

УДК 616.72-002.77-078:57.083.3

DOI: 10.34215/1609-1175-2024-3-20-23



Диагностическая ценность определения антител методом иммуноблоттинга у пациентов с ревматоидным артритом

Ю.Р. Ахвердян^{1,2}, Б.В. Заводовский^{1,2}, Е.В. Папичев^{1,2}, Ю.В. Полякова¹, Л.Е. Сивордова¹, С.А. Бедина^{1,2}, Н.Г. Краюшкина²

¹ Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии имени А.Б. Зборовского, Волгоград, Россия

² Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия

Цель: изучение диагностической ценности профиля антиядерных антител при ревматоидном артрите (РА) методом иммуноблоттинга. **Материалы и методы.** Наблюдали 46 пациентов с РА, средний возраст которых составил 34,6 года [21,3–63,2], длительность заболевания – 11,2 года [3,7–19,8], активность по DAS-28 – $3,15 \pm 1,36$ (3,05–3,61) балла. Диагноз РА устанавливался на основании общепринятых клинических рекомендаций. В контрольную группу вошли 28 пациентов с остеоартрозом. При выполнении работы использован набор реагентов для определения антител IgG к ядерным антигенам методом иммуноблоттинга. **Результаты.** У пациентов с РА повышенный уровень антител к RNP/Sm антигену выявляется достоверно чаще в сравнении с группой контроля ($p = 0,007$). Наиболее специфичными тестами для диагностики РА оказались антитела к рибонуклеопротеинам (анти-RNP/Sm) (специфичность 96%, чувствительность 25%) и антитела к рекомбинантному антигену (чувствительность 25%, специфичность 88,1%). Методом ROC-анализа установлено, что точкой, соответствующей оптимальному соотношению чувствительность/специфичность, является значение анти-RNP/Sm = 0. Данному значению соответствует чувствительность 50% и специфичность 73,8%. **Заключение.** Изученные лабораторные тесты, как правило, обладали высокой специфичностью, но достаточно малой чувствительностью. Наиболее специфичным тестом для РА является анти-RNP/Sm. Проведение ROC-анализа позволило выявить, что для диагностики РА тест анти-RNP/Sm имеет средний показатель качества.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, диагностика ревматоидного артрита, лабораторные маркеры ревматоидного артрита, иммуноблоттинг

Поступила в редакцию: 14.03.2024. Получена после доработки: 15.03.2024, 20.03.2024, 26.03.2024, 23.05.2024.

Принята к публикации: 09.07.2024

Для цитирования: Ахвердян Ю.Р., Заводовский Б.В., Папичев Е.В., Полякова Ю.В., Сивордова Л.Е., Бедина С.А., Краюшкина Н.Г. Диагностическая ценность определения антител методом иммуноблоттинга у пациентов с ревматоидным артритом. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2024;3:20–23. doi: 10.34215/1609-1175-2024-3-20-23

Для корреспонденции: Ахвердян Юрий Рубенович – канд. мед. наук, старший научный сотрудник лаборатории методов лечения и профилактики заболеваний суставов Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной ревматологии имени А.Б. Зборовского; доцент кафедры клинической лабораторной диагностики Волгоградского государственного медицинского университета (400138, Волгоград, ул. Землячки, 76); ORCID: 0000-0001-8010-6777; e-mail: doctor_2001@mail.ru

Diagnostic value of antibody immunoblotting detection in rheumatoid arthritis patients

Y.R. Akhverdyan^{1,2}, B.V. Zavodovskiy^{1,2}, E.V. Papichev^{1,2}, J.V. Polyakova¹, L.E. Sivordova¹, S.A. Bedina^{1,2}, N.G. Krayushkina²

¹ Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology named after A.B. Zborovsky, Volgograd, Russia

² Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia

Objective. To assess the diagnostic value of antinuclear antibody (ANA) profiling in rheumatoid arthritis by immunoblotting. **Materials and methods.** In total, 46 patients with rheumatoid arthritis (RA) with a mean age of 34.6 years (21.3–63.2) were observed. The disease duration was 11.2 years (3.7–19.8); the activity according to DAS 28 was 3.15 ± 1.36 (3.05–3.61) points. The RA diagnosis was based on generally accepted clinical guidelines. The control group included 28 patients with osteoarthritis. Laboratory examinations were conducted using a set of reagents to determine IgG antibodies to nuclear antigens by immunoblotting. **Results.** The RA patients showed an increased level of antibodies to the RNP/Sm antigen, with its frequency being significantly higher than in the control group ($p = 0.007$). The most specific testomes for diagnosing RA were anti-RNP/Sm (specificity 96%, sensitivity 25%) and antibodies to the recombinant antigen (sensitivity 25%, specificity 88.1%). The method of ROC analysis found that the value of anti-RNP/Sm = 0 is the point corresponding to the optimal ratio of sensitivity/specificity. This value corresponds to a sensitivity of 50% and a specificity of 73.8%. **Conclusion.** The studied laboratory tests, as a rule, showed high specificity, but rather low sensitivity. The most specific test for RA is anti-RNP/Sm. The conducted ROC analysis showed that the anti-RNP/Sm test has an average quality index for diagnosing RA.

Keywords: rheumatoid arthritis, rheumatoid arthritis diagnosis, laboratory markers of rheumatoid arthritis, immunoblotting

Received 14 March 2024; Revised 15, 20, 26 March, 23 May 2024; Accepted 9 July 2024

For citation: Akhverdyan Y.R., Zavodovsky B.V., Papichev E.V., Polyakova J.V., Sivordova L.E., Bedina S.A., Krayushkina N.G. Diagnostic value of antibody immunoblotting detection in rheumatoid arthritis patients. *Pacific Medical Journal*. 2024;3:20–23. doi: 10.34215/1609-1175-2024-3-20-23

Corresponding author: Yury R. Akhverdyan, Cand. Sci. (Med.), Associate Professor of the Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Volgograd State Medical University; Senior Researcher at the Laboratory of Methods for the Treatment and Prevention of Joint Diseases of the Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology named after A.B. Zborovsky (76 Zemlyachki St., Volgograd, 400138, Russia); ORCID: 0000-0001-8010-6777; e-mail: doctor_2001@mail.ru

Основу патогенеза ревматических заболеваний составляют нарушения клеточных и гуморальных иммунных реакций, которые сопровождаются выработкой аутоантител [1–3]. Практическому врачу крайне важно иметь в своем арсенале набор диагностических лабораторных тестов для скрининга этих заболеваний в общей популяции, их дифференциальной диагностики на ранней стадии, определения активности и прогнозирования тяжести клинической картины [4–7].

В диагностике системных заболеваний соединительной ткани основой для постановки нозологического диагноза являются иммунологические исследования [4]. Антинуклеарные антитела (АНА) к рибонуклеопротеинам имеют важное диагностическое значение при выявлении системных РЗ [6, 8, 9].

Традиционными методами исследования АНА являются скрининговые методы, оценивающие их наличие в сыворотке крови. В последние годы появились новые методы, позволяющие определить тип АНА, имеющийся у пациента. К ним относят метод иммуноферментного анализа, используемый для определения большого количества аутоантител, требующий одномоментного применения нескольких тест-систем [1].

Одним из наиболее распространенных методов является определение всего профиля АНА одномоментно с помощью иммуноблоттинга. Этот метод позволяет выявлять антитела к следующим аутоантигенам: антитела к U1-, U2-, U4-рибонуклеопротеинам (Sm) и белковым компонентам малого ядерного нуклеотида – U1-РНК (RNP), цитоплазматическому антигену (SS-A) (60 кДа), SS-A (52 кДа), белку, связанному с РНК-полимеразой-3 (SS-B), негистоновым хромосомным белкам (топоизомеразе, Scl-70), рекомбинантному антигену для больных полимиозитом (PM) и склеродермией (Scl, PM-Scl), ядерному антигену пролиферирующих клеток (PCNA), центромерам (CENT-B), нуклеосомам (dsDNA/Histone/Nucleosome), рибосомальному белку Р (RibP), антигенам мембраны митохондрий (AMA-M2) и гистидин-гРНК-синтазе (Jo-1). Однако ценность данного метода недостаточно изучена и требует уточнения [10, 11, 12].

Цель исследования состояла в изучении диагностической ценности определения профиля АНА при ревматоидном артрите методом иммуноблоттинга.

Материалы и методы

Наблюдали 46 пациентов с ревматоидным артритом (РА), средний возраст которых составил 34,6 года [21,3–63,2], из них 43 (93,47%) женщины и 3 (6,52%) мужчин. Длительность заболевания составила

11,2 года [3,7–19,8], активность по DAS28 (Disease Activity Score-28) $3,15 \pm 1,36$ (3,05–3,61) балла, индекс массы тела составил $26,7 \text{ кг/м}^2$ [21,5–53,7]. Диагноз РА устанавливался на основании общепринятых клинических рекомендаций. Все пациенты с РА получали стандартную базисную терапию согласно действующим клиническим рекомендациям, в большинстве случаев в качестве базисной терапии применялся метотрексат. В группу сравнения вошли 28 пациентов (23 (82,1%) женщины и 5 (17,9%) мужчин) с остеоартритом 0–1 степени тяжести (гонартрозом и остеоартритом суставов кисти). Средний возраст больных группы сравнения составил 28,9 года [19,2–57,4]. Обе группы были сопоставимы по полу и возрасту. Поскольку критерием исключения для группы сравнения было наличие системных заболеваний соединительной ткани, с точки зрения аутоиммунной патологии группу сравнения можно считать условно здоровыми лицами. Пациенты включались в исследование только после подписания информированного согласия. Исследование одобрено комитетом по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ КиЭР им. А.Б. Зборовского» (протокол № 73 от 02.05.2023 г.).

При выполнении работы был использован набор реагентов для определения антител IgG к ядерным антигенам методом иммуноблоттинга (EUROLINE ANA Profile 3 (IgG), кат № DL 1590-1601-3), с помощью которого определялись следующие виды антител: RNP, Sm, SS-A native, Ro-52 recombinant, SS-B, Scl-70, PM-Scl100, Jo-1, CENPB, PCNA, dsDNA, NUC, HI, RIB, AMA-M2.

Статистические расчеты производились с использованием программы Statistica 10.0. Статистическая обработка данных включала определение нормальности распределения данных методом анализа гистограмм, проведения теста Колмогорова – Смирнова. Показатели, подверженные нормальному распределению, представлены в форме $M \pm SD$ (95% ДИ), ненормальному – Me [Q1–Q3]. Достоверность различия между качественными характеристиками проводилась с использованием критерия χ^2 , количественные показатели анализировались с помощью дисперсионного анализа ANOVA.

Результаты исследования

У пациентов с РА повышенный уровень антител к RNP/Sm антигену выявляется достоверно чаще в сравнении с группой контроля ($p = 0,007$). В группе сравнения не было выявлено повышения уровня ни одного вида антинуклеарных антител.

Мы определили чувствительность и специфичность лабораторных тестов при РА, что позволило выявить наиболее оптимальный метод, максимально подходящий для диагностики конкретной нозологии. Чувствительность теста определяется по формуле, которая показывает долю достоверных диагностических показателей пациентов с данным заболеванием.

Таблица
Чувствительность и специфичность тестов на антитела при РА

Антигены	Ч ¹	С ²
RNP/Sm	25,0%	96,0%
Sm	25,0%	90,5%
SS-A native	0,0%	83,3%
Ro-52 recombinant	25,0%	88,1%
SS-B	0,0%	92,9%
Scl-70	0,0%	–
PM-Scl100	0,0%	95,0%
Jo-1	0,0%	97,6%
CENP B	0,0%	–
PCNA	0,0%	–
dsDNA	0,0%	94,4%
NUC	0,0%	94,4%
HI	0,0%	94,4%
RIB	0,0%	94,4%
AMA-M2	0,0%	–

1Ч – чувствительность теста, 2С – специфичность

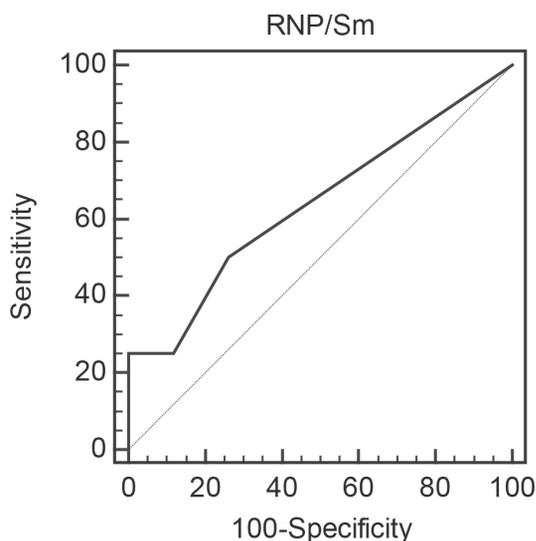


Рис. Диагностическая ценность определения анти-RNP/Sm при РА. Основные описательные характеристики ROC-кривой: площадь под ROC-кривой – 0,636905; стандартная ошибка – 0,162; доверительный интервал – 0,482010 – 0,773478.

Специфичность определяется процентным содержанием достоверно отрицательных показателей среди заведомо здоровых лиц.

Обнаружено, что наиболее специфичным тестом для диагностики РА является анти-RNP/Sm (специфичность 96%), однако тест обладает низкой чувствительностью – 25% (таблица). Сходная диагностическая ценность и у антител к рекомбинантному антигену (чувствительность 25%, специфичность 88,1%).

Диагностическая ценность лабораторного теста, показавшего наилучшие характеристики для выявления РА, определялась методом ROC-анализа. Вычисление площади под кривой (AUC-Area Under Curve) позволяет сделать вывод о прогностической значимости лабораторного теста (рис.).

Качество лабораторного теста характеризует значение площади под ROC-кривой, а оптимальному соотношению чувствительность/специфичность соответствует анти-RNP/Sm = 0. Отсюда следует, что тест анти-RNP/Sm для диагностики РА обладает чувствительностью 50% и специфичностью 73,8%. Проведение ROC-анализа позволило выявить, что для диагностики РА тест анти-RNP/Sm имеет средний показатель качества.

Обсуждение полученных данных

В настоящее время исследование АНА служит основным тестом для диагностики системных аутоиммунных ревматических заболеваний: системной красной волчанки (СКВ), системной склеродермии, болезни/синдрома Шегрена, идиопатических воспалительных миопатий, смешанного заболевания соединительной ткани (СЗСТ) и перекрестных синдромов.

Известно, что антитела к RNP, Sm, а также комплексу RNP/Sm могут быть выявлены у больных РА, однако их диагностическое значение, по данным разных авторов, достаточно противоречиво.

В ходе нашего исследования методом иммуноблоттинга было выявлено, что у пациентов с РА аутоантитела к экстрагируемым ядерным антигенам определялись статистически достоверно чаще, чем у лиц группы сравнения ($p = 0,007$) и частота выявления данных аутоантител составила около 25% случаев. С одной стороны, данный относительно небольшой процент положительных результатов не позволяет использовать методику в качестве диагностической для выявления пациентов с РА в популяции. С другой стороны, принято считать, что наличие положительных результатов определения антител к Sm является специфичным серологическим маркером для СКВ, а определение антител к RNP и комплекса RNP/Sm – для СЗСТ. При получении положительного результата к вышеуказанным антителам существует возможность автоматического исключения диагноза РА.

Необходимо отметить, что результаты настоящей работы не зависят от проводимой базисной терапии. Все пациенты получали метотрексат, который не влияет на повышение уровня АНА.

Изученные лабораторные тесты, как правило, обладали высокой специфичностью, но достаточно малой чувствительностью. Наиболее специфичным тестом для РА является анти-RNP/Sm. Мы считаем чрезмерным использование данных антител для диагностики РА, поскольку они обладают относительно небольшой чувствительностью (до 50%). Однако положение о том, что определенные виды АНА специфичны исключительно для СКВ и ряда других аутоиммунных заболеваний, но не для РА, возможно, нуждается в определенной корректировке.

Заключение

Тесты АНА можно использовать для подтверждения конкретного нозологического диагноза у пациента с уже выявленным ревматологическим заболеванием, однако для скрининговых исследований с целью выявления ревматологической патологии в популяции данные тесты использовать не вполне рационально. При получении положительной реакции на анти-RNP/Sm результаты интерпретируются исключительно в контексте с клиническими данными и при необходимости назначаются дополнительные исследования согласно клиническим рекомендациям по диагностике РА.

Конфликт интересов: авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования: авторы заявляют о финансировании проведенного исследования из собственных средств.

Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования – ЗБВ, АЮР

Сбор и анализ информации – ПЮВ, СЛЕ, КНГ

Статистическая обработка – ПЕВ

Написание текста – АЮР, БСА

Редактирование – АЮР

Литература / References

1. Александрова Е.Н., Новиков А.А., Насонов Е.Л. Федеральные клинические рекомендации. Лабораторная диагностика ревматических заболеваний 2015 – М.: ГЭОТАР-Медиа, 34 с. [Alexandrova EN, Novikov AA, Nasonov EL. Federal clinical guidelines. Laboratory diagnosis of rheumatic diseases, Moscow: Geotar-Media, 2015 (In Russ.)].
2. Agmon-Levin N, Damoiseaux J, Kallenberg C, Sack U et al. International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. *Ann Rheum Dis.* 2014;73(1):17–23. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-203863
3. Лапин С.В., Мазинг А.В., Булгакова Т.В., Суркова Е.А., Блинова Т.В., Холопова И.С., Напалкова О.С., Лернер М.Ю., Тотолян А.А., Эмануэль В.Л. Клинические рекомендации по лабораторной диагностике аутоиммунных заболеваний. Москва, 2014. 22 с. [Lapin SV, Mazing AV, Bulgakova TV, Surkova EA, Blinova TV, Holopova IS, Napalkova OS, Lerner MYu, Totolyan AA, Emanuel' VL. Clinical guidelines for the laboratory diagnosis of autoimmune diseases, Moscow, 2014 (In Russ.)].
4. Алексеева Е.И., Дворяковская Т.М., Никишина И.П., Денисова Р.В., Подчерняева Н.С., Сухоруких О.А., Шубина Л.С. Системная красная волчанка: клинические рекомендации. Часть 1. *Вопросы современной педиатрии.* 2018; 17 (1):19–37. [Alekseeva EI, Dvoryakovskaya TM, Nikishina IP, Denisova RV, Podchernyaeva NS, Suhorukih OA & Shubina LS. Systemic lupus erythematosus: clinical recommendations. Part 1. *Current Pediatrics.* 2018;17 (1):19–37 (In Russ.)].
5. Соловьев С.К., Асеева Е.А., Попкова Т.В. и др. Системная красная волчанка: новые горизонты диагностики и терапии. *Научно-практическая ревматология.* 2020;58(1):5–14. [Soloviev SK, Aseeva EA, Popkova TV, et al. Systemic lupus erythematosus: new horizons for diagnosis and therapy. *Rheumatology Science and Practice.* 2020;58 (1):5–14 (In Russ.)].
6. Sutton EJ, Davidson JE, Bruce IN. The systemic lupus international collaborating clinics (SLICC) damage index: a systematic literature review. *Semin Arthritis Rheum.* 2013;43(3):352–61. doi: 10.1016/j.semarthrit.2013.05.003
7. Aringer M, Costenbader K, Daikh D, Brinks R, Mosca M, Ramsey-Goldman R, Smolen JS, Wofsy D, Boumpas DT, Kamen DL, et al. 2019 European League Against Rheumatism/ American College of Rheumatology classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2019; 78(9):1151–9. doi: 10.1136/annrheumdis-2018-214819
8. Choi MY, Cui J, Costenbader K, et al. Different indirect immunofluorescence ANA substrate performance in a diagnostic setting of patients with SLE and related disorders: retrospective review and analysis. *Lupus Science & Medicine* 2020;7:e000431. doi: 10.1136/lupus-2020-000431
9. Pisetsky DS. Antinuclear antibody testing – misunderstood or misbegotten? *Nat Rev Rheumatol.* 2017;13(8):495–502. doi: 10.1038/nrrheum.2017.74
10. Damoiseaux J, von Mühlen CA, Garcia-De La Torre I, Carballo OG, de Melo Cruvinel W, Francescantonio PL, Fritzler MJ, Herold M, Mimori T, Satoh M, Andrade LE, Chan EK, Conrad K. International consensus on ANA patterns (ICAP): the bumpy road towards a consensus on reporting ANA results. *Auto Immun Highlights.* 2016;7(1):1. doi: 10.1007/s13317-016-0075-0
11. Konieczna I, Relich I, Durajski M, Lechowicz L, Chrapek M, Gaweda J, Fraczyk J, Kaminski ZJ. Novel tool in rheumatoid arthritis diagnosis-The usage of urease flap region peptidomimetics. *J Pept Sci.* 2018;24(6):e3084. doi: 10.1002/psc.3084