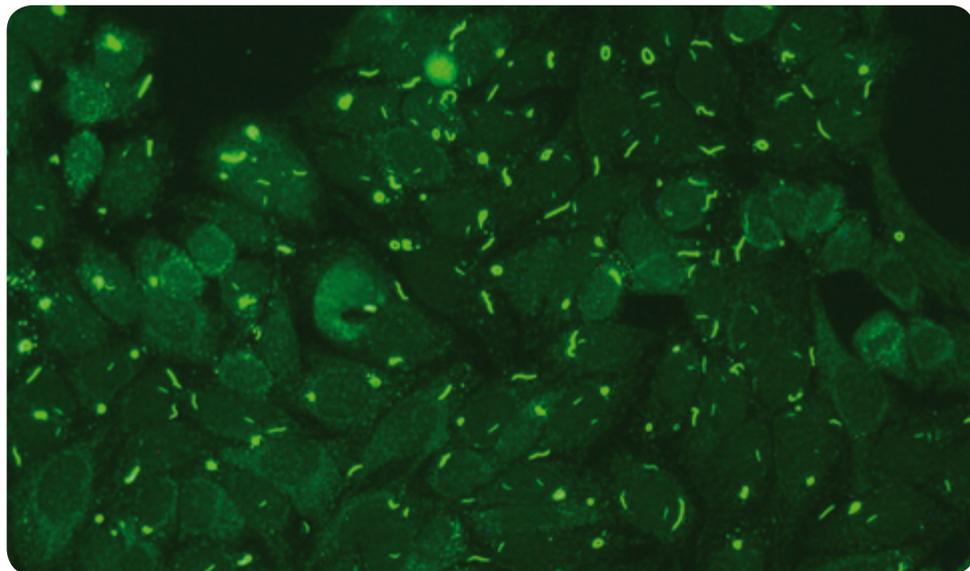
На клетках HEp-2: в цитоплазме видна сеточка из тонких волокон, более плотная в участках, прилежащих к ядру. В митотических клетках наблюдаются многочисленные круглые капельки, расположенные вокруг несветящегося хромосом. Возможно, это сконцентрированный виментин.

На срезах печени обезьяны: только неспецифическая флуоресценция.

Клиническое значение: Диагностическое значение под вопросом. То же можно сказать о редко выявляемых аутоантителах к цитокератину, тропомиозину, винкулину и др.



## Цитоплазматические кольца и палочки



Клетки Нер-2

На клетках Нер-2: такой тип свечения описан совсем недавно. Эти филаментозные структуры в виде колец, палочек и петель, присутствуют на всех стадиях клеточного цикла. Предполагается, что аутоантигеном является инозинмонофосфатдегидрогеназа 2 (IMPDH2). (Seelig et al.).

Клиническое значение: Этот тип свечения наблюдается в основном у больных гепатитом С, особенно после лечения альфа-интерфероном или рибавирином (встречаются в 35% случаев).



## Титрование образцов для реакции непрямой иммунофлуоресценции

Для работы с иммунофлуоресцентными тест-системами EUROIMMUN рекомендуется титрование образцов сыворотки с шагом 1:10 или 1:3,2 (корень квадратный из 10). Конкретные разведения определяются без сложных арифметических расчетов: 1:10, 1:32, 1:100, 1:320, 1:1000 и т.д. Раньше использовалась схема с квадратичным шагом разведения, более точная, но с чересчур малым шагом титрования. С другой стороны, титрование с шагом 4 дает слишком грубый результат.

Для каждого определяемого параметра (тех или иных аутоантител) существует оптимальное стартовое разведение. Для упрощения методики и оценки результатов, в тестах EUROIMMUN принято выделять две категории антител. Антитела группы I имеют диагностическое значение уже при титре 1:10, для антител группы II первым разведением является 1:100.

При определении титра каждого образца используются символы от «+» до «++++». В приведенной ниже схеме разное клиническое значение титра антител групп I и II уже учтено.

Разведение сыворотки	1:10	1:32	1:100	1:320	1:1.000	1:3.200	1:10.000
Оценка, группа I	+	++	++	+++	+++	++++	++++
Оценка, группа II			+	++	+++	++++	++++

■ = Зеленым выделены стартовые разведения

+ - слабоположительный образец, ++ - положительный, +++ - сильно положительный, ++++ - высокоположительный

Группа I: большинство органоспецифических аутоантител, антитела к гранулоцитам, антитела к дсДНК

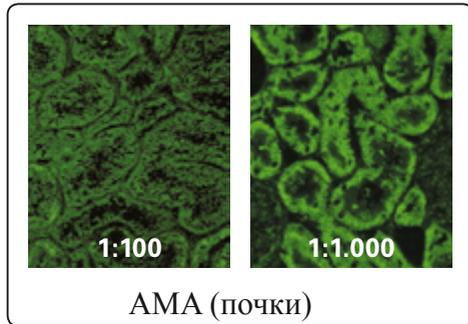
Группа II: янтядерные (ANA), антимитохондриальные (AMA), аутоантитела к гладкомышечным клеткам (ASMA),

аутоантитела к клеткам скелетной мышцы

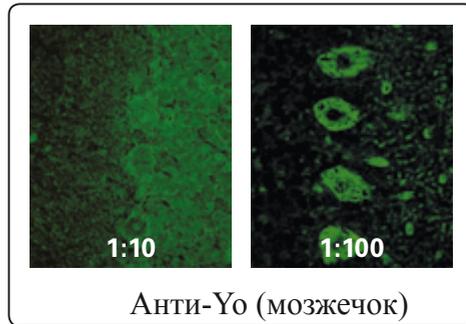
Для того, чтобы использовать возможности огромного потенциала метода непрямой иммунофлуоресценции оптимальным образом, следует всегда использовать два разведения образца. Это верно для практически всех выявляемых антител, и причины этого следующие:



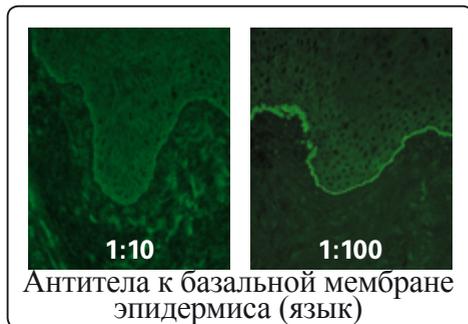
Блокирующий эффект: примерно в 2 из 100 высокотитражных сывороток реакция со стартовым разведением приводит к нетипичному.



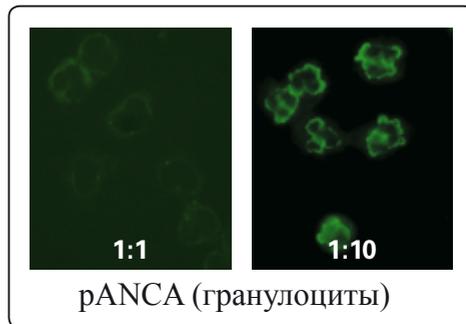
АМА (почки)



Анти-Уо (мозжечок)

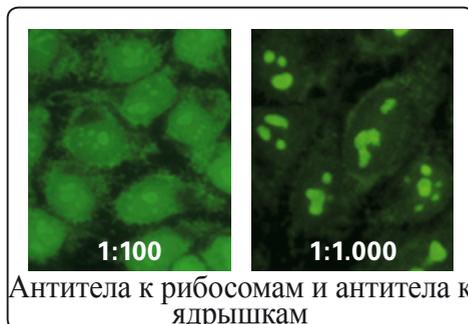


Антитела к базальной мембране эпидермиса (язык)

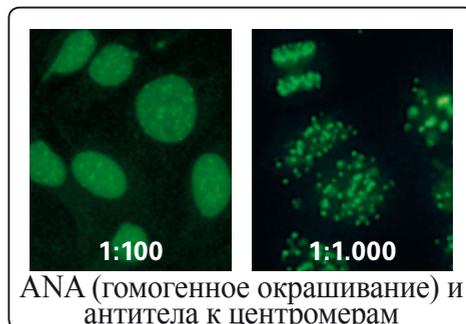


pANCA (гранулоциты)

Маскировка аутоантител: если в образце присутствуют в слишком высокой концентрации неспецифические антитела или преобладают аутоантитела к другому антигену, они могут замаскировать результат реакции исследуемых аутоантител.



Антитела к рибосомам и антитела к ядрышкам



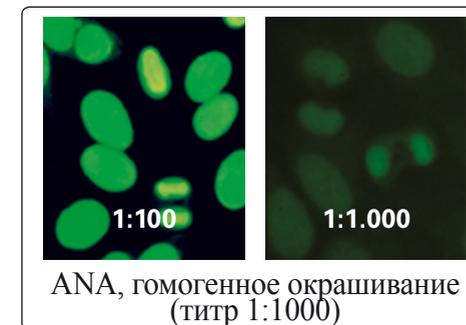
АНА (гомогенное окрашивание) и антитела к центромерам



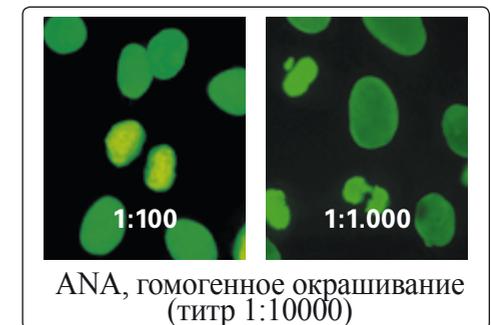
Определение титра. При использовании двух разведений и шага титрования, равного 10, для большинства положительных результатов титр можно определить, не прибегая к уточняющей перестановке реакции. Результат будет получен на день раньше, чем при последовательном титровании.

Свечение при		Титр аутоантител
1:100	1:1.000	
Слабое	Отрицательное	1:100
Сильное	Отрицательное	1:320
Сильное	Слабое	1:1.000
Сильное	Умеренное	1:3.200
Сильное	Сильное	1:10.000

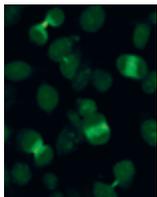
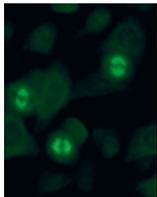
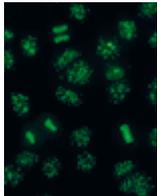
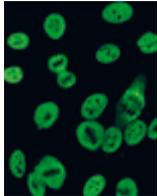
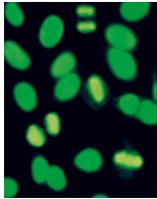
Напротив, при постановке реакции с одним разведением образца оценить положительный результат полуколичественно невозможно. Реакция с разными аутоантителами при разведении образца будет разной, в зависимости от их avidности. Это выявляется в параллельном исследовании. Фотометрическое количественное.



АНА, гомогенное окрашивание (титр 1:1000)



АНА, гомогенное окрашивание (титр 1:10000)



## АУТОАНТИТЕЛА И СВЯЗАННЫЕ С НИХАЛИЧИЕМ АУТОИММУННЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

### Domänen der Immunfluoreszenz

Diagnostisch

- Очень важно
- Используется

Дата: 19.06.2012

	Антифосфолипидный синдром	Дерматомиозит	Повторные аборты	Лекарственная красная волчанка	Волчанка новорожденных	Полимиозит	Системная склеродермия	Ревматоидный артрит	Синдром Шарпа (MCTD)	Синдром Шёгрена	Истемная красная волчанка	Аутоиммунный гепатит	Первичный билирубинный цирроз	Параонкологические заболевания
Клеточные ядра (ANA)	<input checked="" type="checkbox"/>													
CENP-F (циклин II - митозин)														<input checked="" type="checkbox"/>
дсДНК												<input checked="" type="checkbox"/>		
Нуклеосомы												<input checked="" type="checkbox"/>		
Sm												<input checked="" type="checkbox"/>		
U1-RNP		<input type="checkbox"/>				<input type="checkbox"/>		<input checked="" type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>				
SS-A (Ro, 60 кДа)				<input checked="" type="checkbox"/>						<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>			
SS-B (La)				<input type="checkbox"/>						<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>			
Гистоны				<input checked="" type="checkbox"/>						<input type="checkbox"/>				
PCNA (циклин I)										<input checked="" type="checkbox"/>				
РНК-хеликаза II										<input checked="" type="checkbox"/>				
MSA1 (NuMA)										<input type="checkbox"/>				
MSA2 (HsEg5)						<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>			
Sci-70							<input checked="" type="checkbox"/>							
Фибрилларин (U3-RNP)		<input type="checkbox"/>				<input type="checkbox"/>		<input checked="" type="checkbox"/>						
РНК-полимеразы I, II, III							<input checked="" type="checkbox"/>							
NOR-90, PDGF-R							<input checked="" type="checkbox"/>							
Центромеры (CENP-A, CENP-B)							<input checked="" type="checkbox"/>						<input type="checkbox"/>	
PM-Scl (1, 75, 100)		<input type="checkbox"/>				<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>							
Ku		<input checked="" type="checkbox"/>				<input checked="" type="checkbox"/>								
Mi-2		<input checked="" type="checkbox"/>												
SRP						<input checked="" type="checkbox"/>								
Jo-1		<input checked="" type="checkbox"/>				<input checked="" type="checkbox"/>								
PL-7, PL-12, OJ, EJ, SC, KS		<input checked="" type="checkbox"/>				<input checked="" type="checkbox"/>								
Ядерные точки													<input checked="" type="checkbox"/>	
Sr100, Sr140, SUMO, PML													<input checked="" type="checkbox"/>	
Ядерная мембрана, рецептор ламина В													<input checked="" type="checkbox"/>	
GP210, NUP62													<input checked="" type="checkbox"/>	
Кардиолипин		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>							<input type="checkbox"/>				
Бета-2 гликопротеин 1		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>							<input type="checkbox"/>				
Фосфатидилсерин		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>											
Волчаночный антикоагулянт		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>							<input type="checkbox"/>				
Протромбин, аннексин А5		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>											
C1q										<input type="checkbox"/>				
Митохондрии (AMA)												<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
Митохондрии (AMA M2-3E/BPO)													<input checked="" type="checkbox"/>	
Рибосомальные Р-белки											<input checked="" type="checkbox"/>			
Гладкомышечные клетки ASMA												<input checked="" type="checkbox"/>		
F-актин												<input checked="" type="checkbox"/>		
Ревматоидный фактор								<input checked="" type="checkbox"/>						
Цитруллинированные пептиды (ЦЦП)								<input checked="" type="checkbox"/>						
Sa								<input type="checkbox"/>						
Филаггрин, RA кератин								<input type="checkbox"/>						
Цитруллинированный пептид ендолазы (СЕР-1)								<input type="checkbox"/>						

