

БЪЛГАРСКА АСОЦИАЦИЯ ПО КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ
BULGARIAN ASSOCIATION FOR CLINICAL IMMUNOLOGY



Годишник на БАКИ

2017, т. 11

**Year book of Bulgarian Association
for Clinical Immunology**

2017, v. 11

ДАЙРЕКТ СЪРВИСИЗ
София, 2018

Publishing house „DIRECT SERVICES“
Sofia, 2018

© Дайрект сървисиз, 2018

ISSN 1313-47-52

СЪДЪРЖАНИЕ

СТРАНИЦА НА ПРЕДСЕДАТЕЛЯ НА УПРАВИТЕЛНИЯ СЪВЕТ НА СДРУЖЕНИЕ „БЪЛГАРСКА АСОЦИАЦИЯ ПО КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ“	5
ПЕРСОНАЛИЗИРАНАТА МЕДИЦИНА В ХЕМАТОЛОГИЯТА ПРЕЗ 2017 ГОДИНА: НЯКОЛКО СЪПКИ КЪМ „ОБРАЗОВАНАТА“ РЕВОЛЮЦИЯ <i>В. Шиваров</i>	9
МОЛЕКУЛЯРНА ДИАГНОСТИКА НА ПЪРВИЧНИ ИМУННИ ДЕФИЦИТИ – МЯСТОТО НА ТЕХНОЛОГИИТЕ ЗА СЕКВЕНИРАНЕ ОТ СЛЕДВАЩО ПОКОЛЕНИЕ	16
<i>С. Михайлова, Н. Гешева, С. Лесичкова, П. Янкова, М. Балева, Е. Наумова</i>	16
ЛАБОРАТОРНАТА ДИАГНОЗА НА ОСТЕОАРТРОЗАТА <i>К. Икономова</i>	27
ДИАГНОСТИЧНО ЗНАЧЕНИЕ НА ТИТЪРА НА АНТИНУКЛЕАРНИТЕ АНТИТЕЛА	36
<i>Марта Балева, Спаска Лесичкова, Невена Гешева, Нелия Кожухарова, Мариана Димитрова, Анастасия Михайлова, Елисавета Наумова</i>	36
НАУЧНИ ПРОЯВИ С УЧАСТИЕТО НА ЧЛЕНОВЕ НА БАКИ	
ОБОБЩЕНИЕ НА НАЕ ЕХPERT MEETING БЕЛГРАД, СЪРБИЯ 1–2 ЮНИ 2017 г.	55
Първа работна среща за стандартизиране на ANA флуоресцентни образи, София 14.06.2017 г. УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ Аула	57
Протокол от Първа работна среща за стандартизиране на ANA флуоресцентни образи, София 14.06.2017 г. УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, София	60

Анкета за проведената Първа работна среща за стандартизиране на ANA флуоресцентни образи, София, 14.6.2017 г., УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, Аула.....	69
---	----

ПРОТОКОЛ

от проведено заседание на Националната работна група по първични имунни дефицити (ПИД) по време на II лятно училище за родители на деца с ПИД в Цигов чарк 16–18.06.2017 г.	72
--	----

ОСМИ НАЦИОНАЛЕН КОНГРЕС

по редки заболявания и XII балкански конгрес по генетика на човека	75
---	----

ИНФОРМАЦИЯ

за XI конференция за оценка на качеството в имунологията	76
--	----

ПРОГРАМА за дейността на сдружение

„Българска асоциацията по клинична имунология“ през 2018 г.	81
---	----

ENGLISH VERSION

DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE OF THE TITER OF ANTINUCLEAR ANTIBODIES

<i>Marta Baleva, Spaska Lesichkova, Nevena Gesheva, Nelia Kojuharova, Mariana Dimitrova, Anastasia Mihailova, Elisaveta Naumova</i>	83
---	----

СТРАНИЦА НА ПРЕДСЕДАТЕЛЯ НА УПРАВИТЕЛНИЯ СЪВЕТ НА СДРУЖЕНИЕ „БЪЛГАРСКА АСОЦИАЦИЯ ПО КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ“

Уважаеми колеги, скъпи приятели,

Българската асоциация по клинична имунология е с нов виртуален облик в Web пространството. Адмираме проявата на инициативност на всеки от членовете на БАКИ за допълването му с полезна и интересна информация. Предстои да се подготви версия на английски език. Разделянето на потоците информация се осъществи с регистрирането на допълнителен е-майл адрес: basimmunology@gmail.com – за кореспонденция между УС и членовете на БАКИ, а за кореспонденция по ВОК остава: info@aci-bg.org. Всичко това прави Сдружението по-разпознаваемо, а членовете му по-информирани.

През 2017 година общността на Българската асоциация по клинична имунология се увеличи с 6 новоприети членове. „Добре дошли“ на доц. д-р Велислава Терзиева, Драгомира Николова, Яна Тодорова, д-р Марта Райкова, д-р Георги Христов Василев и д-р Симеон Петков Петков. Поздравявам и членовете на БАКИ, придобили специалност през 2017 г., а именно: д-р Спаска Лесичкова – *клинична имунология*, Драгомира Николова, инж. хим. Валентина Атанасова и Атанаска Георгиева – *лабораторна имунология*.

В сдружение „Българска асоциация по клинична имунология“ като редовни членове членуват 73 лекари и специалисти с немедицинско образование, от които **55%** са лекари със специалност клинична имунология, **10%** са специалисти по лабораторна имунология, **11%** са лекари от други специалности, работещи по проблемите на ПИД, **5%** са биолози, работещи в областта на клиничната имунология, специализиращите клинична имунология са **11%**, а лабораторна имунология са **8%**.

И през 2017 година положихме усилия да създадем условия за професионалното развитие и изява на членовете на БАКИ, както и да популяризираме новостите в областта на клиничната имунология чрез редица срещи, конференции и други активности. Световната седмицата на ПИД, 22–29 април 2017, отбелязахме по места с различни мероприятия. Вече стана традиция да се извършват безплатни медицински прегледи от специалисти клинични имунолози, работещи в имунологични звена в София – УМБАЛ „Александровска“, НЦЗПБ, СБАЛСПМ „Пирогов“, УМБАЛ „Св. Георги“ – Пловдив, Плевен и Стара Загора в контекста на подобряване на достъпа до оптимални грижи за всички пациенти с имуномедирирани болести. Бяха консултирани повече от 100 пациенти. Стартира инициатива за провеждане на семинари с общопрактикуващи лекари по проблемите на първичните имунни дефицити в Плевен, Пловдив и София, към която имаше голям интерес.

Международният ден на имунологията 29 април беше официално честван по време на „Плевенските имунологични дни 2017“, 10-годишнината от създаването на МЦ КИРМ „Св. Елисавета“ и Седмата работна среща „Репродуктивна медицина 2017 – противоречия и консенсус“, 28–30 април 2017 г. В рамките на работната среща се дискутираха съвременните постижения и противоречия във фундаменталните и практическите аспекти на репродуктивните неуспехи, обединявайки в един форум специалисти от различни области на репродуктивната медицина, акушерство и гинекология, репродуктивна имунология, репродуктивна ендокринология, медицинска генетика, андрология, микробиология, вирусология, неонатология и репродуктивна психология.

Традиционното вече *лятно училище за пациенти с първични имунодефицити* се проведе в почивната база на МУ – Пловдив, Цигов Чарк съвместно с МУ – Пловдив и Експертен център „Джефри Модел“ – България на 16 и 18 юни 2017 г. Двудневната програма включваше доклади, практическо обучение, заседание на националната работна група по първични имунни дефицити, среща на Българската асоциация на хора с първични имунни дефицити и интерактивен диалог между лекари и родителите на малките пациенти. Това събитие събра водещи имунолози от цялата страна, деца с първичен имунодефицит и техните родители, с цел за да се запознаят с подробности относно тяхното заболяване, да се осъществи тесен контакт между пациенти и лекари за подобряване качеството на живот. Обсъдиха се бъдещи стратегии за кампании и дейности, насочени към лекарите и обществото, за подобряване на ранната диагноза, подходящото лечение и проследяване на пациентите с оглед намаляване на заболяемостта и смъртността, свързана с ПИД.

Първата работна среща за стандартизиране на АНА флуоресцентни образи по инициатива на сътрудниците на Лабораторията по имунология при УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ се проведе през м. юни, 2017 г. Беше изнесена презентация от Catrin Mary – гост-лектор от фирма EUROIMMUN, Германия. Във форума взеха участие и много млади специалисти, интересувани се от тематиката на АНА флуоресцентните образи. Срещата премина в много ведра атмосфера и конструктивни дискусии. По време на конференцията по качество в имунологията през м. декември дискусията продължи и се постигнаха известни консенсуси.

Сесията, посветена на проблемите на първичните имунодефицитни заболявания в рамките на Осмата национална конференция по редки болести и 12-ия конгрес по генетика на човека се проведе през м. септември 2017 в гр. Пловдив. Обсъдиха се проблемите и перспективите за ранната диагностика на ПИД. Отделно се представиха няколко случая на пациенти с такива заболявания от УМБАЛ „Александровска“, Клиниката по клинична имунология и Клиниката по детски болести при УМБАЛ „Св. Георги“ – Пловдив. В рамките на сесията се изнесе и доклад за лечението на наследствения ангиоедем с препаратa ICATIBANT.

Втората тематична среща „Имунология и хранене“ се проведе в спокойна и приятелска атмосфера между лекарите имунолози и представители

на фирмите „Нутерджия“ и „Неофарма“, които представиха новите си продукти“. Поради големия интерес към препаратите последваха допълнителни срещи по места.

Както знаете, в края на 2016 г. се роди идеята за стартиране на *национална профилактична програма под надслов „Имунология за по-добро здраве“*. Във връзка с това беше проведено първото заседание на работната група през месец април 2017 в гр. Плевен. Обсъдиха се предложения за изготвяне на пилотни предпрограменни проекти, които са в различен стадий на подготовка: Скринингово изследване на новородени за ТКИД посредством T-cell receptor excision circle (TREC) тест с цел определяне на честотата на вродените нарушения на T-клетъчния имунитет и икономическата ефективност от рутинното му прилагане като част от Национална скринингова програма. Скрининг за хуморален дефицит на имунния отговор (Иг и субкласовете им) при всички възрастови групи. Скрининг за автоантитела при хора с фамилна обремененост и висок риск от автоимунно заболяване. Скрининг за клетъчен имуен дефицит – оценка на степента на „имунологично остаряване“, включително маркери на хронично имунно възпаление при лица в активна възраст.

През 2017 г. бяха раздадени само 2 стипендии на членове на БАКИ за участие в научни форуми в Чехия и Ирландия. Бих искала да апелирам за повече смелост при кандидатстване за финансово подпомагане на участията.

Външната оценка на качеството е една от важните дейности на БАКИ. През 2017 г. са проведени всички предвидени схеми за ВОК по имунология. Резултатите се отчетоха и анализираха по време на Конференция по качеството през м. декември. Дискусията беше насочена към стандартизиране на биологичните проби изпращани за флоуцитометрия, анализ на резултатите и въвеждане на нови схеми. Подробна информация ще бъде публикувана в този брой на Годишника.

След кратко прекъсване се поднови представителство на БАКИ в Секция „Лабораторна медицина“, Дивизията по имунология на UEMS. Тази година се постави и основа за по-тясно сътрудничество с Българската педиатрична асоциация в областта на имуномедианите болести при децата, ваксинопрофилактиката и др. Във връзка с това имунолози ще вземат участие в Четвъртата експертна среща по ваксинопрофилактика на 23–24 февруари 2018 година в гр. София. Освен това се планира провеждане на експертна среща между педиатри и имунолози на 16–17 юни 2018 г. в Цигов чарк.

В резултат на направения задълбочен анализ на настоящото и бъдещо развитие на нашата общност са набелязани следващи стъпки, които са залежали в Програмата за 2018 година. Целта е да се подготвим за предстоящи предизвикателства, чрез актуализиране и разширяване на знанията си, стимулиране на нови идеи, насърчаване на сътрудничеството и укрепване на личните взаимовръзки. Разбира се, всичко това зависи от активността и конструктивните предложения на всички членове на нашето сдружение.

СКЪПИ КОЛЕГИ,

от името на Управителния съвет на БАКИ бих искала да Ви благодаря за доверието и желанието да бъдете част от имунологичния екип, който твори бъдещето на тази предизвикателна дисциплина.

*ПРОФ. Д-Р ЕЛИСАВЕТА НАУМОВА, ДМ, ДМН
ПРЕДСЕДАТЕЛ НА УС НА БАКИ*

ПЕРСОНАЛИЗИРАНАТА МЕДИЦИНА В ХЕМАТОЛОГИЯТА ПРЕЗ 2017 ГОДИНА: НЯКОЛКО СЪПКИ КЪМ „ОБРАЗОВАНАТА“ РЕВОЛЮЦИЯ

Велизар Шиваров

РЕЗЮМЕ

През последните две години бяха направени няколко важни стъпки напред в персонализираната медицина при възрастни пациенти с остра миелоидна левкемия (ОМЛ). Те се основават основно на последните открития в областта на молекулярната генетика на заболяването, водещи до дефиниране на нови подтипове ОМЛ с ясно разграничени генетични аберации и клинична прогноза. Някои от тези аберации се оказаха молекулярни мишени, подходящи за създаване на специфични лекарства. През 2017 г. няколко такива таргетни лекарства бяха одобрени за клинична употреба. Тук описваме накратко някои от последните постижения в областта на генетиката на ОМЛ и обсъждаме приложението на новите одобрени за употреба лекарства мидостаурин, еназидениб и гемтузумаб озогамидин.

Ключови думи: Остра миелоидна левкемия, персонализирана медицина, мутации, таргетна терапия, мидостаурин, еназидениб, гемтузумаб озогамидин.

Адрес за кореспонденция: д-р Велизар Шиваров, Отделение по Клинична хематология, УМБАЛ „Софиямед“, Блок 2; ул. „Димитър Моллов“ 10, София 1797, e-mail: vshivarov@abv.bg

THE PERSONALIZED MEDICAL APPROACH IN HEMATOLOGY IN 2017: A FEW STEPS TOWARDS THE „EDUCATED“ REVOLUTION

Velizar Shivarov

ABSTRACT

In the last two years several major advances in the personalized approach to adult acute myeloid leukemia (AML) were made. Those were primarily based on the recent insights in the molecular genetics of the disease leading to the definition of novel AML subtypes with distinct genetic background and clinical prognosis. Some of those aberrations proved to be “druggable” molecular targets and in 2017 several targeted drugs made their way to the clinic. Here, we describe briefly some of the recent major advances in the AML genetics and discuss the application of the newly approved drugs such as midostaurin, enasidenib and gemtuzumab ozogamicin.

Keywords: Acute myeloid leukemia, personalized medicine, targeted therapy, mutations, midostaurin, enasidenib, gemtuzumab ozogamicin

Correspondence: Velizar Shivarov, Dept. Clinical Hematology, University Hospital „Sofamed“, Bl. 2; 10 Dimitar Mollov str. Sofia 1797; e-mail: vshivarov@abv.bg

През последното десетилетие сякаш всеки обикновен лекар е все по-близо до думите на Албърт Айнщайн „Искам да знам мислите на Бог, останалото са просто подробности“. Причината за това станаха последните технологични постижения на високопроизводителното секвениране на нуклеинови киселини от второ поколение (наричано още „next generation sequencing (NGS)“), което ни позволи по безпрецедентен допреди десетилетие начин да разбираме молекулярните основи на повечето генетично обусловени вродени и придобити заболявания. Промяната в технологичните възможности и в разбиранията за молекулярните основи на живота в здраве и болест доведе до това, което днес наричаме „персонализирана медицина“.

Голяма част от първите стъпки в областта на персонализираната медицина бяха направени при хематологичните заболявания по две основни причини – тежестта на заболяванията (т.е. „медицинската необходимост“) и достъпността на биологичен материал за изследване. Станалите емблематични постижения на „персонализираната“ хематология от края на 20. и началото на 21. век, а именно откритието на иматиниб за лечение на заболявания с Филадельфийска хромозома и на АТРА за лечение на промиелоцитна левкемия обаче за повече от 15 години се считаха по-скоро за щастливо изключение и много изследователи и клиницисти със свити сърца наблюдаваха липсата на значим напредък в лечението на най-тежките хематологични неоплазии, като острата миелоидна левкемия (ОМЛ), при която общата 5-годишна преживяемост едва достига 20% [1]. Отминалата 2017 г. даде надежда, че разработването на персонализирани диагностични и прогностични подходи и лекарства за остра миелоидна левкемия може в крайна сметка да се увенчае с успех. По-долу накратко ще ги разгледаме.

НАПРЕДЪК В МОЛЕКУЛЯРНОТО И ГЕНЕТИЧНОТО ПРОФИЛИРАНЕ НА ОМЛ

Анализът на данните от пълното геномно и екзомно секвениране на ОМЛ показва, че геномът на ОМЛ е сравнително беден на мутации спрямо други неоплазии, а също така, че основният профил на мутациите може да се свърже с естествен процес на стареене на хемопоетичната тъкан [2, 3]. Допълнително доказателство, че повечето от мутациите, свързани с ОМЛ, са естествен и неизбежен процес, са редицата данни за наличието на така наречената клонална хемопоеза с неясно значение, която чрез NGS подходи се открива в до 10% от хората без хематологични заболявания над 70 години [4].

Чрез таргетно секвениране на 111-те най-често мутирани гени при ОМЛ при 1540 пациенти и комбинирането на тези данни с клиничните и цитогенетичните данни се стигна до откриване на нови геномно-дефинирани подгрупи, като пациенти с мутации в гените за РНК сплайсинг или за хроматина, пациенти с мутации на *TP53* гена и подгрупа на пациенти с мутации на позиция R172 на *IDH2* гена [5]. Тези данни могат да доведат до директно транслиране в клиничната практика в бъдеще, тъй като математическото моделиране показва, че изборът на терапия въз основа на тези геномни данни има потенциала за нама-

ляване на броя на аlogenните трансплантации с около 20%, без да се повлияят клиничните резултати [6]. От практическа гледна точка риск-адаптиратата терапия при ОМЛ се основава на последните промени в така наречената ELN (European LeukemiaNet) стратификация на риска, утвърдена от международна експертна група в края на 2016 г. (Таблица 1) [7].

Всички тези стъпки показват все по-бързото навлизане на геномните подходи за избор на подходяща стратегия на поведение при определения пациент от самата диагностика на заболяването. Тази стратегия е имплементирана в изследователската програма от клинични проучвания на редица кооперативни групи при проучване на ОМЛ в Западна Европа и САЩ. Значителен терапевтичен пробив обаче може да се постигне не просто чрез оптимизиране и индивидуализиране на настоящите терапевтични подходи, а чрез достигане до клиничната практика на нови таргетни терапии или конвенционални такива с подобрени фармацевтични свойства. През 2017 г. Food and Drug Administration (FDA) на САЩ одобри три нови продукта за таргетна терапия при ОМЛ и един с подобрени фармацевтични свойства.

Таблица 1. Генетична стратификация на риска според ELN (2017) [7]

Рискова категория	Генетична аномалия
Благоприятен риск	t(8; 21)(q22; q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
	inv(16)(p13.1q22) или t(16;16)(p13.1; q22); <i>CBFB-MYH11</i>
	Мутирал <i>NPM1</i> без <i>FLT3-ITD</i> или с <i>FLT3-ITD</i> с ниска експресия
	Биалелни мутации на <i>CEBPA</i>
Междинен риск	Мутирал <i>NPM1</i> и <i>FLT3-ITD</i> с висока експресия
	Див тип <i>NPM1</i> без <i>FLT3-ITD</i> или с <i>FLT3-ITD</i> с ниска експресия (без генетични аберации с лош риск)
	t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLL3-KMT2A</i> [‡]
	Цитогенетични аберации, които не са класифицирани нито като благоприятен, нито като неблагоприятен риск.
Неблагоприятен риск	t(6; 9)(p23; q34.1); <i>DEK-NUP214</i>
	t(v; 11q23.3); <i>KMT2A</i> пренареждания
	t(9; 22)(q34.1; q11.2); <i>BCR-ABL1</i>
	inv(3)(q21.3; q26.2) или t(3;3)(q21.3; q26.2); <i>GATA2</i> , <i>MESOM (EVII)</i>
	-5 или del(5q); -7; -17/abn(17p)
	Комплексен кариотип, кариотип с монозомия
	Див тип <i>NPM1</i> и <i>FLT3-ITD</i> с висока експресия
Мутирал <i>RUNX1</i>	

МИДОСТАУРИН

Вътрешните тандемни дупликации на *FLT3* гена (*FLT3-ITD*) са най-неблагоприятната молекулярна аберация при ОМЛ (Таблица 1). Преди повече от 15 години беше показано, че един стауроспоринов аналог, изолиран от дрождите *Streptomyces staurosporeus*, може да инхибира силните пролиферативни сигнали през мутиралния *FLT3* рецептор при ОМЛ. През 2017 г. бяха публикувани резултатите от продължилото повече от десетилетие фаза 3 проучване RATIFY, включващо 717 пациенти с ОМЛ под 60-годишна възраст с молекулярно доказани *FLT3* мутации [8]. Пациентите са били рандомизирани в съотношение 1:1 да получават стандартна терапия плюс или мидостаурин или плацебо. Мидостаурин е прилаган като част от индукционната, консолидиращата и поддържащата терапия. Трансплантацията на костен мозък е била допустима по преценка на лекуващия лекар. Медианата на общата преживяемост (ОП) в групата на мидостаурин е 74.7 месеца спрямо 25.6 месеца за плацебо групата. Съотношението на риска от летален изход е 0.78 (95% ДИ: 0.63–0.96, $P=0.009$). Медианата на преживяемостта без събития в групата на мидостаурин е 8.2 месеца спр. 3.0 месеца в групата на плацебо ($p=0.002$). Ползата от мидостаурин не зависи от вида на *FLT3* мутацията и от експресията. В центровете от САЩ употребата на алогенна трансплантация е била много по-ниска. Мидостаурин показва тенденция за удължена преживяемост при пациентите, които са били подложени на алогенна трансплантация, но не се открива статистически значима разлика между мидостаурин и плацебо, ако трансплантацията е била извършена по време на първата пълна ремисия. Трябва да се отбележи, че мидостауринът не води до неочаквани токсични реакции и не засилва миелосупресията, причинена от конвенционалната терапия.

Това проучване е забележително по няколко причини. То е безпрецедентно по мащаба на молекулярния анализ, тъй като са били скринирани повече от 3200 пациенти за наличие на *FLT3* мутации за много кратко време. Това представлява първата таргетна терапия, показваща подобрене на преживяемостта при голяма група пациенти с ОМЛ. В резултат на проучването се демонстрира и как един прогностичен маркер е насочил разработването на нов вид терапия и се превръща в предиктивен за резултата от нея. Очевидни са обаче няколко недостатъка и проблеми с неразрешен отговор, като например: Как алогенната трансплантация по време на първата ремисия повлиява клиничните резултати? Би ли подобрило клиничните резултати приложението на мидостаурин и след трансплантацията? Как повлияват отговора към мидостаурин други молекулярно-генетични маркери, като мутациите на гените *NPM1*, *DNMT3A*, *IDH1/2*, *TP53*, *KRAS*. Какъв е профилът на ефикасност и безопасност на мидостаурин при пациенти в напреднала възраст? Може ли той да се комбинира с епигенетична терапия, като азациитидин или децитабин?

Така мидостауринът беше одобрен за клинично приложение от FDA април 2017 г. и от European Medicine Agency (EMA) през септември 2017 г. за приложение в комбинация с конвенционална химиотерапия на възрастни пациенти с ОМЛ и мутации на *FLT3* гена.

ЕНАЗИДЕНИБ

IDH1/2 мутациите засягат точно определени кодони от двата гена и се откриват при около 10% от възрастните пациенти с ОМЛ, но както беше отбелязано по-горе, може да представляват самостоятелно геномно-дефинирана подгрупа. Причината за това е уникалният левкемогенен механизъм на тези мутации. Те водят до експресия на мутантни изоцитратдехидрогенази 1 и 2 с неоморфна каталитична активност, водещи до преференциално образуване на онкометаболита 2-хидроксиглутарат, а не на нормалния метаболит 2-кетоглутарат. Това води до конкурентно инхибиране на редица ензими, наречени диоксигенази, от които голяма част участват в епигентичната регулация на клетката. Поради тази причина *IDH1/2* мутациите имат както директен препрограмиращ ефект, така и паракринен върху левкемични клетки, които не притежават тези мутации. Чрез методите на компютърното моделиране бяха разработени специфични инхибитори на мутантен *IDH2* (AG-221; еназидениб) и мутантен *IDH1* (AG-120; ивозидениб) ензим.

До този момент са публикувани междинните резултати от фаза 1/2 проучване с *IDH2* инхибитора еназидениб при рефрактерна/рецидивирала ОМЛ с такива мутации (9, 10). Те показват, че в перорална доза от 100 мг дневно еназидениб води до честота на общ отговор от 38.5% като при 26.6% от пациентите се постига пълна ремисия или пълна ремисия с непълно хематологично възстановяване. Медианата на продължителността на отговора е 5.6 месеца и обща преживяемост от 9.3 месеца спрямо 3 месеца при стандартна терапия. Подгруповият анализ показва, че отговорът към еназидениб може да зависи от вида на мутацията. Отговорът също така не зависи от превалирането на клона с мутация и потвърждава паракринното действие на онкометаболита 2-хидроксиглутарат. Специфично усложнение на еназидениб е т.нар. диференциационен синдром, който се развива поради индуцираната диференциация на миелоидните бласти при около 14% от пациентите и не се повлиява от незабавното спиране на приема на лекарството. Опасността от този синдром е включена като предупреждение към кратката характеристика на продукта при полученото бързо одобрение от FDA през август 2017 г. като лекарство-сирак за рецидивирала/рефрактерна ОМЛ с мутация на *IDH2*.

ГЕМТУЗУМАБ ОЗОГАМИЦИН

Гемтузумаб озогамицин (ГО) е едно „възкресено“ през 2017 г. лекарство. То представлява хуманизирано моноклонално антитяло-конюгат с токсина калихеамицин, насочено срещу човешкия CD33 антиген. Експресията на CD33 върху левкемичните миелобласти е вариабилна като, около 2/3 от пациентите показват експресия в поне 75% от левкемичните клетки, а всички пациенти имат откриваема експресия в поне част от бластите. През 2000 г. лекарството получи ускорено одобрение от FDA за лечение на ОМЛ с експресия на CD33 при пациенти над 60 години и предупреждение за повишена честота на венооклузивна

болест (ВОБ). През 2010 г. обаче лекарството беше изтеглено от пазара поради липсата на подобрени клинични резултати от фаза 3 проучването S0106 на SWOG групата и по-високата индукционна смъртност в групата, лекувана с ГО в доза 6 mg/m². След 2010 година обаче станаха известни резултатите от няколко големи академични проучвания в Европа (GOELAMS, AML2006IR, 39 MRC AML15, 40 ALFA-070141 и NCRI AML1642). Особено впечатляващи са резултатите от проучването ALFA-0701 с рандомизирани 278 пациенти с ОМЛ на възраст 50–70 години [11]. Проучването е с 2 рамена – индукция само с даунорубицин (60 mg/m²) или в комбинация с фракциониран ГО (3 mg/m² на ден 1, 4 и 7), както и еднократна доза ГО (3 mg/m²) на ден 1 от двата цикъла консолидация. При сходна честота на пълна ремисия пациентите, лекувани с ГО, са със значимо по-добра медиана на преживяемостта без събития (19.6 спр. 11.9 месеца; p=0.00018) и обща преживяемост (34 спр. 19.2 месеца; p=0.046). При това обаче ефектът е ограничен до цитогенетичните подгрупи с благоприятен и междинен риск. Тези заключения се потвърждават и от голям метаанализ на 3325 пациенти, нелекувани преди това ОМЛ, а именно, че ГО в комбинация със стандартна индукционна химиотерапия подобряват преживяемостта при пациенти с благоприятен и междинен цитогенетичен риск [12]. Честотата на вено-оклузивната болест е зависима от дозата на ГО, като е значимо по-ниска при 3 mg/m² спрямо 6 mg/m².

ДРУГИ НАДЕЖДИ

През 2017 г. FDA одобри за лечение на свързана с терапия ОМЛ или ОМЛ с диспластични промени и продуктът CPX-351, който представлява микрозомално енкапсулирана смес от цитарабин и даунорубицин в оптимизирано съотношение 5:1. Обнадеждаващи са и първоначалните резултати с *BCL2* инхибитора венетоклакс при пациенти с ОМЛ в напреднала възраст.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

През последните две години бяха направени на пръв поглед малки, но всъщност значими постижения в разработването и утвърждаването на подходи за персонализирано поведение при такова тежко заболяване като острата миелоидна левкемия. Разбира се, ще са необходими няколко години до осезаема промяна в прогнозата на пациентите в резултат на тези постижения. Необходимо са и политически, и финансови решения, които да направят усилията на няколко поколения изследователи и клиницисти бързо достъпни до възможно най-голям брой нуждаещи се по целия свят.

КОНФЛИКТ НА ИНТЕРЕСИ

Авторът на тази статия декларира липсата на каквито и да е потенциални конфликти на интереси.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Sant M, Minicozzi P, Mounier M, Anderson LA, Brenner H, Holleccek B, et al. Survival for haematological malignancies in Europe between 1997 and 2008 by region and age: results of EURO CARE-5, a population-based study. *Lancet Oncol.* 2014 Aug; 15(9):931–42.
2. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SA, Behjati S, Biankin AV, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature.* 2013 Aug 22; 500(7463):415–21.
3. Ley TJ, Miller C, Ding L, Raphael BJ, Mungall AJ, Robertson A, et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2013 May 30; 368(22):2059–74.
4. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med.* 2014 Dec 25; 371(26):2488–98.
5. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* 2016 Jun 09; 374(23):2209–21.
6. Gerstung M, Papaemmanuil E, Martincorena I, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, et al. Precision oncology for acute myeloid leukemia using a knowledge bank approach. *Nat Genet.* 2017 Mar; 49(3):332–40.
7. Dohner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood.* 2017 Jan 26; 129(4):424–47.
8. Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, Laumann K, Geyer S, Bloomfield CD, et al. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *N Engl J Med.* 2017 Aug 03; 377(5):454–64.
9. Stein EM, DiNardo CD, Pollyea DA, Fathi AT, Roboz GJ, Altman JK, et al. Enasidenib in mutant IDH2 relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood.* 2017 Aug 10; 130(6):722–31.
10. Amatangelo MD, Quek L, Shih A, Stein EM, Roshal M, David MD, et al. Enasidenib induces acute myeloid leukemia cell differentiation to promote clinical response. *Blood.* 2017 Aug 10; 130(6):732–41.
11. Castaigne S, Pautas C, Terre C, Raffoux E, Bordessoule D, Bastie JN, et al. Effect of gemtuzumab ozogamicin on survival of adult patients with de-novo acute myeloid leukaemia (ALFA-0701): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet.* 2012 Apr 21; 379(9825):1508–16.
12. Hills RK, Castaigne S, Appelbaum FR, Delaunay J, Petersdorf S, Othus M, et al. Addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy in adult patients with acute myeloid leukaemia: a meta-analysis of individual patient data from randomised controlled trials. *Lancet Oncol.* 2014 Aug; 15(9):986–96.

МОЛЕКУЛЯРНА ДИАГНОСТИКА НА ПЪРВИЧНИ ИМУННИ ДЕФИЦИТИ – МЯСТОТО НА ТЕХНОЛОГИИТЕ ЗА СЕКВЕНИРАНЕ ОТ СЛЕДВАЩО ПОКОЛЕНИЕ

*С. Михайлова, Н. Гешева, С. Лесичкова, П. Янкова,
М. Балева, Е. Наумова*

*Клиника по клинична имунология с банка за стволови клетки,
УМБАЛ „Александровска“ ЕАД, Катедра клинична лаборатория и клинична
имунология, МУ – София*

РЕЗЮМЕ

Геномната медицина е нова структурирана стратегия за диагностициране и терапевтично повлияване на заболявания, която се основава на информация от човешката геномна последователност. Технологиите за секвениране от следващо поколение (NGS) притежават потенциал за едновременно, бързо, цялостно, диференциално диагностично тестване на моногенни заболявания, което е от полза за поставянето на дефинитивна диагноза и свежда до минимум продължителността на емпиричното лечение и времето за генетично консултиране. Първичните имунни дефицити (ПИД) са идеален таргет за подобни анализи поради тяхната хетерогенна природа и в много случаи значително разминаване между генотип и фенотип. Целта на нашата работа беше да тестваме и оценим ролята на таргетната NGS технология за диагностиката на 3 пациенти, характеризиращи се със сложна или атипична клинична картина, предполагаща ПИД. При един пациент достигнахме до генетична диагноза, въпреки че намереният вариант не е описан до този момент, но притежава всички характеристики на патогенен. При един пациент мутациите са свързани с неочаквани клинични признаци, разширявайки фенотипния спектър на типичните ПИД. Това налага допълнителен анализ с оглед постигане на корелация между промените в генома и изявената патология. При един индивид не се потвърди молекулярна първопричина за имунните нарушения. Въз основа на тези резултати, макар и при малък брой пациенти, бихме могли да заключим, че идентифицирането на генетични дефекти при пациенти с ПИД все още е голямо предизвикателство и функционалното им потвърждаване е необходимост с цел категорично доказване връзката между генетичната промяна и изявения фенотип. Въпреки това считаме, че NGS технологиите биха могли да се използват като диагностичен подход от първа линия за оценка на комплексните ПИД.

Ключови думи: първични имунни дефицити, NGS технологии.

Адрес за кореспонденция: доц. д-р С. Михайлова, Клиника по клинична имунология с банка за стволови клетки, УМБАЛ „Александровска“ . „Г. Софийски“ 1, София 1431

MOLECULAR DIAGNOSIS OF PRIMARY IMMUNE DEFICIENCY AND
NEXT GENERATION SEQUENCING TECHNOLOGIES*S. Mihaylova, N. Gesheva, S. Lesichkova, P. Yankova, M. Baleva, E. Naumova*

RESUME

Genomic medicine is a new, structured strategy to disease diagnosis and management that features genome sequence information. Next-generation sequencing (NGS) technologies has the potential for simultaneous, rapid, comprehensive, differential diagnostic testing of monogenic illnesses, which benefits definitive diagnoses and minimizes the duration of empirical treatment and time to genetic counseling. Primary immune deficiencies (PID) are the ideal target for such kind of analysis because of their heterogeneous nature and in many cases profound genotype-phenotype dissociation. The aim of our work was to test and evaluate the role of targeted NGS in the diagnosis of 3 patients, characterized by complex or atypical clinical features suggesting a PID. We reached a conclusive genetic diagnosis in one patient although the variant found has not been described previously. In one patient mutations were associated with unexpected clinical features, expanding the phenotypic spectrum of typical PIDs so further analysis needs to be performed in order to correlate the genome changes with patient's pathology. In one individual no causative variants of the disorder were confirmed. Based on these considerations, the identification of genetic defects in patients with PIDs is still a major challenge, and the functional implication of the variation must be considered mandatory to definitely prove the relationship between the genetic alteration and the related phenotype. Nevertheless we believe that NGS technologies could be used as a first-line genetic approach for the evaluation of complex PIDs.

Keywords: primary immune deficiencies, NGS technologies.

Correspondence: assoc. prof. S. Mihajlova, Depart. Clinical Immunology with stem cells bank, University Hospital Alexandrovska, 1. G.Sofiiski str. Sofia 1431

Първичните имунни дефицити (ПИД) са група заболявания, причинени от дефекти в един или няколко компонента на имунната система. Пациентите с ПИД обикновено са с повтарящи се или тежки инфекции, трудно овладяващи се с конвенционална терапия. Видовете инфекции при пациенти с ПИД зависят от това кои компоненти на имунната система са засегнати и често предоставят първите сведения за естеството на имунологичния дефект. Известно е, че повечето ПИД са генетични заболявания и понастоящем са идентифицирани над 240 гени, свързани с различни нозологии. Поради клиничната хетерогенност и широко припокриващите се фенотипи сред ПИД често е предизвикателство да се постигне окончателна клинична диагноза.

Съгласно една от последните класификации (Union of Immunological Societies Expert Committee) ПИД се подразделят в девет категории, а именно (1) комбинирани имунодефицити; (2) комбинирани имунодефицити с асоциирани или синдромни характеристики; (3) предимно недостиг на антитела; (4) болести на имунната дерегулация; (5) вродени дефекти в броя или функцията на фагоцитите или и двете; (6) дефекти в естествения имунитет; (7) автовъзпалителни

нарушения; (8) дефекти на комплементарната система; и (9) фенотип на ПИД [1]. Докато някои от ПИД се вписват в повече от една от тези категории, признаците и симптомите на различните дефицити от различни категории се припокриват значително, което още веднъж показва изключителните диагностични трудности. Стандартната оценка на пациентите със съмнение за имуноен дефицит се ръководи от клиничната картина, първоначалните скринингови тестове, които включват фенотипни и функционални изследвания, като пълна кръвна картина с диференциално броене, серумни нива на имуноглобулини и комплемент, определяне титъра на специфични антитела, определяне на лимфоцитни популации чрез имунофенотипизиране и др. Въз основа на резултатите от скрининговите тестове се преценява прилагането на тестове на второ ниво като антителен отговор след бустер имунизация, продукцията *in vitro* на имуноглобулини в отговор на митогени или цитокини, *in vitro* лимфоцитен пролиферативен отговор към митогени и антигени, кожни тестове на забавена свръхчувствителност към различни антигени, измерване на оксидативен взрив и др. [2–5]. Въпреки че тези тестове са подходящи за основна оценка на заболяванията, резултатите от тях категоризират пациентите в групи от хетерогенни заболявания независимо от променливия фенотип и изход от заболяването (ниска специфичност) [6, 7]. Освен това стандартните тестове могат да бъдат нормални при пациенти с ПИД (ниска чувствителност) и диагнозата може да бъде пропусната, ако не бъде открит специфичен молекулярен дефект [8].

Подходът към молекулярната диагностика на PID през последните две десетилетия включва Sanger последователността на екзоните или мутацията, обхващащи региони на специфични кандидат гени, изследване на единични нуклеотидни полиморфизми (SNP), linkage анализи, картографиране на хомозиготност и клинично-патологична корелация с резултати от функционални тестове [9–11]. Въпреки това в много случаи тези подходи не водят до окончателна молекулярна диагноза, като причините са многофакторни. Освен това за гените, за които има разработени диагностични тестове, традиционният подход е селектиране на единични гени или малки панели от генетични тестове. Изборът на подходящи гени за анализ се усложнява от клиничната и генетичната хетерогенност и припокриването между много от ПИД. Освен това разходите за извършване на множество клинични и селектирани генетични тестове могат да достигнат до над 3000 \$ на пациент. Взети заедно, тези фактори определят субоптимална стратегия за молекулярно тестване, което може да отнеме месеци до години, а в някои случаи и изобщо до невъзможност за поставяне на молекулярна диагноза.

Секвениране от следващо поколение (Next Generation Sequencing-NGS)

NGS технологията представлява масивно паралелно едновременно секвениране на голям брой ДНК или кДНК фрагменти. Секвенирането може да бъде извършено върху целия геном или насочено към специфични региони. Примери за последното са изследване на подгрупа от гени (т.е. NGS мултиплексен панел) и секвениране на всички кодиращи генни региони, т.нар. екзомно секвениране.

В сравнение с геномното и екзомното секвениране, изследването на таргетни (мултиплексни) панели обикновено позволява по-голяма дълбочина на покритие на последователностите, което от своя страна води до по-висока прецизност, подобрена чувствителност и по-малко неанализирани области [12–14]. Допълнително предимство на таргетното секвениране е, че се намалява рискът от случайни открития, като например детекция на носители, интерпретация на хипотетичен бъдещ риск или пре-симптоматично състояние [15, 16]. Освен това таргетното панелно секвениране би могло да е с по-ниска себестойност в сравнение с екзомното, или геномно, изследване поради по-малкия общ целеви размер. Недостатъците на технологията е, че тя се ограничава до анализ на набор от гени и/или региони в панела, което означава, че методът не е в състояние да идентифицира нови причини за генетични нарушения. Това се отнася особено до ПИД, при които ежегодно се описват над 10 нови патогенни варианта.

С настоящата работа си поставихме за цел да тестваме капацитета на таргетната NGS технология с диагностична цел при трима пациенти със сложни, атипични клинични фенотипи, при които своевременното диагностициране с наличните тестове се оказва трудно/времеотнемащо или при които генетичната диагностика има решаващо значение за оценка на риск за проява на дефект в семейството.

Пациент #1

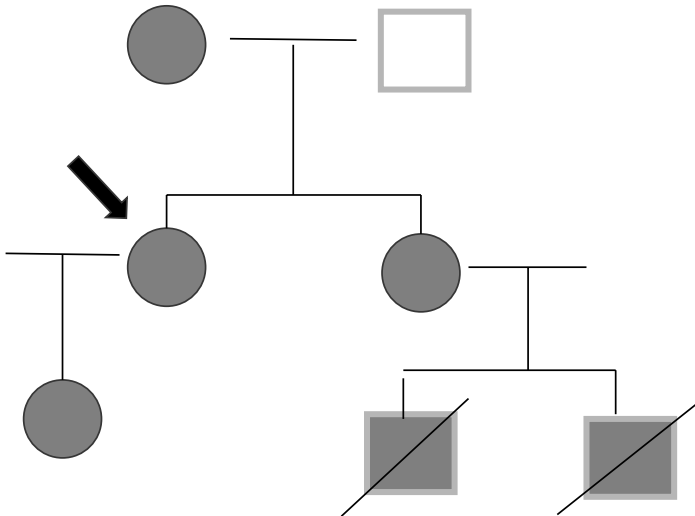
Момиче на 13 г. От анамнестичните данни, на двудневна възраст е установена сърдечна малформация – транспозиция на големите съдове, междукламерен дефект и коарктация на аортата, коригирани оперативно. По време на сърдечната операция в оперативния протокол е описано „извършване на тимектомия“. На тригодишна възраст е диагностицирана бронхиална астма, за която се провежда системно лечение. От същата възраст започва изява на чести инфекции, свързани основно с възпаление на ГДП, като се съобщава за прекарана пневмония. През 2011 г. е установен намален слух и е протезирана. С астигматизъм. От неколккратно проведените имунологични изследвания е диагностицирана персистираща абсолютна лимфопения (0.83×10^3 кл/ μ l). Понижени са общите Т-лимфоцити, с основно засягане на CD3+/CD8+ супресорно-цитотоксичната популация (13%). ZAP70 в CD3+ лимфоцитите е 94.7%. При функционално изследване на Т-клетки се наблюдава нормална експресия на CD69 върху Т-лимфоцитите при стимулация с РНА и понижена (30,3%) при специфична стимулация посредством CD3/CD28 сигналния път. От хуморалния имунитет са измерени слабо повишени стойности на ИгМ на фона на нормални серумни нива на ИгГ, ИгА и ИгЕ, но при леко понижена стойност на ИгГ1. Изследваният титър на антитела, образувани в отговор на прилаган в миналото тетанус-антиотоксин, е в референтни граници. Във връзка с клиничната картина и имунологичните особености пациентката беше насочена за изключване на микроделеционни синдроми (изследване в Национална генетична лаборатория), като последните бяха отхвърлени.

Пациент #2

Жена на 38 г. без клинични оплаквания. Поводът за изследване е обременена фамилна анамнеза за починали две момчета в ранна детска възраст на нейната сестра (Фигура 1). Децата са били със съмнение за хронична грануломатозна болест (CGD), но без провеждани изследвания. При пациентката се търси носителство на мутация в X-хромозомата по повод на генетична консултация, свързана с планиране на бременност. Проведеният DHR тест при нея показва наличие на две клетъчни популации (съответно по 45,5% всяка), като при едната клетъчна популация се наблюдава нормален оксидативен взрив, а при другата – липса на такъв (Фигура 2). Този образ е характерен за жени – хетерозиготни носителки на дефекта.

Пациент #3

Момиче на 7 г. Родена в 37 г. с. от втора, патологично протекла бременност. С инфекция непосредствено след раждането, третирана с антибиотици. На 20 дни е била с инфекция на ГДП. На 3-месечна възраст, отново с дихателна инфекция, изолирани при микробиологичното изследване – *Str. pneumoniae* и *Staph. Aureus*. От тогава до момента с 4 епизода на интестинални инфекции, 7 епизода на пневмония. Съобщава се за средно по 10 епизода на инфекции на ГДП в рамките на 1 година. От гърлен секрет – многократно се изолира *S. Albicans*. По време на инфекциозните епизоди се наблюдава неутропения (до $1 \times 10^{12}/L$). Нормално физическо и психическо развитие за възрастта. Без фамилна обремененост. От имунологичните изследвания с данни за нискостепенна лимфопения. Общите Т-клетки варират между 51–60%, CD4+ (23–31%), CD8

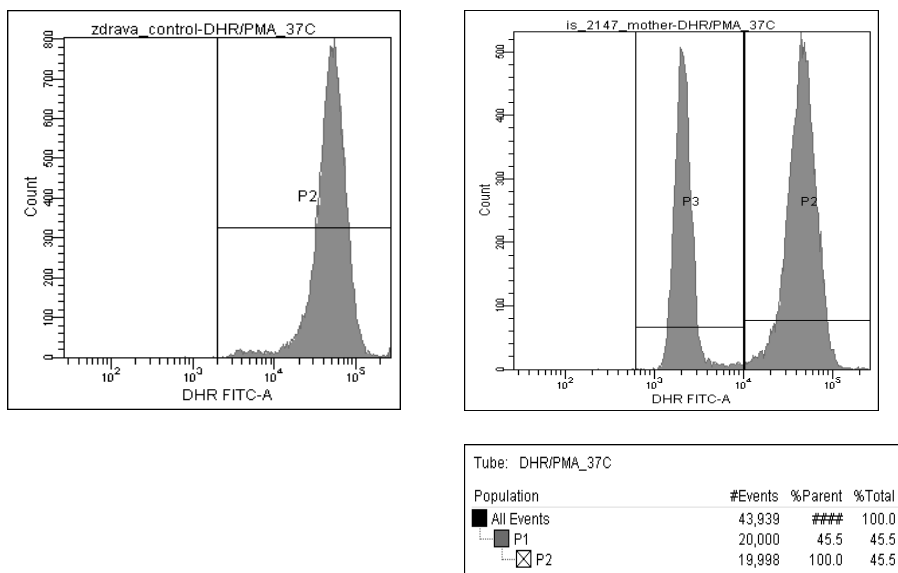


Фигура 1. Фамилно дърво, на което са демонстрирани жените, носителки на дефект в X-хромозомата, отговорен за CGD, като със стрелка е отбелязана изследваната от нас пациентка. Двете починали момчета на сестрата на пациентката са били със съмнение за CGD.

(1–207%), В-клетки (14–19%) и NK клетки (20–30%). Нормален Т-клетъчен активационен тест с РНА и понижен с CD3/28. Нормален антитялов отговор към дифтерия и тетанус и нормални стойности на серумните имуноглобулини.

Пациентите / техните родители подписаха информирано съгласие за извършване на генетично изследване.

Геномна ДНК беше изолирана от периферни мононуклеарни кръвни клетки с помощта на микросферова автоматизирана технология (*iPrep PureLink gDNA Blood Kit*, Invitrogen). Пробите бяха подготвени за таргетно секвениране чрез TruSight One Sequencing Panel (Illumina, San Diego, CA, САЩ) кит за приготвяне на библиотека. Панелът обхваща 12 Mb геномно съдържание, включващо 4813 гени, свързани със специфични клинични фенотипове, основно за диагностика на монозомни заболявания. От тях 307 са гени, асоциирани с ПИД. Това покрива актуалния към 2017 г. набор от известни ПИД гени с изключение на 22 (IKAROS, FLH (NOTO), CLEC6A, CIAS1, LRBA, REXAP, STAT5A, CARD11, RPP30, RHON, LCK, MALT1, IKBKB, RTEL1, POLE1, TTC7A, TCF3, TWEAK, NFKB2, PRKCD, TNFRSF6B, ISG15). Последните са характерни за изключително рядка и специфична патология. Секвенирането се извърши на Illumina MiniSeq платформа, с която разполага нашата клиника. Подравняването на секвенциите, дефинирането на вариантите и анализът бяха извършени чрез Illumina VariantStudio 3.0. Подходът при анализа беше свързан с изпробване на различни критерии за филтриране на вариантите с цел оптимално откриване на болест-асоциирани единични нуклеотидни замени и къси индели. Взеха се под внимание следните параметри:



Фигура 2. Хистограми от проведения DHR тест. А – здрава контрола; Б – изследваната от нас пациентка

– Minimal read depth (минимална дълбочина на четене). Само варианти с обща дълбочина на четене от най-малко 20, както и такива, преминали стандартните филтри.

– Variant consequence. Само стоп-кодон въвеждащи (nonsense), missense, нарушаващи местата на сплайсинг единични нуклеотидни варианти и инсерции/делеции (индели), за които се предполага, че нарушават транскрипционната рамка на четене.

– Анотация. Хетерозиготни варианти са взети предвид само ако са анотирани като имащи клинично значение. Хомозиготността е анализирана независимо от анотацията.

– Честотата в европейските популации, както и EVS глобалната честота <1,0%, независимо от Polyrn/SIFT анотацията.

– За допълнителна сигурност при анализа на данните и независимо от изброените по-горе филтриращи показатели бяха прегледани и оценени всички възможни варианти във всеки един от гените (без интронните участъци), описани като свързани с имунни дефицити (307 гена).

Първичните резултати показаха наличие на общо 1 867 578, 1 041 848 и 1 062 701 варианта съответно при пациенти #1, 2 и 3. След използване на различните описани филтриращи стратегии за по-задълбочен анализ останаха средно по 6000 варианта на пациент.

При анализа на информацията от 4800 гена и при тримата пациенти се установиха варианти, свързани с патология, различна от ПИД, но само в хетерозиготно състояние (носителство). В хетерозиготно състояние бяха установени и някои варианти, потенциално имащи отношение към имунната система и имунологичните механизми, но без дефинитивен патогенетичен потенциал.

При пациент #1 не беше намерен нито един вариант, свързан с имуноен дефицит. Поради високата суспекция за SATCH 22 синдром и по този метод се изключиха варианти, характерни за делеции в хромозома 22. Ето защо на този етап приемаме, че имунният дефицит е вторичен или неуточнен (дължащ се на дефект в други гени, извън изследваните 307).

При пациент #3 се установи A>C/C вариант в хомозиготно състояние в гена FCGR3A, хромозома 1 (координати 161518333. Мутацията е „missense“ (L102R) и е оценена в ClinVar базата данни като патогенна за т.нар. имунодефицит-20, като същевременно честотата на C-алела в европейската популация е 5,7. Имунодефицит-20 е рядък автозомно рецесивен първичен имуноен дефицит, описан от един автор и характеризиращ се с функционален дефицит на НК клетките. При пациентите с този дефицит НК клетките са с нарушена спонтанна клетъчна цитотоксичност, като същевременно запазват антитяло-зависимата клетъчна цитотоксичност. Клиничната изява започва в ранна детска възраст с тежки вирусни инфекции, особено причинени от семейството на херпес вирусите (в частност вируса на Epstein Barr (EBV) и човешкия папиломавирус (HPV) (Grier et al., 2012, Genetic Testing Registry). Предвид тази находка е уместно изследване на НК-клетъчната цитотоксичност при пациентката за по-нататъшно уточняване

и оценка на взаимовръзката между намерения вариант и клиничната картина. При детето също установихме носителство на „missence“ вариант в AP3B1 (хромозома 5) A>A/T, в хетерозиготно състояние, който не се среща в европейските и други популации. Съгласно ClinVar Significance базовата замяна е оценена едновременно като доброкачествена и патогенна. Дефекти в AP3B1 гена са причина за възникване на тип 2 синдром на Hermansky-Pudlak. Последният се характеризира с понижени НК клетки и намалена цитотоксична Т-клетъчна активност в комбинация с парциален албинизъм, повтарящи се инфекции, белодробна фиброза, склонност към кървене, неутропения, хемофагоцитна лимфохистиоцитоза. Както е видно, клинично-лабораторната характеристика при пациентката само частично се припокрива с критериите на описания синдром. Необходимо е в случая да се уточни, че синдромът на Hermansky-Pudlak е автозомно рецесивно заболяване и при хетерозиготни варианти (както е в случая), особено когато те са новооткрити, е трудно да се предвиди ефектът на последните върху фенотипната изява.

Най-голяма диагностична успеваемост чрез използване на NGS технологията се постигна при пациент #2. Предполаганото носителство на дефектен вариант, свързан с CGD, се потвърди чрез установяване на G<G/A missence мутация (G389R) в X-хромозомата (координати 37664272), оценена по SIFT/PolyPhen системата като увреждаща, с нулева честота не само за европейските, но и за всички изследвани популации в световен мащаб (Фигура 3). Откритата от нас базова замяна е новоописана, предстои потвърждаване със Сангер технологията, както и в други членове на семейството (майка, сестра). Предвижда се и колаборация със специализирани центрове за функционално потвърждаване. При пациентката установената от нас мутация би могла да се използва като маркер за генетична диагностика при настъпване на бременност или на преимплантационно ниво.

Напредъкът на NGS технологиите даде възможност на лекарите да анализират множество гени, което от своя страна предостави възможности за диагностика на пациенти, засегнати от комплексни нарушения на имунната система. Допълнително се увеличиха и познанията върху патогенезата на тези генетични заболявания. В това проучване използвахме NGS технология за идентифициране на потенциални патогенни мутации при пациенти с клинични фенотипи, предполагащи подлежащ ПИД и които не са диагностицирани посредством традиционните имунологични методи. Задоволителна молекулярна диагностика на ПИД чрез тестваната от нас платформа (TruSight One Sequencing Panel, Illumina) въпреки малкия брой проби се постигна при 1 от трима изследвани пациенти. При един пациент резултатите са неубедителни и изискват допълнителна генотипо-фенотипна оценка. Съобщаваната диагностична успеваемост на други центрове варира между 20–30%. Така например *Vera Gallo и съпр. съобщават за диагностицирани 7 от 45 пациенти (16%), включително 3 с нетипична презентация чрез NGS изследване на екзоните на 571 гена [17]. Наред с все още относително ниската диагностична успеваемост при пациенти с хетерогенни*

Фигура 3. Установената мутация в СУВВ гена (отбелязана със затъмнената площ) при пацетката при анализ с Shumina VariantStudio 3.0. Останалите неблагоприятни варианти в другите гени са с честота над 1 в европейската популация и показват хетерозиготно носителство.

Gene	Variant	Chr	Coordinate	Type	Genoty	Exonic	Filters	Quality	GOX	Protein Pos	Amino Acid	Codons	Transcript Sift	PolyPhen
BMP2K	C>G	4	79792166	snv	het	yes	PASS	242	35	487	H/Q	caC/caG	tolerated - low confi	unknown (0)
EPX	A>A/T	17	56280447	snv	het	yes	PASS	224	40	572	N/Y	Aat/Tat	deleterious (0)	probably damaging (1)
GPD1	G>G/A	12	50500071	snv	het	yes	PASS	405	35	121	G/R	Ggg/Agg	deleterious (0)	probably damaging (1)
RABL6	G>G/A	9	139733747	snv	het	yes	PASS	313	17	524	G/S	Ggt/AgT	tolerated - low confi	unknown (0)
MAP2	G>G/T	2	210558134	snv	het	yes	PASS	329	35	414	A/S	Gcc/Tcc	tolerated - low confi	benign (0.021)
ITGA2B	C>C/T	17	42453084	snv	het	yes	PASS	135	33	868	V/M	Gtg/Atg	deleterious (0.01)	benign (0.396)
TRPM1	C>C/G	15	31318422	snv	het	yes	PASS	285	23	1200	Q/H	caG/caC	deleterious (0)	benign (0.115)
SPAST	C>C/T	2	32289031	snv	het	yes	PASS	356	35	44	S/L	tCg/tTg	deleterious (0)	unknown (0)
KIF6	C>C/T	6	39311554	snv	het	yes	PASS	319	18	787	G/R	Ggg/AgA	deleterious (0)	probably damaging (1)
ZBTB40	C>C/T	1	22846655	snv	het	yes	PASS	242	21	979	P/S	Ccc/Tcc	deleterious (0)	benign (0.001)
UBN2	T>T/G	7	138968412	snv	het	yes	PASS	147	38	921	S/A	Tct/Gct	tolerated - low confi	benign (0.002)
PTK7	G>G/A	6	43098393	snv	het	yes	PASS	176	38	277	R/H	cGc/cAc	deleterious (0.03)	benign (0.074)
AFP	C>C/G	4	74319538	snv	het	yes	PASS	370	35	570	A/G	gCt/gCt	deleterious (0.05)	benign (0.065)
NDUFB3	C>C/T	2	201943624	snv	het	yes	PASS	154	37	7	H/Y	Cat/Tat	deleterious (0.01)	benign (0)
G6PD,IKBK	C>C/A	X	153775032	snv	het	yes	PASS	109	37	18	E/D	gAg/gAT	tolerated - low confi	benign (0.006)
CYBB	G>G/A	X	37664272	snv	het	yes	PASS	122	36	389	G/R	Ggg/Agg	deleterious (0)	probably damaging (1)
TMPPRSS6	C>C/T	22	37470650	snv	het	yes	PASS	206	33	490	V/I	GtT/AtT	deleterious (0.01)	possibly damaging (0.866)
KIR2DL1	C>C/A	19	55284986	snv	het	yes	PASS	51	24	91	T/K	aCg/aAg	deleterious (0.02)	benign (0.113)
FBN3	A>A/G	19	8175780	snv	het	yes	PASS	286	35	1428	C/R	Tgc/Cgc	deleterious (0)	probably damaging (0.961)
ACSM2B	A>A/G	16	20554542	snv	het	yes	PASS	429	35	442	W/R	Tgg/Cgg	deleterious (0.03)	benign (0.153)
AKAP13	G>G/A	15	86125014	snv	het	yes	PASS	242	34	1239	A/T	Gca/Aca	tolerated - low confi	benign (0.001)
TP53BP1	G>G/A	15	43724612	snv	het	yes	PASS	205	29	1152	P/L	cCc/cTc	deleterious (0.01)	benign (0.098)

прояви, другите недостатъци на NGS технологията могат да бъдат обобщени по следния начин: от решаващо значение са използването на различни платформи, био-информационни програми, анализи и алгоритми и не на последно място – опитът на анализатора; в диференциално-диагностично отношение от значение е познаването на ПИД гени, свързани с мутации, причиняващи заболявания, които не са добре откриваеми от NGS. В такива случаи се препоръчва консултация с клиничен имунолог и/или молекулярен генетик с висока степен на експерни познания за преценка на най-подходящия тест; молекулярната диагноза предшества разбирането на патофизиологията, водеща до клиничната изява при някои пациенти; при установяване на потенциално нови гени или фенотипове са необходими функционални изследвания и модели, за да се докаже биологичният и патогенен ефект на варианта(ите); методи за измерване на въздействието на епигенетичните фактори като ДНК метилиране и хистонова модификация или епистаза все още не са налични за използване при диагностични оценки на ПИД; висока себестойност при анализ на по-малък брой проби. Въпреки изброените ограничения NGS технологията представлява ефективен и бърз генетичен подход от първа линия за оценка на сложни случаи на пациенти с ПИД. Основното предимство е едновременното секвениране на панел от гени, което е с потенциал за бърза диагностика. Бързата диагноза от своя страна има безспорно клинично предимство, позволяващо инициране на подходящо и често животоспасяващо лечение.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Picard C, Al-Herz W, Bousfiha A, et al. Primary Immunodeficiency Diseases: an Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency 2015. *J Clin Immunol* 2015; 35(8):696-726.
2. Bonilla FA, Bernstein IL, Khan DA, et al. Practice parameter for the diagnosis and management of primary immunodeficiency. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2005; 94(5 Suppl 1):S1-S63.
3. Lim MS, Elenitoba-Johnson KS. The molecular pathology of primary immunodeficiencies. *J Mol Diag* 2004; 6(2):59-83.
4. Tangsinmankong N, Bahna SL, Good RA. The immunologic work-up of the child suspected of immunodeficiency. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2001; 87(5):362-9. quiz 70, 423.
5. Ochs HD, Hagin D. Primary immunodeficiency disorders: general classification, new molecular insights, and practical approach to diagnosis and treatment. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2014; 112(6):489-95.
6. Jolles S. The variable in common variable immunodeficiency: a disease of complex phenotypes. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2013; 1(6):545-56.
7. Cunningham-Rundles C. The many faces of common variable immunodeficiency. *Hematol / Educ Program Am Soc Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 2012; 2012:301-5.

8. de Jong R, Altare F, Haagen IA, et al. Severe mycobacterial and Salmonella infections in interleukin-12 receptor-deficient patients. *Science* 1998; 280(5368):1435–8.
9. Chou J, Ohsumi TK, Geha RS. Use of whole exome and genome sequencing in the identification of genetic causes of primary immunodeficiencies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2012; 12(6):623–8.
10. Nijman IJ, van Montfrans JM, Hoogstraat M, et al. Targeted next-generation sequencing: a novel diagnostic tool for primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 133(2):529–34.
11. Platt C, Geha RS, Chou J. Gene hunting in the genomic era: approaches to diagnostic dilemmas in patients with primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol* 2013.
12. Bell CJ, Dinwiddie DL, Miller NA, et al. Carrier testing for severe childhood recessive diseases by next-generation sequencing. *Sci Transl Med*.2011; 3(65):65ra4.
13. Kingsmore SF, Dinwiddie DL, Miller NA, et al. Adopting orphans: comprehensive genetic testing of Mendelian diseases of childhood by next-generation sequencing. *Expert Rev Mol Diagn* 2011; 11(8):855–68.
14. Rehm HL. Disease-targeted sequencing: a cornerstone in the clinic. *Nat Rev Genet* 2013; 14(4):295–300.
15. Burke W, Matheny Antommara AH, Bennett R, et al. Recommendations for returning genomic incidental findings? We need to talk! *Genet Med* 2013.
16. Biesecker LG. Incidental variants are critical for genomics. *Am J Hum Genet* 2013; 92(5):648–51.
17. Gallo V, Dotta L, Giardino G, et al. Diagnostics of Primary Immunodeficiencies through Next-Generation Sequencing. *Frontiers in Immunology* 2016; 7:466.

ЛАБОРАТОРНАТА ДИАГНОЗА НА ОСТЕОАРТРОЗАТА

К. Икономова

Национална многопрофилна транспортна болница – София

РЕЗЮМЕ

По епидемиологични данни 80% от популацията над 65 години е засегната от различни форми на остеоартроза (ОА). В патогенезата на заболяването участват множество фактори – възраст, генетични и метаболитни фактори, анатомични отклонения, възпаление, хронична имунна активация. Комбинирането им води до биофизични и биохимични промени в хрущяла с последващото му разрушаване.

При лабораторната диагноза на ОА най-напред се провеждат тестове, насочващи за причината на ставната симптоматика. Тъй като много заболявания се манифестират със ставни болки, се изследват възпалителни маркери (СУЕ, CRP), пикочна киселина, автоантитела (АНА, РФ, анти-ССР), антитела срещу микробни причинители (лаймска болест, хламидия трахоматис). За уточняване на ставната симптоматика се назначават генетични маркери (HLA – В27), изследва се ставна течност, извършва се кожна и мускулна биопсия.

Молекулните маркери при ОА – hsCRP, MMP, HA, COMP, KS, YKL-40, uCTH-II, PINP-N дават възможност за поставяне на ранна диагноза, оценка активността и тежестта на заболяването, както и оценка на ефекта от приложеното лечение.

В бъдеще се очаква валидиране на нови, по-надеждни лабораторни маркери за ранна диагноза, проследяване и лечение на остеоартрозата.

Ключови думи: остеоартроза, лабораторни програми, молекулни биомаркери.

Адрес за кореспонденция: проф. д-р Красимира Икономова, Национална многопрофилна транспортна болница – София, бул. „Мария Луиза“ № 108; E-mail: ikonovak@yahoo.com

LABORATORY DIAGNOSIS OF OSTEOARTHRITIS

К. Ikonovova

National Multiprofile Transport Hospital – Sofia

SUMMARY

According to epidemiological data 80% of the population over 65 years of age is affected by various forms of osteoarthritis (OA). In the pathogenesis of the disease many factors are included – age, genetic and metabolic factors, anatomical abnormalities, inflammation, chronic immune activation. Their combination leads to biophysical and biochemical changes and subsequent cartilage destruction.

In the laboratory diagnosis of OA first tests are related to determining the cause of joint symptoms. As many diseases are manifested by joint pain special tests are administered: inflammatory markers (ESR, CRP), uric acid, autoantibodies (ANA, RF, anti-CCP), anti-microbial antibodies (Lyme disease, Chlamydia trachomatis). To specify joint symptoms genetic markers (HLA-B27), joint fluid examination, skin and muscle biopsies are performed

The examination of molecular markers – OA – hsCRP, MMP, HA, COMP, KS, YKL-40, u CTN-II, PINP-N – allow early diagnosis, evaluation of disease activity and severity as well as assessment of the effect of the applied treatment.

In the future validation of new, more reliable laboratory markers for early diagnosis, monitoring and treatment of osteoarthritis is expected.

Keywords: osteoarthritis, laboratory programs, molecular biomarkers.

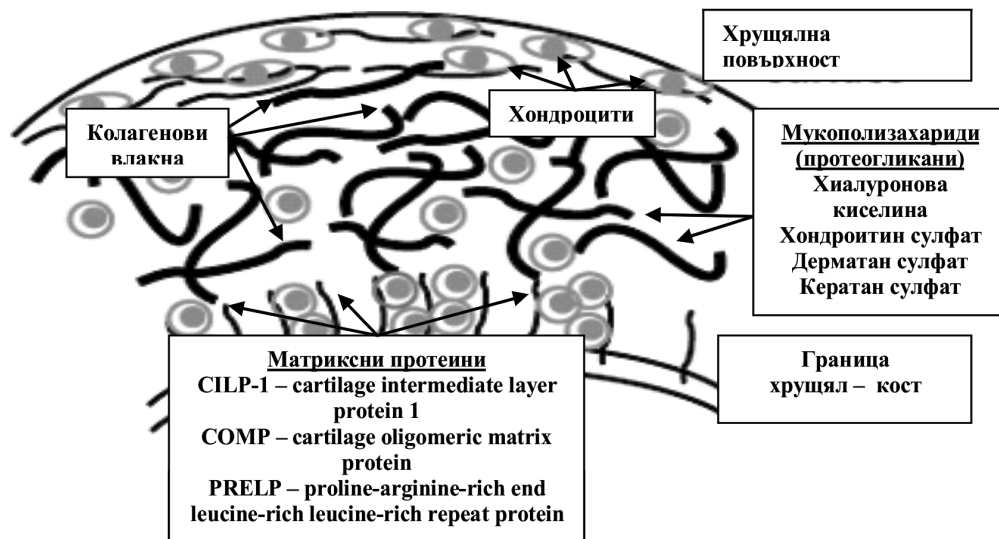
Correspondence: Prof. K. Ikonomova, National Transport Hospital, 108 Maria-Luisa bul., Sofia. E-mail: ikonomovak@yahoo.com

Според епидемиологични данни една трета от лицата над 45 години развиват ставна симптоматика. Всеки един на 10 души страда от остеоартроза (ОА), а над 65 години 80% от популацията е засегната от някоя от формите на заболяването. Честотата на ОА е 2,5 пъти по-висока от болестите на сърцето и 6 пъти повече от раковите заболявания. Най-честите локализации на остеоартрозата са гръбначен стълб (спондилоартроза), тазобедрена става (коксартроза), колянна става (гонартроза) и малките стави на ръцете и ходилата [1].

При ОА най-напред се уврежда хрущялът на ставата. Хрущялният слой изтънява и се разрушава. Заедно с хрущяла се променя и подлежащата костна тъкан. По края на ставата се образуват костни израстъци (остеофити). Те целят да компенсират загубата на хрущял, като увеличават ставната повърхност [3].

Хрущялната тъкан е изградена от здрава колагенова мрежа, в която са разположени хондроцити, протеоглици (хиалуронова киселина, хондроитин сулфат, дерматан сулфат, кератан сулфат) и матриксни протеини (CILP-1 – cartilage intermediate layer protein-1, COMP – cartilage oligomeric matrix protein, PRELP – proline-arginine-rich end leucine-rich leucine-rich repeat protein). Колагенът придава якостта на хрущялната тъкан, докато протеогликаните придават гладкостта на хрущялната повърхност. Така хрущялът играе роля на амортизатор и осигурява плавното движение на костите една към друга [2].

Върху хондроцитите са разположени механорецептори (SAC – stretch activated ion channels, рецептор за хиалуронова киселина – CD44, Annexin V – рецептор за колаген тип 2, интегрини), които улавят и превръщат механичните стимули в биохимични. Рецепторите взаимодействат с вътреклетъчни сигнални молекули (MAPK, NFκB) и превръщат механичния сигнал в биохимичен отговор. Включват се както катаболни, така и анаболни процеси – синтеза на матриксни протеини (колаген тип 2 и протеоглици), протеази, протеазни инхибитори, транскрипционни фактори, възпалителни цитокини и растежни фактори. Балансът между анаболните и катобалните процеси е силно зависим от типа натоварване върху хрущяла [10].



Фигура 1. Структура на хрущяла

При прогресираща ОА е увеличена синтезата на матриксни металопро-теинази (MMP), азотен окис и простагландин E2. Наблюдава се разграждане на протеогликани и колаген и засилена апоптоза на хондроцитите. Намален е синтезът на колаген и хиалуронова киселина. Спада водното съдържание на хрущяла, водещо до намалената му еластичност.

При напреднала остеоартроза се наблюдават и отклонения в костната структура. Увеличена е както остеобластната, така и остеокластна активност. Установено е увеличение на трансформиращия растежен фактор бета (TGF – β), костния матриксен протеин (BMP), инсулиноподобния растежен фактор (IGF). Стига се до образуване на остеофити и субхондрална склероза [14].

В патогенезата на ОА участват множество фактори – възраст, генетични и метаболитни фактори, анатомични отклонения, възпаление, хронична имунна активация – Фигура 2. Комбинирането им води до биофизични и биохимични промени в хрущяла и последващото му разрушаване [12].

Диагнозата ОА се основава на клиничната картина, рентгеновото изследване и лабораторните резултати на пациента.

Лабораторната диагноза цели:

- да се открият маркери за ОА, които се позитивират преди рентгеновите промени
- да се идентифицират рисковите фактори за възникване на ОА
- да се проследят маркерите за активност и прогресирането на заболяването
- да се проследи ефектът от лечението на ОА.



Фигура 2. Патогенетични фактори при остеоартроза

Генетичното предразположение влияе върху чувствителността към възникване на ОА, възрастта за поява на заболяването, локализацията в определени стави, бързата или бавната прогресия на процеса, както и отговорът на пациента към терапията [8, 11].

Фамилната обремененост е описана още през 40-те години на 20-и век в изследвания за разпространението на хеберденовите възли. Популационни проучвания описват мутации за гените на: FRZB (Frizzle related protein 3) – при жени в Англия и Испания и гените за ASPN (Asporin) – при жени в Япония, но не в Европа. При ОА са описани мутации, свързани с дефекти в хрущяла: мутации в колаген тип 2 – COL2A, мутации в COMP (collagen oligomeric matrix protein). Установени са и мутации, свързани с дефекти в във вродените фактори на възпалението: свръхпродукция на TNF alpha, IL-10, CRP, IL-1 beta [9].

Цитокините участват във взаимодействието клетка – клетка и регулират интензитета и продължителността на междуклетъчните взаимодействия. Цитокините и растежните фактори, свързани с ОА, могат да се освобождават от различни клетъчни типове – хондроцити, синовиални клетки, остеоцити. Цитокините активно участват в развитието и прогресията на ОА, а блокадата им е полезна в протекцията на хрущяла. В нормалната става цитокините се повлияват помежду си и образуват отлично балансирана цитокинова мрежа. Дисбалансът в тази мрежа е от важно значение в патогенезата на ОА. Цитокините, включени в патогенезата на остеоартрозата, биват:

Катаболни цитокини – IL-1 β , TNF α , IL-17, IL-18;

Инхибиторни цитокини – IL-4, IL-10, IL-11, IL-13, антагонистът на рецептора за IL-1, γ интерферон;

Анаболни цитокини – инсулиноподобен растежен фактор – 1 (ILGF), TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3, fibroblast growth factor 2 (FGF – 2), FGF – 4, FGF – 8, bone matrix proteins (BMP – 2, 4, 6, 7, 9, 13).

Основният деструктивен ефект върху хрущяла се осъществява от матриксните металопротеинази [13].

Адипокините са биологичноактивни субстанции, синтезирани в мастната тъкан. Те имат отношение към хемостазата, липидния и глюкозен метаболизъм, репродуктивните функции, регулирането на артериалното налягане, инсулиновата чувствителност, формирането на костта и ангиогенезата. Адипокините включват множество проинфламаторни пептиди (IL1, IL-6 и TNF- α). Установено е, че при пациенти със затлъстяване страдат не само натоварените от наднорменото тегло стави, но и ненаоварените – например ставите на ръцете. Адипокините участват в увреждането на ставите като системни фактори и представляват метаболитната връзка между затлъстяване и остеоартроза [2, 3].

При болни с ОА в синовиалната течност и в плазмата се установяват завишени нива на адипокините лептин, адипонектин и резистин. Лептинът модулира функциите на клетките, включени в имунните и възпалителните реакции – моноцити, макрофаги, Т-лимфоцити и дендритни клетки. Продукцията на лептин в хрущяла на болни с ОА е много по-висока в сравнение с тази при здрави. Наскоро се установи, че лептинът може да индуцира синтезата на матриксни металопротеинази (MMP-8 и MMP-13), включени в деструкцията на хрущяла. Противно на защитната роля на адипонектина при затлъстяване и съдови заболявания, при ОА адипонектинът играе проинфламаторна роля и участва в матриксната деструкция. Върху хондроцитите са разположени функционални адипонектинови рецептори, активацията на които води до увеличение продукцията на IL-6, TNF α , MCP1 (monocyte chemotactic protein 1). Резистинът е мощен проинфламаторен цитокин, който увеличава продукцията на IL-1 и TNF α . След травматична ставна увреда нивото на резистина се покачва, причинявайки матриксна деструкция и освобождаване на инфламаторни цитокини от ставния хрущял. Свързаният със затлъстяването захарен диабет също може да е рисков фактор за развитието на ОА поради формирането на токсичните крайни продукти на гликирането (AGEs). Хондроцитите експресират функционални рецептори за AGEs, които стимулират синтезата на медиатори на възпалението – NF κ B, металопротеиназа 13, митоген-активирани протеинкинази. Това води до намаляване еластичността на колагена и ускорява прогресирането на ОА [7, 15].

Стратегия за лабораторни изследвания при пациенти с ОА

Лабораторните тестове са необходими за поставяне на диагноза, мониториране на заболяването и неговата прогресията, както и за проследяване ефекта от лечение.

При лабораторната диагноза на ОА най-напред се провеждат тестове, насочващи за причината на ставната симптоматика. Тъй като много заболявания

се манифестират със ставни болки, за точна диагноза се провеждат множество тестове (Таблица 1).

Тест	Дава информация за:
СУЕ	Показател, потвърждаващ наличие на възпаление
С-реактивен протеин	Показател, потвърждаващ наличие на възпаление
Пикочна киселина	Повишеното ниво на пикочна киселина води до кристализирането и отлагането ѝ в ставите, предизвикващо възпаление и болка. Повишеното ниво потвърждава наличие на подагра.
АНА – антинуклеарни антитела. Автоантитела, насочени срещу клетъчното ядро	Потвърждава наличие на лупус. Откриват се и при полимиозит, склеродермия, синдром на Съогрен, смесена съединителнотъканна болест, ревматоиден артрит. Изследване на АНА подтипове позволяват диференциране на тези аутоимунни заболявания. АНА се отчитат в около 3% от здравата популация.
РФ – ревматоиден фактор. Автоантитела, насочени срещу нормални имуноглобулини (клас IgG)	Потвърждава наличие на ревматоиден артрит. В ранните стадии на РА само 20% от болните за РФ позитивни. 20% от болните с РА никога не позитивират РФ теста.
HLA – B27 – генетичен маркер	Потвърждава диагнозата на анкилозиращ спондилит (Болест на Бехтерев), засягащ ставите на гръбнака и таза и Синдром на Райтер, протичащ с възпаление на уретрата, очите и ставите. HLA – B27 позитивен тест се наблюдава в 10% от здравата популация.
Антитела срещу причинителя на Лаймска болест	Инфекция с Борелия Бургдорфери причинява и ставни увреждания.
Антитела срещу Хламидия трахоматис	Инфекция с Хламидия Трахоматис причинява и ставни увреждания.
Ставна течност	Изследват се левкоцити, бактериални причинители на заболяването, пикочна киселина, цитокини, ензими.
Кожна биопсия	Извършва се при артрити със засягане на кожата – лупус, васкулити, псориазичен артрит.
Мускулна биопсия	Извършва се при артрити със засягане на мускулатурата – полимиозити, васкулити.

Таблица 1. Диагностични и диференциално диагностични лабораторни изследвания при ставна симптоматика

За определяне прогреса на заболяването и ефекта от лечение най-често се използват маркерите, използвани за диагноза на заболяването. Следи се нивото на СУЕ, възпалителни маркери, пикочна киселина, спадане титъра на антителата, ерадикация на инфекциозните причини за артритата. С методите на

терапевтичното лекарствено мониториране се следят нивата на използваните медикаменти – нестероидни противовъзпалителни препарати, имуносупресори. Тъй като лечението на ставните заболявания е съпроводено със странични ефекти, се следят редица биохимични отклонения. Показателите за увредена чернодробна функция включват АСАТ, АЛАТ, ГГТП, алкална фосфатаза, билирубин. Серумният креатинин е маркер за бъбречно засягане, а покаченото ниво на креатинфосфокиназата – за мускулни увреди. Хематокритът, общият брой на тромбоцитите, протромбиновото време дават информация за възникнало кървене вследствие приложената терапия. Следенето на общия брой бели кръвни клетки е важно при лечение с препарати, увреждащи белия кръвен ред.

Молекулните маркери при ОА дават възможност за поставяне на ранна диагноза, оценка активността и тежестта на заболяването, както оценка на ефекта от приложеното лечение [15].

Маркер	Дава информация за:
Високочувствителен CRP	Маркер за активността и тежестта на ОА. По-високите нива на CRP могат да имат прогностична стойност и да предскажат и по-тежкото протичане на ОА в следващите няколко години.
MMP (матриксни металопротеинази)	Участват в хрущялната деструкция. Използват се като маркер за тежестта и прогресирането на ОА. Най-разпространената MMP както в серум, така и в ставна течност е MMP-3. MMP-3 е най-показателна като биомаркер за посттравматична хрущялна деструкция.
Хиалуронова киселина (HA)	Маркер за синовиална пролиферация и хиперактивност. Дава представа и за прогресирането на ОА.
COMP (Cartilage oligomeric matrix protein)	Концентрацията на COMP в синовиалната течност и серум е ранен индикатор за рентгенологична прогресия при проследяване хода на ОА. Счита се, че COMP е най-чувствителният тест за идентифициране на лица с генетично обусловена форма на преждевременна ОА.
KS – серумен кератансулфат	Маркер за активността и прогресирането на ОА
YKL-40 (Chitinase-3-like protein 1 – CHI3L1, познат като YKL-40)	Маркер за активността и прогресирането на ОА
uCTH-II (urinary C-terminal crosslinking telopeptides of collagen types I and II)	Маркер за активността и прогресирането на ОА
PINP-N – propeptides of collagen types I u III	Маркер за активността и прогресирането на ОА

Таблица 2. Молекулни маркери при остеоартроза

Досега няма подходящ биомаркер който да подпомогне диагнозата на заболяването в предрентгеновата фаза [4]. Изследвания с използването на високочувствителен CRP показват, че CRP може да бъде маркер за активността и тежестта на ОА. По-високите нива на CRP могат да предскажат и по-тежкото протичане на ОА в следващите няколко години. Нивото на CRP отразява активността на ОА и корелира с оценката за клинична активност на ОА.

ММП участват в хрущялната деструкция, тяхното ниво или активност са изследвани с цел да се получи информация, отнасяща се до тежестта и прогресирането на ОА. Най-разпространената ММП както в серум така и в ставна течност е ММП-3. ММП-3 е най-показателна като биомаркер за посттравматична хрущялна деструкция [10].

Молекулните маркери, характеризиращи хрущялната синтеза и деструкция, произхождат от различни компоненти на ставата – хрущял, кост, синовия. Серумната хиалуронова киселина (НА) – маркер за синовиална пролиферация и хиперактивност, изглежда, отразява прогресирането на ОА. Други характерни биомаркери са серумният кератинсулфат, COMP (Cartilage oligomeric matrix protein), YKL-40 (Chitinase-3-like protein 1 (CHI3L1), познат като YKL-40), uCTH-II (urinary C-terminal crosslinking telopeptides of collagen types I and II). Концентрацията на COMP в синовиалната течност и серум е ранен индикатор за рентгенологична прогресия при проследяване хода на ОА. Счита се, че COMP е най-чувствителният тест за идентифициране на лица с генетично обусловена форма на преждевременен ОА. Все повече усилия са насочени към диференциране на биомаркери от хрущял, кост и синовия, които да предскажат прогресирането на ОА. За най-информативни се считат: N – propeptides of collagen types I и III, uCTH– I и II, COMP, YKL-40, НА, MMP-1, MMP-3, CRP (5,7).

Мултидисциплинарна група (NIH-funded Biomarkers Network), отговаряща за развитието и валидирането на биомаркери, предложи класификация на биомаркерите според информацията, която те дават за диагнозата, тежестта на заболяването, прогнозата и ефекта от лечението (BIPED – burden of disease, investigative, prognostic, efficacy of intervention and diagnostic). Въпреки нарастващия брой на биомаркери само малка част могат да бъдат считани за надеждни при ОА [6, 8]. От бъдещите проучвания се очаква валидиране на нови лабораторни маркери за ранна диагноза, проследяване и лечение на остеоартрозата.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Икономова К, Тончева А, Димитрова П, Гюрковска В, Ивановска Н. Промени на sRANKL, TLR2 и TNF-а при пациенти с остеоартроза. *Ревматология* 2010; 1: 37–44.
2. Икономова К, Тончева А. Нови насоки в костната биология. София, 2010; 76 стр.
3. Тончева А., М. Ремичкова, К. Икономова, П. Димитрова, Н. Ивановска. Възпалителен отговор при пациенти с активирана и неактивирана остеоартроза. – *Ревматология*, 2008; 16: 38–45.

4. Ahmed U, Anwar A, Savage RS, et al. Biomarkers of early stage osteoarthritis, rheumatoid arthritis and musculoskeletal health. *Sci Rep* 2015;5:9259. 9251–9257.
5. Alcaraz MJ, Megias J, García-Arnandis I, et al. New molecular targets for the treatment of osteoarthritis. *Biochem Pharmacol* 2010;80(1):13–21.
6. Bay-Jensen AC, Reker D, Kjølgaard-Petersen CF, et al. Osteoarthritis year in review 2015: soluble biomarkers and the BIPED criteria. *Osteoarthritis Cartilage*. 2016;24(1):9–20.
7. Francin PJ, Abot A, Guillaume C. Association between adiponectin and cartilage degradation in human osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2014; 22(3):519–26.
8. Gibson DS, Bustard MJ, McGeough CM, et al. Current and future trends in biomarker discovery and development of companion diagnostics for arthritis. *Expert Rev Mol Diagn*. 2015;15(2):219–34.
9. Heard BJ, Rosvold JM, Fritzler MJ, et al. A computational method to differentiate normal individuals, osteoarthritis and rheumatoid arthritis patients using serum biomarkers. *J R Soc Interface*. 2014;11(97).
10. Henrotin Y. Osteoarthritis year 2011 in review: biochemical markers of osteoarthritis: an overview of research and initiatives. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012; 20(3):215–217.
11. Jotanovic Z, Mihelic R, Sestan B, Dembic Z. Role of interleukin-1 inhibitors in osteoarthritis: an evidence-based review. *Drugs Aging* 2012;29(5):343–58.
12. Loeser RF. Age-related changes in the musculoskeletal system and the development of osteoarthritis. *Clin Geriatr Med*. 2010 ;26(3):371–86.
13. Oliviero F, Ramonda R, Punzi L. New horizons in osteoarthritis. *Swiss Med Wkly*. 2010; 17:1–14.
14. Ryd L, Brittberg M, Eriksson K, et al. Pre-osteoarthritis: definition and diagnosis of an elusive clinical entity. *Cartilage* 2015;6(3):156–65.
15. Williams FM. Biomarkers: in combination they may do better. *Arthritis Res Ther* 2009; 11(5):130–139.

ДИАГНОСТИЧНО ЗНАЧЕНИЕ НА ТИТЪРА НА АНТИНУКЛЕАРНИТЕ АНТИТЕЛА

*Марта Балева, Спаска Лесичкова, Невена Гешева,
Нелия Кожухарова, Мариана Димитрова,
Анастасия Михайлова, Елисавета Наумова*

*Клиника по клинична имунология с банка за стволови клетки,
УМБАЛ „Александровска“ – София*

РЕЗЮМЕ

Разгледана е диагностичната стойност на определянето на ANA при различни заболявания. Подчертава се значението на ANA при системния лупус и склеродермията. Обсъждат се проблемите при интерпретацията на високите титри ANA при други автоимунни болести, както и при болести с неавтоимунна генеза и здрави лица. Поставя се въпросът за връзката между определянето на ANA с индиректния имуофлуоресцентен метод върху HEp-2 клетки и новите методи за определяне на различните видове антитела срещу нуклеарни антигени.

Ключови думи: ANA титър, автоимунни болести.

Адрес за кореспонденция: проф. Марта Балева, Клиника по клинична имунология, УМБАЛ „Александровска“, София, бул. „Г. Софийски“ № 1, e-mail: marta.baleva@gmail.com

RESUME

The diagnostic value of the determination of ANA in different diseases has been studied. Authors note the significance of ANA in systemic lupus and scleroderma. They discuss the problems in the interpretation of the high ANA titers in other autoimmune disorders as in diseases without autoimmune pathogenesis and healthy. They show the question about the connection between determination of ANA with indirect immunofluorescent test on HEp-2 cells and new tests for recognition of different antibodies to nuclear antigens.

Keywords: ANA titer, autoimmune diseases.

Correspondence: prof. Marta Baleva, Department of Clinical Immunology, University Hospital Alexandrovska, Sofia, 1. G. Sofiiski str. e-mail: marta.baleva@gmail.com

През 1948 г. *M.M. Hargraves и сътр.* [1] установяват наличието на непознати до този момент клетки в костния мозък на болни от системен лупус еритематозус (SLE), които те наричат LE клетки. Това са зрели полиморфонуклеарни левкоцити, които са фагоцитирали свободен ядрен материал от други левкоцити. Впоследствие това откритие ще доведе до множество проучвания и откриването на антинуклеарните антитела (ANA), както и на огромното разнообразие от техните подвидове. Преди използването на индиректните имуофлуоресцентни техники (ИФ) доказването на LE клетките е

единственият метод за потвърждаване на диагнозата лупус. Преди 60 г. – през 1957 г., два авторски колектива – на E.J. Holborow и сътр. [2], описват „A serum factor in LE sera with affinity for tissue nuclei“, като използват IIF метод върху материал от плъши черен дроб, а G.J. Friou – имуофлуоресцентен метод с използването на телешки тимус [3], като през следващата година наричат намереното антитяло lupus globulin factor [4, 5]. През 1975 г. като подложка започва използването на туморната линия HEp-2 [6], изолирана през 1955 г. от A.E. Moore и сътр. [7]. HEp-2 клетките на тази линия имат стотици, а може би и хиляди потенциални автоантигени [8] и са идеалният субстрат за определяне на ANA. Използването на HEp-2, от една страна, доведе до нов поглед върху диагнозата на автоимунните ревматологични заболявания, но от друга – през следващите десетилетия постави много нови въпроси: 1. Първоначално титърът, определен за граница между положителните и отрицателните резултати, бе 1:40, в момента най-често е 1:80. Може ли тази стойност да е по-висока? 2. Каква е предиктивната положителна стойност на теста? 3. Каква е предиктивната негативна стойност на теста? 4. Каква е връзката между резултатите от този тест и определянето на антителата срещу различни нуклеарни антигени? 5. Каква е сравнимостта на IIF с новите методи, като мултиплексния анализ и автоматизираните тестове за детекция на ANA?

Цел на настоящото съобщение е да се обсъди диагностичната стойност на титър 1:160 при определяне на ANA с HEp-2 IIF. Повод за това са многобройните запитвания от пациенти и лекари дали при ANA титър 1:160 пациентът има автоимунна болест и дали да се приложи лечение.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

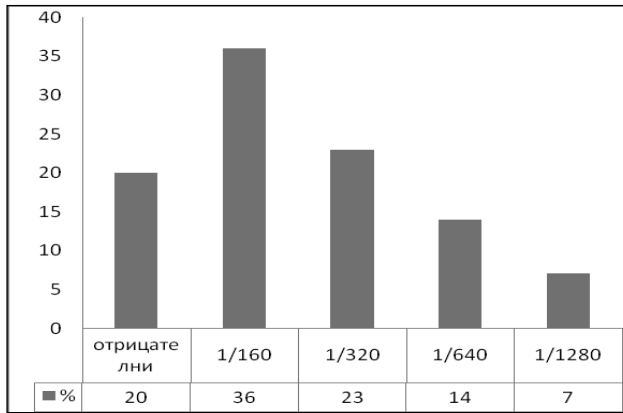
Изследвани са 283 пациенти, преминали през Клиниката по клинична имунология за периода 01.01.2017–31.03.2017 г. Това е разнородна група болни, насочени от различни специалисти с различни диагнози – системен лупус еритематозус (SLE), чести инфекции, вкл. първични имунни дефицити (ПИД), ювенилен ревматоиден артрит (JRA), гломерулонефрити (GN), цистит и хронична бъбречна недостатъчност (ХБН), дерматози (пемфигус, ангионевротичен оток, erythema nodosum, контактен дерматит), други автоимунни болести – ревматоиден артрит (RA), синдром на Raynaud, склеродермия (SD), дерматомиозит/полимиозит (DM/PM), васкулит на Henoch – Schonlein (H-S), Wegener granulomatosis (WG) и други васкулити, тиреоидит на Hashimoto, автоимунен хепатит, болест на Crohn, иридоциклит, тромбцитопения, антифосфолипиден синдром (APS), други заболявания.

За определянето на ANA използвахме ANA Hep-2 kit (BioSystems).

РЕЗУЛТАТИ

На Фигура 1 е представено процентното разпределение на титъра на ANA при изследваните 283 пациенти. Видно е, че отрицателни за ANA са 56/283

(20%), с титър 1:160 са 103/283 (36%), 1:320 – 64/283 (23%), 1:640 – 39/283 (14%) и 1:1280 – 21/283 (7%).

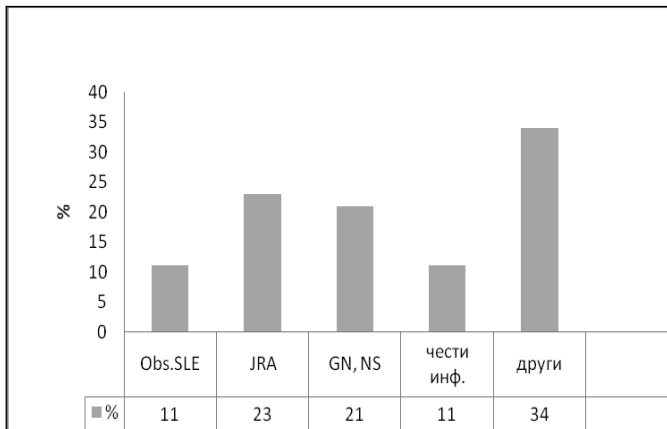


Фигура 1. ANA титър при изследваните пациенти

Ще разгледаме пациентите по групи:

1. Отрицателни за ANA

Разпределението на пациентите по диагнози е представено на Фигура 2. В тази група попадат следните болни: предполагаем SLE – 11%, JRA – 23%, бъбречни заболявания – гломерулонефрит (GN) и нефротичен синдром (NS) – 21%, чести инфекции – (11%), и други болести (34%).

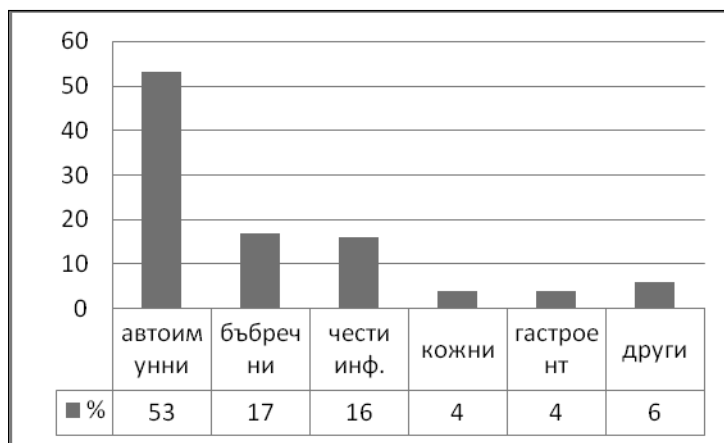


Фигура 2. Разпределение на отрицателните за ANA пациенти по диагнози в проценти

2. ANA 1:160

В тази група влизат 103/ 283 болни (36%). Разпределението на болните по диагнози в тази група е представено на Фигура 3. Тук влизат болни със следните диагнози: автоимунни болести – 53%; GN, цистит и ХБН – 17%; чести инфек-

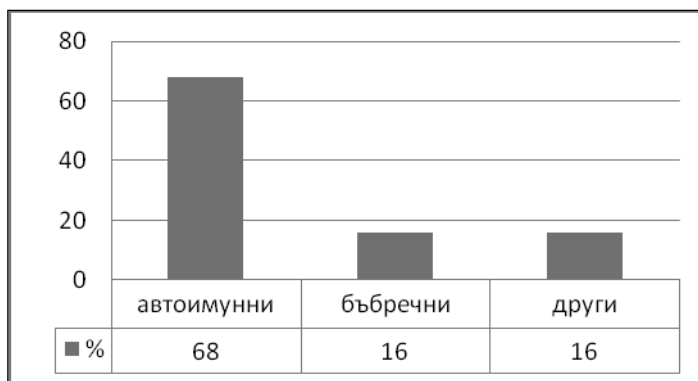
ции, вкл. при 3 болни с ПИД – 16%; гастроентерологични заболявания – 4%; дерматози – 4%, други – 6%.



Фигура 3. Разпределение на пациентите с ANA титър 1:160 по диагнози в проценти

3. ANA 1:320

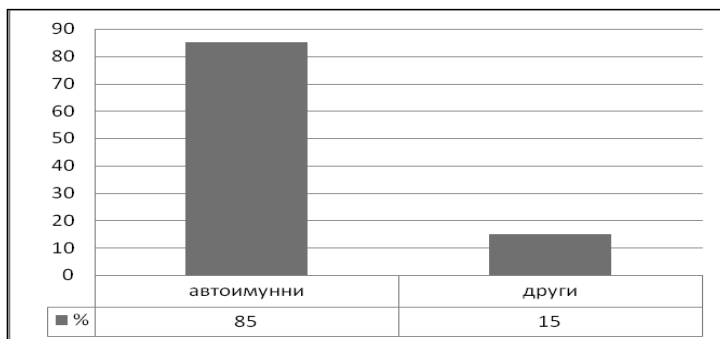
Групата включва 64/283 болни (23%). Разпределението по диагнози е представено на Фигура 4. В тази група болните с автоимунни болести са общо 44 (68%); тези с бъбречни болести – 16%; с други болести – 16%.



Фигура 4. Разпределение на пациентите с ANA титър 1:320 по диагнози в проценти

4. ANA 1:640

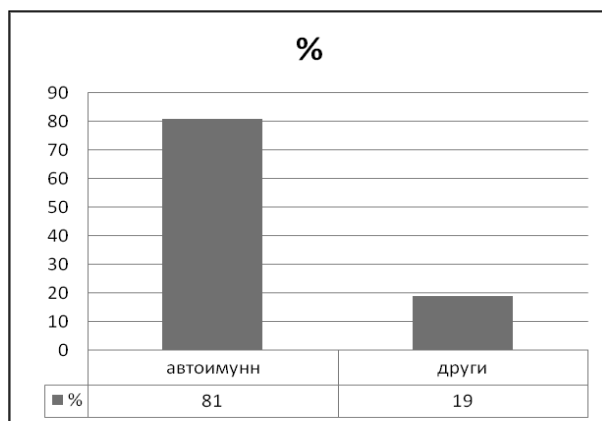
Групата е съставена от 39/283 болни (14%) – 33 с автоимунни болести (85%), 22 от които SLE и 3 – кожен лупус, ревматоиден артрит – 1, JRA – 4, склеродермия – 1, автоимунна тромбоцитопения – 1, васкулит – 1; 6 с други болести (15%). Разпределението по диагнози е представено на Фигура 5.



Фигура 5. Разпределение на пациентите с ANA титър 1:640 по диагнози в проценти

5. ANA 1:1280

В тази група попадат 21/283 пациенти (7%), от които 17 са с автоимунни болести (81%) – 12 лупус, 3 с ювенилен ревматоиден артрит, 1 с полимиозит, 1 с идиопатична тромбоцитопения. Четири пациенти са с други болести – атопичен дерматит, цирроза, гломерулонефрит, хронична бъбречна недостатъчност. Разпределението по диагнози е представено на Фигура 6.



Фигура 6. Разпределение на пациентите с ANA титър 1:1280 по диагнози в проценти

ОБСЪЖДАНЕ

ANA като диагностичен критерий

Определянето на ANA е един от най-често използваните тестове в практиката на клиничната имунология. **От една страна, те са част от диагностичните критерии на някои от автоимунните ревматични болести, но от друга – не трябва да забравяме, че са само един компонент на сложната клинично-лабораторна характеристика на тези заболявания.** На Таблица 1 са представени заболяванията, при които може да се установят положителни ANA в серума [9].

Съществуват много препоръки за извършване и стандартизиране на този тест, особено след прилагането на IIF върху субстрат Hep-2.

Таблица 1. Заболявания с положителни ANA

Заболяване	% (+) ANA
Заболявания, при които определянето на ANA е много важно	
Системен лупус еритематозус	95–100%
Склеродермия	60–80%
Заболявания, при които определянето на ANA е полезно	
Синдром на Sjogren	40–70%
Дерматомиозит/полимиозит	30–80%
Заболявания, при които определянето на ANA е полезно за мониториране или прогноза	
Ювенилен олигоартрит с увеит	20–50%
Синдром на Raynaud	20–60%
Състояния, при които позитивния ANA тест е важна част от диагностичните критерии	
Лекарствен лупус	~ 100%
Автоимунен хепатит	~ 100%
Смесена съединително-тъканна болест	~ 100%
Заболявания, при които определянето на ANA не е важно за диагнозата	
Ревматоиден артрит	30–50%
Множествена склероза	25%
Идиопатична тромбоцитопенична пурпура	10–30%
Тиреоидни заболявания	30–50%
Дискоиден лупус	5–25%
Инфекциозни болести	Различен%
Злокачествени заболявания	Различен%
Болни със силиконови гръдни импланти	15–25%
Фибромиалгия	15–25%
Роднини на болни от СЛЕ или склеродермия	5–25%

Автоимунни болести и ANA

От таблицата е видно че при 2 заболявания – SLE и SD, определянето на ANA е много важно и е критерий за поставяне на диагнозата. Този критерий е заложен още от 1982 г. за диагнозата на SLE [10], и от 1980 г. – за SD [11]. Чувствителността и специфичността на теста са съответно 96% и 96% за SLE [10] и 97% и 98% за SD [11]. През 2013 г. съвместната инициатива на American College of Rheumatology (ACR) и European League against Rheumatism (EULAR) потвърждава значението на изследването на антицентромерните антитела, или на „centromere-pattern on ANA testing“, или на антитопоизомераза I антитела

(анти-Scl-70) или на анти-RNA полимераза III антителата, определени по местните лабораторни стандарти за диагнозата на склеродермията [12]. Определянето на ANA според класификационните критерии на Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC) от 2012 г. показва чувствителност на този тест – 33,6 % и специфичност 96,8% [13].

В нашето изследване 72/283 болни (25%) постъпват за изследване с диагноза лупус, като при 6 тази диагноза се предполага, при 10 – се касае за кожен лупус, а при останалите 56 диагнозата SLE е дефинитивна. При 6-те болни сигурни клинични критерии за лупус не са открити ANA (8,3%). С ниски и средно високи титри на ANA – 1:160 и 1:320 са съответно 15 и 14 болни (вкл. 7 болни с кожен лупус са с титър 1:320) – 40,3%. Високи титри – 1:640 – имат 25 болни (вкл. 3 с кожен лупус) и 1:1280 – 12 болни, т.е. 37 от 72 изследвани лупусноболни (51,4%) са с високи титри на ANA. Ако съберем всички положителни резултати с титри 1:160 – 1:1280, установяваме, че 66/72 болни (91,4%) имат положителни ANA в различен титър. Това потвърждава становището, че определянето на ANA е важно за поставяне на диагнозата лупус [10, 13].

Със SD в периода на настоящето наблюдение бяха изследвани общо 4 болни – 1 отрицателен за ANA и по 1 с титри 1:160, 1:320 и 1:640, поради което не можем да дадем реална оценка за значението на ANA в този случай. Същото се отнася и за болните с дермато/полимиозит – общо 4 – разпределени в групите 1:160, 1:320 и 1:1280, както и за пациента със синдром на Sjogren с титър на ANA 1:320, тези със синдром на Raynaud – 2 с титър на ANA 1:160. В предишна наша публикация [14] изследвахме ANA при 2 гупи болни: I – болни със синдром на Raynaud, и II – със синдром на Raynaud като част от клиничната симптоматика на SLE или SD. В първата група ANA бяха отрицателни в 70% от случаите, докато във втората 80% от болните имаха средно високи титри на антителата.

Всички 8 болни с ревматоиден артрит имаха положителни ANA в по-ниски титри – 4 с титри 1:160 и 4 – 1:320. Както е показано на Таблица 1 определянето на ANA при болни с тази болест не е от съществено значение за поставяне на диагнозата, но те могат да се позитивират в ниски титри при 30–50% от болните. При болни с RA или остеоартроза изследването на ANA не помага за потвърждаване на диагнозата и в този смисъл не се препоръчва [6]. Не се препоръчва и използването на този тест за оценка на умората, болката в гърба или друга мускулоскелетна болка, с изключение на случаите, когато са налице симптоми за заболяване на съединителната тъкан.

Интерес представляват пациентите с ювенилен ревматоиден артрит. Това са 44 пациенти, разпределени както следва: 13 – отрицателни за ANA (30%), 24 с ниски и средно високи титри на ANA (54%), и 7 (16%) с високи титри 1:640 и 1:1280. Тълкуването на резултатите от определянето на ANA при деца понякога е много трудно, тъй като при здрави деца, както и при такива с неавтоимунни болести те може да са положителни [15, 16]. Така например P.M.G. Deane и сътр. [16] при изследването на 500 деца, постъпили в детска

клиника, установяват положителни ANA при 113, като при 31 от тях (27%) не се установяват данни за автоимунна болест при постъпването и след 37 месечно наблюдение. Основните оплаквания на болните са били мускулоскелетни болки и хипермобилност, а средният титър на ANA – 1:160. При двадесет и пет от пациентите в тази група симптомите отзвучават в края на периода на наблюдение, при 5 – значително се подобряват, а при 1 се оформя автоимунен хепатит. Според авторите определянето на ANA при деца с мускулоскелетни или дерматологични симптоми при липса на данни за автоимунни проблеми не допринася за поставянето на нова диагноза и оскъпява изследването. При липса на автоимунни констелации прогнозата на деца с положителни ANA е обикновено добра.

Проучването на J.L. McGhee и сътр. [15] показва, че при болни с ювенилен ревматоиден артрит ANA титърът варира от 1:80 до 1:640, значително по-нисък е от този при деца със SLE и няма диагностична стойност. Според авторите титърът на ANA $\geq 1:1080$ е много суспектен за SLE, докато титър $\leq 1:320$, особено при деца на 13 години, изключва тази диагноза. ANA титърът не може да разграничи децата с JRA от тези с мускулоскелетни болести [15]. 84% от изследваните от нас пациенти с ювенилен ревматоиден артрит имат титър на антителата $\leq 1:320$ и само 16% – в титър 1:640 и 1:1280.

Според данните на P.N. Malleson и сътр. [17] ANA титър 1:160 или повече е толкова чест при деца без данни за ревматично заболяване, че има малка или никаква диагностична стойност. Тринадесет години по-късно отново P.N. Malleson и сътр. [18] поставят следните въпроси: Ако тестът за ANA е положителен, дали това дете с обрив и висока температура има лупус, или дали дете с подуто коляно има ювенилен идиопатичен артрит, или дали това дете с ювенилен идиопатичен артрит ще направи увеит? Авторите достигат до извода че ANA тестът не може задоволително да отговори на тези въпроси. Според този авторски колектив използването на ANA се ограничава до диагнозата на SLE, смесената-съединително-тъканна болест (MCTD) и подобни системни заболявания, а титрите $< 1:640$ в повечето случаи могат да се игнорират, освен ако детето е системно болно и има данни за SLE или друго подобно заболяване. Както е видно от Таблица 1 ANA се позитивират в 20–50% от болните с JRA и вероятно определянето им е полезно за мониториране или прогноза на болестта. Според A. Kavanaugh и сътр. [9] ANA тестът не е полезен за поставяне на диагнозата на JRA, но при позитивен резултат може да се предполага увеит.

С различни форми на васкулит бяха общо 11 души: 2 – отрицателни за ANA (1 с H-S, 1 без уточнена етиология); 5 с титър 1:160 (2 с WG, 3 без уточнена етиология); 4 – с титър 1:320 (2 – с H-S, 1-Churg Strauss, 1 без уточнена етиология); 1 – с титър 1:640 без уточнена етиология. ANA рядко се позитивират при системните васкулити. При тях по-чести и с диагностична стойност са ANCA. Известно е, че в част от случаите има припокриване на резултатите между ANA и ANCA, особено в случаите на р ANCA [19].

При останалите автоимунни болести резултатите от определянето на ANA

са както следва: отрицателни за ANA: 1 болен с болестта на Крон; ANA 1:160 – тиреоидит на Hashimoto – 3, APS – 1, автоимунна анемия и тромбоцитопения – 4, автоимунен хепатит – 1; ANA 1:320 – захарен диабет тип 1 – 1, тиреоидит на Hashimoto – 1, автоимунна тромбоцитопения – 1, агранулоцитоза – 1, хепатит – 2; ANA 1:640 – 1 с автоимунна тромбоцитопения; ANA 1:1280 – 1 с идиопатична тромбоцитопения.

При всяко едно от тези заболявания в литературата са описвани ANA в различни титри. Така напр. 35% от болните с автоимунни заболявания на щитовидната жлеза имат различни позитивни ANA [20]. Процентът на откриваемост на ANA при заболявания на черния дроб е показан на Таблица 2 [21], но някои автори не препоръчват изследването на ANA при болни с RA, първична билиарна цироза, автоимунна тромбоцитопения и автоимунен тиреоидит [22].

Таблица 2. ANA при болни със заболявания на черния дроб

Болест	ANA
Хр. активен хепатит	60%
Хр. персистиращ хепатит	15–30%
Остър вирусен хепатит	20%
Първична билиарна цироза	5%
Автоимунен хепатит	95%

Други заболявания

Изследвахме общо 23 болни с различни инфекции. При 6 от тях ANA бяха отрицателни, 16 болни (3 от тях с първични имунни дефицити) бяха с титър 1:160, а 1 с генитален херпес – ANA титърът бе 1:320. Както се вижда от Таблица 1 ANA се позитивират в различен процент при болни с различни инфекции.

Изследвахме ANA при 44 болни с бъбречни заболявания. При 12 от тях не установихме антитела, при 18 – положителни в титър 1:160, при 10 – 1:320, при 3 – 1:640, при 1 – 1:1280, т.е. с много високи титри 1:640 и 1:1280 бяха 4/44 пациенти (9%). При последните 4 пациенти с оглед високите титри на ANA е наложително по-нататъшно проследяване на антителата, изследване на тяхната специфичност и допълнителни изследвания с оглед изключването или потвърждаването на лупусна нефропатия.

Дотук не споменахме отрицателните за ANA пациенти с хипербилирубинемия, холангиохепатит, еритема нодозум, епилепсия, миокардит, перикардит, лимфоцитопения, контактен дерматит, субилеус, периорален дерматит, при които този резултат е очакван, както е очакван и резултатът 1:160 при болните с гастроентерологични заболявания (токсичен хепатит, стеатоза), дерматози (пемфигус, ангионевротичен оток, еритема нодозум), който най-вероятно няма съществена диагностична стойност.

Отделно разглеждаме болните с титър 1:320 (ангионевротичен оток – 1,

иридоциклит – 7, хронична уртикария – 1); с висок титър – 1:640 (3 – с алоpecia, пемфигус, афтоза) и 1:1280 (2 – атопичен дерматит, цироза). Наличието на антитела в тези случаи не винаги може да се свърже с автоимунен процес. От друга страна, според мнението и на други автори [6] позитивният ANA тест може да се установи при широк кръг от заболявания, различни от колагенозите, без да има диагностична или прогностична стойност.

ANA титър при здрави и референтни стойности на ANA

Установяването на ANA при здрави предполага, че те са важен компонент на нормалния имунен отговор [23]. Процентът на положителните резултати при здрави е в зависимост от пола и възрастта: по-възрастните, особено жени след 65-год. възраст, по-често позитивират ANA [24, 25]. Със субстрат HEp-2 от 20% [9] до 31,7% [24], от здравите имат положителни ANA в титър 1:40, 13,3% – в титър 1:80, 5% – в титър 1:160 [9, 24], и 9,6% – в титър \geq 1:160 [26], 3% в титър \geq 1:320 [9], 17,8% – в титър 1:640 [27], 7,6% – в титър 1:1280 [27], 2,5% – в титър 1:2560 [27], 5,9% – в титър 1:5120 [27]. Проследяването на 40 здрави с положителни ANA в продължение на 3,5 – 5 години показва, че никой от тях не се разболява от автоимунна болест, въпреки че 29 от тях все още имат високи титри на антителата [27].

Чувствителност и специфичност на ANA

Различните автори дават различни данни за чувствителност и специфичност на ANA при някои заболявания (Таблица 3).

Таблица 3. Чувствителност и специфичност на ANA (по 6, 27, 28)

Болест	Специфичност	Чувствителност
SLE	93%	57%
Sjogren	48%	52%
Scleroderma	85%	54%
PM/DM	61%	63%
Raynaud	64%	41%

ANA титър 1:160

Изследването на ANA върху клетъчни субстрати се счита за златен стандарт при диагнозата на системните автоимунни ревматологични заболявания [8, 29, 30]. В много лаборатории титърът 1:160 се приема за сигнификантен при болни със заболявания на съединителната тъкан [6]. Съобразявайки се с данните от литературата, много лекари считат че високите титри на ANA са по-важни за диагнозата от ниските титри. В същото време има изобилие от данни, показващи, че след разреждане 1:80 или 1:160 титърът на ANA има малко значение за диагнозата или активността на болестта [29]. Този тест може да бъде компрометиран поради липсата на универсална стандартизация, както

и поради „фалшиво положителни резултати“, което от своя страна води до становището, споделяно от много лекари, че е неподходящ като референтен метод и дори може да доведе до неправилна диагноза, излишни тревоги на болния, допълнителни консултации и разходи за нови изследвания [29]. Проблем са и „фалшиво негативните резултати“, които ще доведат до неправилна диагноза и до уверението, че болният няма заболяване, въпреки че в действителност има автоимунна ревматична болест [29].

Като разглеждаме резултатите от фигури 1–6, както и данните ANA при здрави и като се има предвид ниската честота на SLE (40–50 болни на 100 000 население) и другите колагенози в общата популация, не всички хора с положителни антитела имат системна автоимунна ревматична болест. При използване на по-високите титри ($\geq 1:640$) се достига до по-висока специфичност на диагнозата, но се намалява диагностичната чувствителност [9]. От друга страна, тъй като титърът 1:160 не е достатъчно чувствителен, той не може да изключи SLE [24]. Според много автори титърът 1:160 представлява по-скоро скрининг, отколкото диагностичен тест [6]. Други поставят въпроса: Кое е по-лошо: фалшиво положителен или фалшиво отрицателен ANA тест? [29], както и „Дали ревматолозите предпочитат да имат ANA тест с висока чувствителност и ниска специфичност за системните автоимунни болести, или с висока специфичност и ниска чувствителност?“ [29].

В много случаи, както вероятно е и в нашето проучване, пациентите са изпратени за изследване на ANA въпреки ниската вероятност за системна автоимунна болест, а често тестът е назначаван безразборно. При такава висока степен на позитивност в общата популация тестът за ANA може да бъде проблемен, когато не се прилага правилно, и резултатът ще бъде фалшиво положителен. Неправилното интерпретиране на положителния резултат, особено при по-ниските титри, води до излишни допълнителни изследвания, обръкване на пациента, неправилна диагноза и лечение [27, 31]. Представени са данни, според които диагнозата SLE, поставена главно на наличието на високи ANA и последващо 3-годишно лечение с кортикостероиди, в края на което не се установяват клинични данни за SLE и ANA [31]. Не трябва да забравяме, че безразборната употреба на кортикостероиди в подобни случаи води до такива усложнения като: остеопороза, катаракта, диабет, инфекции, остеонекроза, хипертония, както и до ненужни допълнителни разходи за диагноза и лечение [32].

Позитивна (PPV) и негативна (NPV) предиктивна диагностична стойност на ANA

Позитивната предиктивна стойност на ANA титъра е обсъдена от много автори. Така напр. А.М. Abeles и М. Abeles [33] представят данните на пациенти с различни диагнози, поставени от общопрактикуващи лекари, интернисти, офталмолози, ендокринолози, ортопеди и др. специалисти по следния начин:

Титър	PPV (ревм. болни)	PPV + ANA (SLE)
≥ 1:40	8,8%	2,2%
≥ 1:80	10%	2%
≥ 1:160	11,6%	2,9%
≥ 1:320	18,9%	4%
≥ 1:640	26,9%	6%
≥ 1:1280	38,9%	5,6%
≥ 1:2560	46,2%	N/A
≥ 1:5120	57,1%	N/A
Без титър	0	0

Според Н.А. Mariz и сътр. [27] възможността да се разграничат болните с автоимунни заболявания от здравите е в зависимост от стойностите на cut-off на теста. При разреждане на серума 1:80 ANA-HEp-2 има чувствителност 90,2% и специфичност 87,1% с висока негативна предиктивна стойност (NPV) – 98,1% за заболяване. При разреждане 1:160, което се препоръчва от ANA Subcommittee of the International Union of Immunological Societies Standardization Committee [24], чувствителността е 83,7%, специфичността – 93%, при 1:1280 – чувствителност 65,4% и специфичност 97,9%, NPV 94,6% и 84,9% PPV, а при 1:5120 cutoff – чувствителността е 44,4%, а специфичността – 99,2%, с 90,6% PPV.

Видно е, че с увеличаване на титъра на ANA PPV както за ревматична болест, така и за SLE се увеличава. Титърът 1:160, който според повечето автори е първият позитивен титър, е с ниска PPV. В нашето проучване с този титър са 36% от изследваните болни.

J. Damoiseaux сътр. [34] цитират автори, според които позитивните ANA предшества поставянето на диагнозата SLE с 2–2,5 г, на склеродермията – с 3 г, а на синдрома на Sjogren – 3–7,5 г. Други автори [35] установяват, че този срок е още по-дълъг и достига 10 г.

За преодоляване на проблема с диагностичната стойност на титрите на ANA много автори и работни групи препоръчват: създаването на местен алгоритъм за определянето на тези антитела, обучителни програми на персонала, местно валидиране на платформите, изясняване на значимостта на отделните титри и начини на светене, и то при различните популации и стадии на болестта. Особено важно е разграничаване на данните от амбулаторията и тези в специализирана клиника, оценка на данните от автоматизираните методи, които могат да преобладаят много от недостатъците на мануалните методи [30].

През 2013 г. работна група от няколко организации (IUIS/WHO/AF/CDC)* представя 25 препоръки за стандартизацията на ANA антителата [30], между които необходимостта от определяне на титъра за скрининг на серумите във всяка локална лаборатория, който трябва да бъде по-висок от 95-ия перцентил при здравите. Най-общо според авторите на препоръките титърът 1:160 при използване на HEp-2 или HEp-2000 може да бъде скри-

ниращ за автоимунно ревматологично заболяване. Основен недостатък на метода е необходимостта от квалифициран персонал при отчитането на резултатите, което изисква незабавната нужда от обучителни програми за извършване на теста и неговото интерпретиране [30]. Тестовите, базирани на определена смес от нуклеарни антигени не трябва да се реферират като „ANA test“ или „ANA screen“.

Защо ANA се установява толкова често?

Въпросът защо ANA тестът е толкова често позитивен при хора без данни за автоимунна болест, се дискутира от много автори. Едно от обясненията е нарушеният имунен толеранс. Друго обяснение е, че ANA имат и друга функция, която до този момент не е изяснена.

Функции на ANA и защо се установяват толкова често в клиничната практика:

- Тестовите за ANA определят ниско авидните антитела [36]. Тъй като много нуклеарни антигени са заредени молекули, те могат да улесняват кръстосаното свързване на нормалните антитела, без да забележат аберантната експресия [37]. Това е валидно за естествените антитела от клас IgM, които имат много функции и очистват организма от вирусни антигени и остатъци от разрушени клетки.
- Друго обяснение за високия процент позитивни антитела при здрави е наличието на значителни имунорегулаторни нарушения, както и наличието на голям брой хора в рискова ситуация, при които при поява на тригериращ фактор ще се развие заболяване. Съществуват редица генетични полиморфизми, които предразполагат към развитието на автоимунно ревматично заболяване [38]. Тези полиморфизми най-вероятно са резултат на еволюционната селекция за защита на организма и предизвикват имунен отговор в различни популации имунни клетки. Когато са в ограничено количество или в подходящи комбинации, тези полиморфизми могат да доведат до серологични отклонения при липса на клинични симптоми. Все пак специфичността на ANA при здравите е неясна, което прави много трудно изясняването на механизмите на тези отговори.
- Докато много от серологично позитивните хора никога не заболяват от автоимунна болест, други са в пре-автоимунен стадий, а позитивните ANA означават предстояща болест [35, 36], но разграничаването в кои случаи антителата са „нормални“ и в кои – признак за болестно състояние е много трудно.
- При туберкулоза, малария, лепра са установени позитивни ANA, чиято специфичност не е ясна, но изглежда, е различна от тази при известите автоимунни болести [39, 40]
- Индуцирането на ANA при вирусни инфекции, напр. с вируса на

Epstein-Barr, може да се наблюдава при болни, при които има риск от лупусна болест, тъй като в тези случаи съществуващите имунологични отклонения могат да промотират автореактивност към вирусния антиген. В тези случаи антителата, индуцирани по време на вирусната инфекция, могат да се отнесат към класическите ANA [41]. Заболяването от лупус в тези случаи е вторично с експресия на кръстосано реагиращи антитела и вероятна автоимунна реакция. Това означава, че антителата не са една популация по отношение на свойствата си и могат да се характеризират чрез своята експресия в здравата популация и при болните (патологични антитела).

- Много от антителата се свързват с различни заболявания, но механизъмът, по който те увреждат отделните органи, засега е неясен [36]. Таргетните антигени на ANA са висококонсервативни, широко разпространени и трябва да бъдат защитени от автоантителните взаимодействия. Патологичният характер на тези антитела се доказва чрез имунизация или трансфер на серум или моноклонални антитела в животински модели [36].
- ANA могат да бъдат и протективни, което ще обясни несъответствието между серологията и клиничната симптоматика, което предполага, че някои серологично позитивни, но клинично негативни болни могат да бъдат евентуално протектирани, напр. от засягане на бъбрека.
- D.S. Pisetsky [36] предлага следната класификация на ANA: **не-патологични** (бенигнени, индиферентни, безвредни, намират се при голям брой хора и не са свързани с клинично проявено заболяване); **патологични** (установяват се почти изключително при автоимунна болест или в пре-автоимунен стадий, в който не са проявени клинични симптоми; патологичните антитела могат да бъдат **патогенни**, но може и да не са патогенни); **патогенни** (могат да предизвикат болестни симптоми по различни механизми, като отлагане на имунни комплекси, цитокинова стимулация, или рецепторно свързване); **нефритогенни** (ANA, които предизвикват нефрит); **интерфероногенни** (ANA, които индуцират цитокинова продукция по пътя на стимулация на интерферон от PDCs от имунни комплекси); **протективни** – предотвратяват появата на заболяване чрез инхибиране на имунологичната активност на нуклеарните антигени, промотират тяхното отстраняване по не-възпалителен начин или чрез блокиране на образуването на патогенни имунни комплекси. Такива са антителата при вирусна инфекция.

Според тази класификационна схема серологията на ревматичните заболявания е много по-сложна, отколкото се считаше досега, като клиничната хетерогенност на болестта е много по-хетерогенна от серологичната. Ако приемем възможността някои ANA да са протективни, тази схема предлага нова стратегия за оценка на взаимоотношенията между серология и болест и

предполага установяването на нов клас биологични агенти, с които може да бъде повлияна автореактивността.

В заключение: Първоначално данните от изследването на ANA са се използвали и интерпретирани от ревматолози и клинични имунолози. Тогава, когато е установено, че ANA се позитивират при много други заболявания, започва използването им и от други специалисти – лични лекари, дерматолози, нефролози, гастроентеролози, онколози, хематолози, акушер-гинеколози, кардиолози. Тази промяна в първоначалната трактовка на метода има огромни последствия върху диагностичната стойност на теста в постаналитичния стадий, тъй като IIF ANA като скрининг с лимитирана специфичност е в значителна степен повлиян, когато преданалитичната вероятност за дадена болест е намалена [42].

Независимо от напредъка на познанията ни относно ANA и тяхната диагностична стойност, остават неизяснени редица въпроси в областта на терминологията и номенклатурата, с които се обозначават тези антитела, стандартизацията на методите за тяхното определяне, на която да стъпят и диагностичните критерии при различните заболявания, деликатните взаимоотношения между лабораторния и клиничен персонал при интерпретация на получените резултати и създаването на диагностични алгоритми, както и икономическа обосновка на извършването на определени тестове. Не трябва да се игнорира и фактът, че тестът все повече се търси и броят на изследванията расте през последните години, което налага използването на по-бързи и за предпочитане автоматизирани методи за определянето на тези антитела. Не на последно място трябва да се обсъди и дигитализацията на IIF методите за определяне на ANA, с което се очаква да се намалят вариациите в интерпретацията както на вида флуоресценция, така и на оценката за интензивността на флуоресценцията [43]. Новите моменти в изследването на ANA може би ще наложат нови алгоритми и критерии за диагнозата на автоимунните болести, нови обучителни програми, нови критерии за качествен контрол и реимбурсация. Едно интересно направление е мултиплексният анализ, при който обаче остават засега нерешени следните проблеми: доказването на редки антитела, количествена оценка на резултата, както и неговата интерпретация. В същото време има съобщения, че с тези тестове ANA са установяват години преди появата на клиничните симптоми и при това – значително по-рано от използваните досега IIF върху HEp-2 [44].

IIF върху HEp-2 е тест с половинвековна история. Той има важна роля в диагнозата на автоимунните ревматични заболявания. Чрез него се установяват редица антитела към ядрени и нуклеарни антигени, но той е труден за изпълнение и изискващ продължително време поради неколкочратните разреждания, а отчитането на флуоресценцията е визуално [45]. Изследването е субективно и понякога трудно се поддава на интерпретация [46], а многообразието на микрокопи, сила на светлината, използваното увеличение, както и използването на HEp-2 линията обуславят многото възможности за вариация [47]. Не на последно

място ограничение за използването на този тест е загубата на специфичност, тъй като се позитивира при много автоимунни болести, инфекции, тумори, както и при здрави [30, 48, 49].

В същото време тестът трудно се стандартизира, при отчитането му има възможност за субективизъм и свързаните с това „фалшиво положителни“ и „фалшиво отрицателни“ резултати. Не е ясно ще може ли този тест да бъде и в бъдеще „златен стандарт“? До голяма степен това ще зависи от развитието на новите дигитални технологии за определяне на антителата [42], новите тенденции за консолидация и унификация на лабораторните изследвания, както и от локалното законодателство за реимбурсация на медицинските дейности.

*International Union of Immunologic Societies/World Health Organization/Arthritis Foundation/Centers for Disease Control and Prevention (IUIS/WHO/AF/CDC) – <http://www.autoab.org>

ЛИТЕРАТУРА:

1. Hargraves MM, Richmond H, Morton R: Presentation of two bone marrow elements: the „tart“ cell and the „LE“ cell. *Proceedings of the Mayo Clinic*. 1948; 23: 25–28.
2. Holborow EJ, Weir MM, Johnson GD. A serum factor in LE sera with affinity for tissue nuclei. *Br Med J* 1957; 2: 732–734.
3. Friou CJ. Clinical application of lupus serum nucleoprotein reaction using fluorescent antibody technique. *J Clin Invest* 1957; 36: 890–897.
4. Friou CJ, Finch SC, KD Detre KD. Interaction of nuclei and globulin from lupus erythematosus serum demonstrated with fluorescent antibody. *J Immunol* 1958; 80:324–329.
5. Friou GJ. Clinical Application of a Test for Lupus Globulin-Nucleohistone Interaction Using Fluorescent Antibody *Yale J Biol Med* 1958; 31: 40–47.
6. Kumar Y, Bhatia A, Minz RW. Antinuclear antibodies and their detection methods in diagnosis of connective tissue diseases: a journey revisited. *Diagnostic Pathology* 2009, 4:1 doi:10.1186/1746-1596-4-1.
7. Moore AE, Sabachewsky L, Toolan HW. Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells. *Cancer Res* 1955; 15:598–602.
8. Meroni PL, Schur PH. ANA screening: an old test with new recommendations. *Ann Rheum Dis* 2010; 69:1420–1422.
9. Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, et al. Guidelines for Clinical Use of the Antinuclear Antibody Test and Tests for Specific Autoantibodies to Nuclear Antigens. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:71–81.
10. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 1272–1277.
11. Subcommittee for scleroderma criteria of the American rheumatism association diagnostic and therapeutic criteria committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthr Rheum* 1980; 23: 581–590.

12. van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J et al. Classification Criteria for Systemic Sclerosis: An ACR-EULAR Collaborative Initiative. *Arthr Rheum* 2013;65:2737–2747.
13. Petri M, Orbai AM, Alarcón GS, Gordon C, et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthr Rheum* 2012; 64:2677–86.
14. Балева М, Николов К. Антинуклеарни и антикардиолипинови антитела при болни със синдрома на Raynaud – белег на недиференцирана съединителнотъканна болест? *Ревматология* 1998; 6 (1): 36–38.
15. McGhee JL, Kickingburd LM, Jarvis JN. Clinical utility of antinuclear antibody tests in children. *BMC Pediatrics* 2004; 4:13. doi: 10.1186/1471-2431-4-13
16. Deane PMG, Liard G, Siegel DM, Baum J. The outcome of children referred to a pediatric rheumatology clinic with a positive antinuclear antibody test but without an autoimmune disease. 1995; 95: 892–895.
17. Malleson PN, Sailer M, Mackinon MJ. Usefulness of antinuclear antibody testing to screen for rheumatic diseases. *Arch Dis Child* 1997; 77: 299–304.
18. Malleson PN, Mackinon MJ, Sailer – Hoeck M, Spencer CH. Review for the generalist: The antinuclear antibody test in children – When to use it and what to do with a positive titer. *Ped Rheumatol* 2010; 8:27. <http://www.ped-rheum.com/content/8/1/27>.
19. Lee SS, Lawton JWM, Chak W. Distinction between antinuclear antibody and p-ANCA. *J Clin Pathol* 1991;44:962–963.
20. Tektonidou MG, Anapliotou M, Vlachoyiannopoulos P, Moutsopoulos HM. Presence of systemic autoimmune disorders in patients with autoimmune thyroid diseases. *Ann Rheum Dis* 2004;63:1159–1161. doi: 10.1136/ard.2004.022624
21. Балева М, Алтънкова И. Клинично значение на имунологичните показатели. В: *Клиничната лаборатория и клиничната медицина*, Мединформ 2017 г. Редактори З. Кръстев и Т. Шипков, стр. 18–48.
22. Mutasim D, Adams BB. A practical guide for serologic evaluation of autoimmune connective tissue diseases. *J Am Acad Dermatol* 2000; 42:159–174.
23. Li Q-Z, Karp DR, Quan J, et al. Risk factors for ANA positivity in healthy persons. *Arthritis Research & Therapy* 2011; 13:R38
24. Tan EM, Feltkamp TE, Smolen JS, et al. Range of antinuclear antibodies in “healthy” individuals. *Arthritis Rheum* 1997;40:1601–11.
25. De Vlam K, De Keyser G, Verbruggen G, et al. Detection and identification of antinuclear antibodies in the serum of normal blood donors. *Clin Exp Rheumatol* 1993;11:393–397.
26. Hayashi N, Koshiba M, Nishimura K, et al. Prevalence of disease specific antinuclear antibodies in general population: estimates from annual physical examinations of residents of a small town over a 5-year period. *Mod Rheumatol* 2008;18:153–160.
27. Mariz HA, Sato EI, Barbosa SH, et al. Pattern on the antinuclear antibody-HEp-2 test is a critical parameter for discriminating antinuclear antibody-positive healthy individuals and patients with autoimmune rheumatic diseases. *Arthr Rheum* 2011;63:191–200. doi: 10.1002/art.30084.
28. Habash-Bseiso DE, Steven HY, Glurich I, Goldberg JW. Serologic testing in connective tissue diseases. *Clin Med Res* 2005; 3:190–193.

29. Fritzler MJ. The antinuclear antibody test: last or lasting gasp? *Arthritis Rheum* 2011;63:19–22.
30. Agmon-Levin N, Damoiseaux J, Kallenberg C, et al. International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. *Ann Rheum Dis* 2014; 73:17–23.
31. Narain S, Richards HB, Satoh M, et al. Diagnostic accuracy for lupus and other systemic autoimmune diseases in the community setting. *Arch Intern Med* 2004;164:2435–2441.
32. Boumpas DT, Chrousos GP, Wider RL et al. Glucocorticosteroid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. *Ann Intern Med* 1993; 119:1198–1208.
33. Abeles AM, Abeles M. The Clinical Utility of a Positive Antinuclear Antibody Test Result. *Am J Med* 2013; 126: 342–348.
34. Damoiseaux J, Andrade LE, Fritzler MJ, Shoenfeld Y. Autoantibodies 2015: From diagnostic biomarkers toward prediction, prognosis and prevention. *Autoimmun Rev* 2015; 14:555–563.
35. Arbruckle MR, McClain MT, Robertone MV et al. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2003; 349:1526–33.
36. Pisetsky DS. Antinuclear antibodies in rheumatic disease: a proposal for function-based classification. *Scand J Immunol* 2012; 76: 223–228.
37. Pisetsky DS. Antinuclear antibodies in healthy people: the tip of autoimmunity iceberg? *Arthr Res Ther* 2011; 13:109.
38. Cho JH, Gregersen PK. Genomics and the multifactorial nature of human autoimmune disease. *N Engl J Med* 2011; 365: 1612–23.
39. Bonfa E, Ilowet R, Scheiberg M, De Souza JM. Comparison between autoantibodies in malaria and leprosy with lupus. *Clin Exp Immunol* 1987; 70:529–37.
40. Adebajo AO, Charles P, Maini RN, Hazleman BL. Autoantibodies in malaria, tuberculosis and hepatitis B in West African population. *Clin Exp Immunol* 1993; 92:73–6.
41. Harley JB, James JA. Epstein-Barr virus infection induces lupus autoimmunity. *Bull NYU Hosp Jt Dis* 2006; 64:45–51.
42. Mahler M, Fritzler MJ. The Clinical Significance of the Dense Fine Speckled Immunofluorescence Pattern on HEp-2 Cells for the Diagnosis of Systemic Autoimmune Diseases. *Clin Dev Immun* 2012; Article ID 494356, doi:10.1155/2012/494356
43. Hiemann R, Buttner T, Krieger T, et al. Challenges of automated screening and differentiation of non-organ specific autoantibodies on HEp-2 cells. *Autoimmun Rev* 2009;9:17–22.
44. Perez D, Gilburd B, Cabrera-Marante O, et al. Predictive autoimmunity using autoantibodies: screening for anti-nuclear antibodies. *Clin Chem Lab Med* 2017; doi: 10.1515/ccim-2017-0241.
45. Satoh M, Chan EK, Sobel ES, et al. Clinical implication of autoantibodies in patients with systemic rheumatic diseases. *Expert Rev Clin Immunol* 2007;3:721–38.
46. Tan EM. Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): their immunobiology and medicine. *Adv Immunol* 1982;33:167–240.
47. Hiemann R, Buttner T, Krieger T, et al. Challenges of automated screening and

- differentiation of non-organ specific autoantibodies on HEp-2 cells. *Autoimmun Rev* 2009;9:17–22.
48. Narciso-Schiavon JL, Freire FC, Suarez MM, et al. Antinuclear antibody positivity in patients with chronic hepatitis C: clinically relevant or an epiphenomenon? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009;21:440–6.
 49. Satoh M, Chan EK, Ho LA, et al. Prevalence and sociodemographic correlates of antinuclear antibodies in the United States. *Arthr Rheum* 2012;64:2319–27.

НАУЧНИ ПРОЯВИ С УЧАСТИЕТО НА ЧЛЕНОВЕ НА БАКИ

ОБОБЩЕНИЕ НА НАЕ EXPERT MEETING

БЕЛГРАД, СЪРБИЯ

1–2 юни 2017

Това е продължение на сътрудничество между страните от бивша Югославия – Сърбия, Черна гора, Македония, Хърватска, Словения. Срещата се провежда за 5-и път, като всяка година е в различна държава.

Наследственият ангиоедем е рядко наследствено автозомно доминантно заболяване, което предизвиква епизодични атаки на отоци и подуване на тъканите. То може да засегне лицето, крайниците, гениталиите, гастроинтестиналния тракт и горните дихателни пътища. Засягането на мукозните мембрани на храносмилателния тракт може да доведе до повръщане, болезнени коликоподобни спазми и болка, които наподобяват илеус – чревна непроходимост. Отокът на горните дихателни пътища може да бъде животозастрашаващо състояние. Епизодите могат да бъдат предизвикани от травма, хирургична интервенция, зъболечение, менструация, някои лекарства, вирусни инфекции и стресови състояния, но откриването на отключващия фактор не винаги е възможно. Това заболяване засяга приблизително 1:10 000–50 000 души.

Най-често НАЕ е автозомно доминантно унаследявана мутация на гена на С1 инхибитора (SERPING 1 ген) в хромозома 11. Към момента са описани повече от 300 генетични мутации, които предизвикват дефицит на С1 инхибитора. Много от пациентите имат фамилна история на заболяването, но около 25% от случаите се дължат на спонтанна мутация. Ниското ниво на С1 инхибитора в плазмата води до повишена активация на пътищата, които освобождават брадикинин, който от своя страна е отговорен за ангиоедемата и болката при пациентите, тъй като увеличава васкуларния пермеабилитет.

Най-честата форма на болестта е НАЕ I, което е резултат от много ниска концентрация на С1 инхибитор. По-рядко се среща НАЕ II, при който С1 инхибиторът е в нормално количество, но не функционира нормално поради дефект на белтъчната структура. Тип II е около 15–20% от НАЕ.

Обсъждани бяха предизвикателствата пред лечението на наследствения ангиоедем от гледна точка на лекарите. Представителят Матиа Риявец от Словения представи резултати от мащабни генетични изследвания на пациенти от региона. Детайлно е изследвана мутацията на ген SERPING1.

Представителят на Хърватска Борис Гриднич представи доклад относно начините за справяне и лечение на НАЕ пристъпите. Използваните препарати

са Беринерт, Фиразир, Руконест. Набляга се на важната роля на добро взаимодействие между различните специалисти за предотвратяване на пристъпите на пациентите. Н. рулоги причинява чести НАЕ пристъпи и препоръчват своевременна ирадикация.

Д-р Лапич от Хърватска представи доклад относно НАЕ по време на бременност. Най-добри резултати при остри атаки по време на бременност са постигнати с С1 естеразен инхибитор. Другите видове лечение не са препоръчани поради вероятността да преминат през плацентарната бариера. Изложи също така предизвикателствата пред имунолозите в Хърватска – страната е със силно начупена брегова ивица, с множество малки и големи острови, което налага провеждането на информационни кампании сред местните общопрактикуващи лекари и сред пациентите относно болестта.

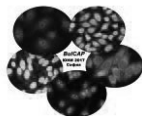
Д-р Зидарн от Словения представи настоящата ситуация в страната относно НАЕ. Там са въведени карти на пациентите, подобно на чип карти, в които е описано заболяването и начинът да се помогне на пациент при евентуално възникнал тежък пристъп. Всички пациенти са минали обучение за начина за приложение на препарат при възникване на пристъп, как да разпознават началото на пристъпа и местата, на които да отидат, за да получат адекватна лекарска помощ. Преди всяка зъболекарска интервенция пациентите получават С1 естеразен инхибитор, има специалисти от различни области, които са преминали обучение за НАЕ. За пациента се грижи екип от специалисти, запознати с болестта им.

Представителят на Черна гора представи актуалното състояние на НАЕ и се открий високата заболяемост в страната. Членовете на експертната група изразиха съмнение за ендемично огнище, понеже и пациенти от други страни са съобщили за роднински връзки в района на Черна гора.

Представена беше и картина на ситуацията в Сърбия – малко на брой специалисти имунолози, които се опитват да осигурят адекватно лечение на пациентите. Наскоро са получили държавно финансиране за лечението и активно се интересуваха от начините, по които се справят тяхните колеги от съседните държави. Съобщиха, че при тях все още не е възможно да се изгради национален регистър на пациентите, поради високата цена, която те не могат да си позволят. Разказаха за среща, която е била проведена в София през 2015 год. от доц. Стаевска, на която е бил представен софтуер за регистър, но цената се оказала прекалено висока за тях и не са се включили.

Проф. Мурджева представи ситуацията в България:

- Лечението на пациентите се реимбурсира от ЗК;
- Експертен център за ПИД;
- Изграден е национален регистър за редки заболявания;
- Редовно се провежда обучение на пациенти с ПИД;
- Национално и международно сътрудничество.



РАБОТНА ПРОГРАМА

*Първа работна среща за стандартизиране на ANA
флуоресцентни образи, София 14.06.2017*

УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, Аула

Модератори: Е. Иванова-Тодорова, Д. Кюркчиев

11.00–11.30

Откриване на работната среща – д-р Дечев, проф. Наумова, доц. Кюркчиев

11.30–11.50 Catrin MaryJersby

EUROIMMUN

Strategy for Determination of Antibodies against Cell Nuclei(ANA).

11.50–12.00

Discussion

12.00–12.25

Е. Иванова-Тодорова

Лаборатория по клинична имунология, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“

Представяне на номенклатурата и класификационно дърво на ICAP (International Consensus on Antinuclear antibody Pattern) – Ядрени светения – „истинската ANA“.

12.25–12.40

Д. Кюркчиев

Лаборатория по клинична имунология, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“

ANA – не само и не още автоимунитет.

12.40–12.50

М. Балева, М. Николова-Влахова*

Клиника по клинична имунология с банка за стволови клетки,

***Клиника по нефрология, УМБАЛ „Александровска“**

ANA негативен SLE.

12.50–13.10

Е.Иванова-Тодорова

Лаборатория по клинична имунология, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“

Представяне на номенклатурата и класификационно дърво на ICAP (International Consensus on Antinuclear antibody Pattern) – Цитоплазмени и митотични светения (ANA негативни или ANA позитивни?).

13.10–13.40

Дискусия. На чаша кафе, похапване и още нещо...

13.40–13.55

И. Алтънкова

Катедра по вътрешни болести, УБ „Лозенец“

Аналитичен и клиничен ANA cut-off.

13.55–14.10

С. Лесичкова, Н. Гешева, Н. Кожухарова, М. Димитрова, А. Михайлова, М. Балева, Е. Наумова

Клиника по клинична имунология с банка за стволови клетки, УМБАЛ „Александровска“

ANA: титър 1:160 – диагностична значимост.

14.10–14.20

И. Манолова

Катедра по молекулярна биология, имунология и медицинска генетика. МФ, Тракийски университет

Честота и антигенна специфичност на ANA в клиничната практика.

14.20–14.30

М. Мурджева, П. Гарджева, М. Ивановска

Лаборатория по имунология при УМБАЛ „Св. Георги“ – Пловдив и Катедра „Микробиология и имунология“ при МУ – Пловдив

ANA-IFA – предизвикателствата на клетъчните субстрати, фиксаторите и флуоресцентните образи (нашият опит).

14.30–14.40

Калина Тумангелова-Юзеир

Лаборатория по клинична имунология, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“

ANA в имунологичната практика. Представяне на имуофлуоресцентни образи и асоциация със специфични антигени.

14.40–14.50

Е. Викентиева, И. Алтънкова, Г. Сивчева, С. Асенова, Н. Калъчев –
МДЦ „Цибалаб“ ЕООД

Нашият опит в определяне на anti-DFS-70 за разграничаване на клинично значими антитела от антитела без отношение към диагнозата на автоимунните ревматични болести.

14.50–15.00

Е. Красиминова

Лаборатория по Клинична имунология, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“

Типични имуофлуоресцентни образи при системна склероза и свързаните с тях автоантитела.

15.00–15.10

Г. Василев

Лаборатория по клинична имунология, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“

Създаване на мрежа за комуникация между имунологичните специалисти за синхронизиране на флуоресцентни образи.

15.10–16.00

Дискусия. На чаша кафе, похапване и още нещо...



Протокол от:
Първа работна среща за стандартизиране на ANA
флуоресцентни образи, София 14.06.2017
УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ – София

Срещата беше открита с приветствие от доц. д-р Доброслав Кюркчиев, дмн и проф. д-р Елисавета Наумова, дмн

На срещата присъстваха 35 колеги.

Срещата започна с презентация на Catrin Mary, гост-лектор от фирма EUROIMMUN, Германия – на тема: Strategy for Determination of Antibodies against Cell Nuclei (ANA). Бяха разгледани в сравнителен аспект резултатите, получени чрез ANA индиректна имунофлуоресценция и специализираните имуноензимни методи за потвърждаване на ANA положителни скрининг серуми за наличие на специфични ANA. Бяха зададени много въпроси, свързани с несъответствия в резултатите, получени при работа с различни тестове и методи (ELISA, имуноблот), провеждани с продукти на EUROIMMUN.

Дискусията след презентацията не е описана в протокола, тъй като тя не е пряко свързана с целта на протокола – да представи мнения, препоръки и въпроси свързани с предстоящото вземане на решение относно ANA флуоресцентните образи и издаване на препоръки за работа на ANA скрининг чрез индиректна имунофлуоресценция.

Дискусия:

Въпроси, мнения и предложения, изказани на Първата работна среща за стандартизиране на ANA флуоресцентни образи

Проф. Е. Наумова: Изказа мнение и задоволство от това, че има много млади специалисти, които се интересуват от тематиката, свързана с ANA флуоресцентните образи. Предложи, ако е възможно, всеки един, който работи с този метод, да разгледа и преосмисли както предоставената от ICAP номенклатура, така и своите файлове със съхранени през годините пациенти (вкл. и флуоресцентни образи).

„Защото ние имаме специалисти, които работят от години с тези тестове, и това може да доведе дори до възможността за събиране и обобщаване на наши образи, съответстващи на класификационното дърво на ICAP.“ Напомни, че разликата между масовите лаборатории и специализираните имунологични лаборатории е, че работещите в тези специализирани структури клиничните имунолози работят за пациента, познават повечето пациенти, познават клиничните специалисти, които ги изпращат, а изследването за ANA не минава просто като рутинен тест, то се интерпретира на базата на общата картина, предоставена ни както от пациента, така и от клиничния специалист.

Апелира всичко това да се обмисли и да се дадат становища до края на ноември 2017 г. Тези становища да са на база обобщени собствени данни на всеки един от нас и на база препоръки ICAP (предоставени на всеки участник като напечатано копие). Това е необходимо, за да се излезе с единно становище относно типовете светене, евентуалната клинична значимост на част от тях на годишната среща на БАК през декември 2017 г.

Доц. Д. Кюркчиев: Акцентира на деликатния момент при представянето на образите и комуникацията с клиничните специалисти. „Ако ние видим даден образ и го представим заедно с резултата за ANA, а впоследствие коментираме, че този образ е свързан с конкретни ANA автоантитела, и дадем идея клиничните специалисти да изпратят искане за тестване чрез имуноензимни методи и се окаже, че точно тези антитела в серума на дадения пациент не се намират, това може да доведе до компрометиране както на самите нас, на доверието в нас като клинични имунолози, така и на типа светения и тяхната значимост. Всички ние знаем, че зад част от класическите ANA образи стоят много ANA антитела и част от тях няма как да бъдат доказани.“

Проф. И. Алтънкова изказа становище, че има вероятност част от клиничните специалисти да не тестват евентуалните специфични автоантитела, асоциирани с конкретен ANA образ, а за тяхно улеснение да ги приемат директно за евентуално положителни спрямо конкретен антиген, което може да компрометира диагнозата на пациента.

Доц. Т. Червенков: Изказа мнение, че може би трябва да се описват образите, но без да се посочват конкретни антигени и антителата срещу тях.

Доц. Д. Кюркчиев: „Именно затова трябва да се търси баланс между това, от една страна, да насочим клиничните специалисти към изследването на конкретни ANA, а от друга страна – трябва да им се обясни да не се предоверяват на образите, защото те не са абсолютно специфични за малък брой ANA.“

Проф. И. Алтънкова: „В голяма част от стандартните лаборатории серумите идват, като не се знае точно кой специалист или общопрактикуващ лекар

е насочил дадения пациент. Освен това много често ревматолозите или другите клинични специалисти не са добре запознати със значимостта на видовете ANA флуоресцентни образи, а и много голяма част от резултатите на практика са отрицателни за ANA, въпреки че може да имат и специфично цитоплазмено светене. “ Поради това проф. Алтънкова подкрепя становището на доц. Кюркчиев и смята, че ние трябва да вземем решение до каква степен ще подсказваме на клиничните специалисти и ще ги насочваме към диагнозата. Може би трябва да се излезе с конкретно предложение.

Проф. М. Мурджева: „Нашият колектив е може би един от тези, които най-много са работили в областта на ANA флуоресцентните образи и не само, също и AMA и т.н. От 1991 тестът е въведен в лабораторията като рутинно изследване, а от 2000 се работят и много проекти, свързани с използването на различни субстрати за ANA и сравнението им с имуоблот и ELSA, вкл. беше защитена и една дисертация. От нашия опит мога да кажа, че консенсусът, който трябва да приемем, трябва да е върху едри и основни неща, защото за тези, които идват след нас и които ние учим, те трябва да са пределно ясни и насочени. Например: Какъв трябва да бъде клетъчният субстрат за ANA? – това вече е широко известно, но трябва да се каже. Какъв трябва да бъде диагностичният титър, защото все още някои от нас работят с диагностичен титър 1:40, а вече все повече в световен мащаб се насочват към титър 1:160. Също какъв да бъде конюгата – моноспецифичен или полиспецифичен.“ Лично мнение на проф. Мурджева е, че не трябва да не се абсолютизират флуоресцентните образи, но резултатът, който се дава за ANA, трябва да съдържа и флуоресцентния образ. Този образ обаче трябва да не е в детайли и подробности, както е описан по ICAP, защото това ще обърка и затрудни останалите клинични специалисти. „От друга страна, нека да не подценяваме колегите ревматолози. Голяма част от тях отдавна знаят какво е центромерен тип светене, петнист тип, дифузен тип, включително специализиращите ревматология имат въпрос от конспекта, третиращ и ANA флуоресцентни образи, а самите специализанти ги изучават и при нас, когато карат стажа си по Клинична имунология. Така че ние не само сме длъжни да ги научим, но и те донякъде са подготвени да получат от нас резултат напр. ANA 1:320, дифузна, хомогенна флуоресценция и да интерпретират какво значи това. Аз лично бих се въздържала да определя и напиша дали този тип флуоресценция е свързан с антитела срещу dsDNA или histons, защото нашият опит показва, че няма силна корелация между флуоресцентни образи (получени при сравнение между две клетъчни линии: Hep-2 и McCoy-Plovdiv) и антителата, получени чрез ELISA. Тя е умерена в два от разгледаните от нас случая и дори слаба в един от случаите. Така че лично за мен, доколкото един петнист модел може да се свърже със всички ENA или и с други антитела, не е много релевантно, защото в нашата практика това не винаги го установяваме и доказваме.

Д-р Иванова-Тодорова: „Аз също смятам, че трябва да се намери баланс, въпреки че съм определено пристрастна към образите, но бих искала да ви дам един пример: има пациентски серуми, чиито флуоресцентен образ е нуклеоларен тип светене, не от най-често наблюдаваните модели. Този тип светене в много голям процент се свързва със системната склероза. Тогава ние можем да посъветваме клиничните специалисти да пуснат за изследване имуноблот за системна склероза, без да ги насочваме към конкретни антитела. Аз самата никога не бих си позволила да предсказвам с точност асоциираното с даден тип светене конкретно антитяло, но ние можем да насочим клиничните специалисти, да разговаряме с тях и да засилим по този начин и контакта с ревматолозите и др., клинични специалисти, като това в крайна сметка да е полезно и за пациентите.“

Д-р Г. Чавдарова: Подкрепи идеята за вписване и вида на флуоресцентния образ към резултата за ANA, защото трябва да има смисъл от самото изследване, изказвайки някакво заключение, което да насочи клиничните специалисти.

Проф. И. Алтънкова: „Искам да акцентирам и върху факта, че и по препоръките на ICAP трябва да се дава кратко описание на флуоресцентния образ, което да насочва ревматолозите.“

Д-р М. Христова: „Аз смятам, че както клиничните специалисти трябва да дават повече информация за пациента, заедно с направлението за изследване на ANA, така и клиничните имунолози трябва да насочват клиничните специалисти и по този начин да улесняват работата им, свързана с поставянето на коректна диагноза и подходите за терапия.“

Доц. Р. Манолова: „Аз също смятам, че трябва да отбелязваме основния тип светене, дали е хомогенен, петнист, или в редките случаи, когато става въпрос за нуклеоларен тип светене, защото например някои пациенти се изследват в една лаборатория за ANA скрининг, получават положителен резултат, но те са информирани и искат да си пуснат по-специфични изследвания в друга лаборатория. Тогава, когато не е отбелязан основният тип на светене, не може да се насочи по-добре пациентът към това да се пусне общ панел за ANA типирание или склеродермен такъв. Това има значение и от финансова гледна точка за пациентите, и за доверието им към нас.“

Доц. Д. Кюркчиев се съгласи със становището на доц. И. Манолова, като изказа твърдение: „Но това, което според мен не е много смислено, е да насочваме ревматолозите към това, какво биха могли да изследват. Може би е добре, типът светене да бъде описан и съответно самият ревматолог, ако се интересува, сам може да види този тип ANA светене на кои антитела и антигени съответства. Сам да стигне до тази информация, ако желае“.

Дискусия за анти-DFS антителата:

Проф. Е. Наумова: Зададе въпрос към представянето на доц. Е. Викентиева на тема:

„Нашият опит в определяне на anti-DFS-70 за разграничаване на клинично-значими антитела от антитела без отношение към диагнозата на автоимунните ревматични болести“.

- От презентацията става ясно, че при изследваните от Вас пациенти, anti-DFS-70 антителата се срещат преимуществено при пациенти с автоимунна болест и такива с неоплазии, а при здрави – не. Каква е клиничната значимост и защо е необходимо да се прави при пациенти с автоимунни болести? Каква допълнителна информация би ни донесло диагностицирането на антителата срещу DFS-70?

Доц. Е. Викентиева: „Ролята на anti-DFS-70 в клиничната практика е да отхвърли наличието на автоимунна ревматична болест. Тези anti-DFS-70 антитела би трябвало да се изследват само при пациенти, които за положителни за ANA, но не позитивират някои от познатите специфични ANA. По този начин тези anti-DFS-70 антитела имат отношение към дискриминирането, т.е. тези пациенти положителни за anti-DFS-70 със сигурност нямат автоимунна ревматична болест.“

Проф. И. Алтънкова разясни, че става въпрос за пациенти, които са положителни за ANA на IIF, но отрицателни за най-често срещаните специфични ANA доказани чрез имуноблот или други методи, но не покриват всички критерии за автоимунна болест. „Тогаво е важно да се установи дали в тези серуми присъстват anti-DFS-70 антитела, защото те могат да са маркер и да подскажат на ревматолозите да не търсят на този етап автоимунна болест. Докато има серуми на пациенти, които са положителни за дадено специфично ANA антитяло (например анти-Sm) и едновременно с това са положителни и за anti-DFS-70, тогава не се взима под внимание наличието на anti-DFS-70 в серума на тези пациенти, а акцентът е насочен към конкретното специфично ANA антитяло. Засега това са данните, изнесени в световната литература по този въпрос. Това е твърде нов маркер и все още не се знаят със сигурност биологичните му функции. И тъй като в много от случаите ние наблюдаваме смесен тип светене при част от серумите, идеята е, когато видим на флуоресценция DFS-70 подобен тип светене, ние да пуснем разширен панел от специфични ANA, за да можем да отграничим чистите DFS-70 серуми от тези на пациенти с автоимунни заболявания (имащи и други специфични ANA), които се маскират от високите титри на anti-DFS-70 антителата.“

Проф. М. Мурджева зададе въпрос: „Ако DFS-70 антигенът е ко-фактор за HIV вируса, има ли в световната литература данни за наличие на по-голяма честота на anti-DFS-70 антитела при тези пациенти?“.

Доц. Е. Викентиева: Отговори, че за сега няма такива данни.

Дискусия за cut-off стойността на ANA

Д-р Е. Иванова-Тодорова: „Във връзка с темата за cut-off стойността на ANA бих искала да обърна внимание на тези серуми, които ние даваме с резултат ANA 1:160. По наблюдение на колегите от нашата лаборатория повече от 50% от тези серуми не могат да се класифицират по някои от АС светенията, препоръчани ни от ICAP. Те са общо казано петнисти, неясни, изглеждат замъглени и тук е много трудно да се направи разлика дали става въпрос за ANA в резултат на възпаление в хода на автоимунна болест, или това е специфична ANA. В повечето случаи такива серуми се оказват и негативни на имуноблот теста за специфични ANA. Поради това трябва да преосмислим идеята за cut-off 1:80 и най-вече по отношение на значението за диагнозата на автоимунните болест.“

Доц. Е. Славов: Повдигна въпроса за здравите индивиди, чрез които се определя cut-off ANA. „Какви са точно здравите и по какъв критерий се подбират? Защото от този въпрос следва и какъв ще ни бъде cut-off за ANA. Моят опит, доколкото се занимавам и с профилактична медицина, показва, че в момента над 70% от хората имат някакви заболявания, така че част от здравите на практика не са здрави. Ако направим анализ на ехографски прегледи, ще видим, че около 40% от абсолютно здравите са със стеатоза на черния дроб. Така че аз се присъединявам към изказаното предложение за наличие на сива зона поради данните, които изнесе доц. Кюркчиев за това, че при здрави пациенти с положителни ANA, при определени условия, след време може да се развие автоимунно състояние. Поради това може би е добре да се вземе решение за една сива зона между 1:80 и 1:160, която да подпомага пациентите и клиничните специалисти и да ни заостря вниманието за проследяване на този показател във времето.“

Проф. М. Мурджева: „Всички ние сме убедени, че на този етап решение cut-off за ANA не може да се вземе. Това решение ще се вземе на предстоящия конгрес на БАКИ декември 2017 г. Поради това моето предложение към организаторите е да се обобщят данните от направените изказвания и да се разпространят, за да може всеки един от нас да ги съпостави със собствените си данни (това е медицина, базирана на доказателствата) и да изкаже своето мнение по въпроса. Смесът на тази среща е да синхронизираме дейността си по две направления:

1. Критериите за изработване на ANA флуоресцентния метод (вкл. субстрат, конюгат, ICAP класификацията за флуоресцентните образи)
2. Клиничната интерпретация за ANA, защото ние като клинични имунолози трябва да даваме становище.

Трябва да не забравяме обаче, че ANA флуоресцентният тест е само един тест, който влиза в критериите на много автоимунни заболявания, не можем да искаме от себе си и от самия тест той да поставя диагнозата. Например, когато при даден пациент получим резултат ANA 1:320 хомогенен тип светене, в никакъв случай не трябва да коментираме, че се касае за СЛЕ.

Има и друг начин, който е по-трудоемък и изисква време и сме го виждали в изследванията на някои германски лаборатории. Когато се дава резултат след това следва около половин страница описателен текст за възможната клинична интерпретация на даден тест.“

Предложения:

Проф. Е. Наумова: Тъй като опитът с ANA на всички присъстващи е доста богат, тя предлага следното:

1. Предложение, свързано с предстоящата конференция по качеството, декември 2017 г., предлагам да се проведат 2 дебата:

1. Първият да бъде на тема: „За и против използването на описанието на флуоресцентните образи“, като двама колеги, застъпващи с доказателства двете страни („за“ и „против“) на дебата да са д-р Тодорова и доц. Кюркчиев.
2. Вторият дебат да бъде на тема: „Cut-off за ANA и сивата зона – за и против“ – Търсят се желаещи!

Тези дебати ще бъдат изключително полезни и ще улеснят всички нас, за да се вземат общо решение.

II. Предложение, свързано с ICAP класификацията. „Трябва да изчистим концепцията за флуоресцентните образи. Дали искаме да приемем изцяло ICAP класификацията, като само се преведе на български и се приеме дословно, или да дообогатим палитрата от флуоресцентни образи, като добавим или изключим част от тях, което да е свързано пряко и да улеснява работата ни като клинични имунолози.“ На базата на всичко това да се изготвят едни добри национални препоръки относно унифициране на номенклатурата за ANA и съответно приложението и интерпретацията ѝ в клиничната практика. Естествено всичко това трябва да се базира на нашия собствен опит, на базата на взаимоотношенията с

колегите от другите специалности, за да можем да помогнем на нашите пациенти. Радвам се, че и една от насоките, свързани със Стратегически направления за бъдещо развитие в клиничната имунология, които бяха предложени на миналото събрание на БАКИ (декември 2016), е свързано и с автоантителата, и по-специално с Национална програма за скриниране на здрави пациенти за наличие на ANA. Това, с което Клиниката по клинична имунология, УМБАЛ „Александровска“, може да помогне, е да предоставим серуми от здрави донори от нашия Регистър на здрави донори за трансплантации.“

Доц. Д. Кюркчиев: Потвърди, че направлението, свързано с автоимунните състояния, е изключително важно и че не случайно е избрал темата си за настоящата среща със заглавие „ANA – не само и не още автоимунитет“. „Докато се подготвях за темата, намерих само 5 проучвания в световен мащаб за предиктивната стойност на ANA, което за мен беше доста шокиращо. Аз смятах, че много хора работят в това направление. Това показва, че се отваря една ниша, която дава добра възможност ние да проучим темата заедно и да я използваме. Имаме вече и подкрепата на фирмите, свързани с китовите за Her-2 клетките, така че нищо не пречи да стартираме това пилотно проучване. Например да се изследват здрави индивиди с генетична предиспозиция, с данни за родственици с автоимунни заболявания, с възможности за HLA-типизиране на конкретни алели, както и ANA тестване, с описание на съответните образи. Защото най-голямата група, която е изследвана относно предиктивната стойност за ANA, е 118 души в САЩ – и това не е голяма група.

Доц. И. Манолова изрази подкрепа за Националната програма за скриниране на здрави пациенти за наличие на ANA. Изказа мнение: „Преди да се започне работата по тази програма, наистина трябва да се приеме консенсусно решение за методиката за ANA, титрите, с които да скринираме, и тогава да обмислим идеята за cut-off за ANA, като се подберат добре здрави контроли, вкл. и деца като такива“.

Проф. А. Михайлова: Подкрепи направените предложения от проф. Наумова за идеята за дебат „за“ и „против“. „Аз лично съм присъствала на подобни дебати, в които накрая аудиторията взе окончателното решение.“

Тя би искала да отпрати още едно предизвикателство и повод за размисъл, а именно ANA при деца.

Тя акцентира и върху ВОК. Подчерта, че само 10 от 22 лаборатории, участващи във ВОК, работят ANA скрининг чрез индиректна имуофлуоресценция. От тези десет, пет са в Университетски болници, което повдига въпроса за качеството на представяните резултати от останалите лаборатории, които не работят ANA скрининг чрез индиректна имуофлуоресценция. „Това повдига въпроса дали ние за в бъдеще ще имаме консенсус за ANA, ще спазваме правилата, но как стои въпросът с останалите лаборатории?“

Също така изказа предложение: „Бъдещите решения, които ще се вземат за ANA методиката, образите и описанието на резултатите да бъдат включени в Медицинския стандарт по клинична имунология“.

Проф. Наумова: „В самата Наредба описанието за ANA няма да влезе, но в нея ние визираме, че трябва да се спазват препоръчителните аналитични принципи, а тези именно принципи могат да бъдат променени и актуализирани въз основа на взетите от всички нас консенсуси. Така че ние можем по този начин индиректно да включим нашите решения като част от тази нормативна база.“

Доц. Кюркчиев: По повод Първата работна среща за ANA завърши с цитат на думите на Уинстън Чърчил:

„Това не е краят. Това дори не е началото на края. Но може би е краят на началото“.

Може би тази среща е краят на началото за изготвяне на Консенсус относно ANA.

АНКЕТА

за проведената Първа работна среща
за стандартизиране на ANA флуоресцентни образи,
София, 14.06.2017 г., УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, Аула

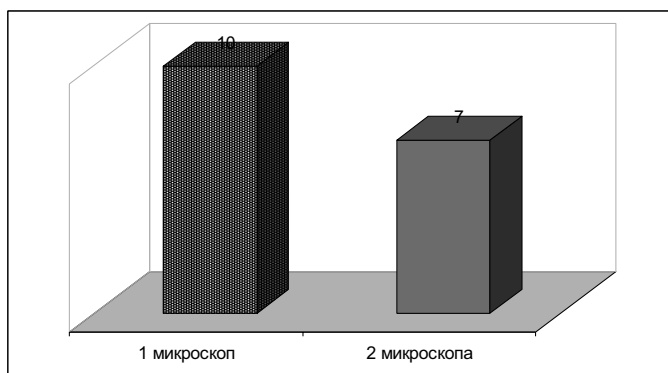
Резултати от анкетата. Обработени 17 анкетни карти

1. Ползвате ли тъмна стая за диагностика на ANA имунофлуоресцентни образи?

Отговори: **100%** от анкетираните ползват **тъмна стая**.

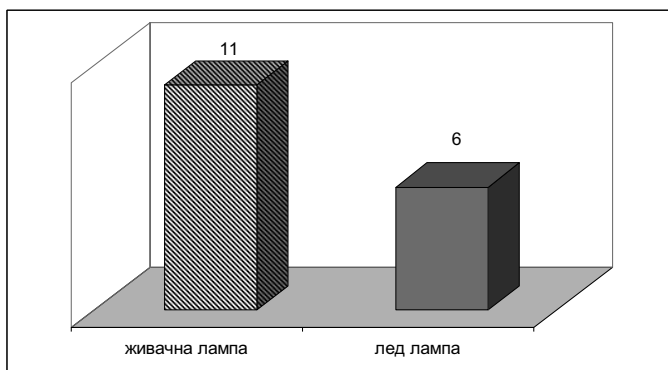
2. Колко флуоресцентни микроскопа имате в лабораторията?

Отговор: Почти равномерно е разпределението на използвания брой микроскопи.



3. С каква лампа са:

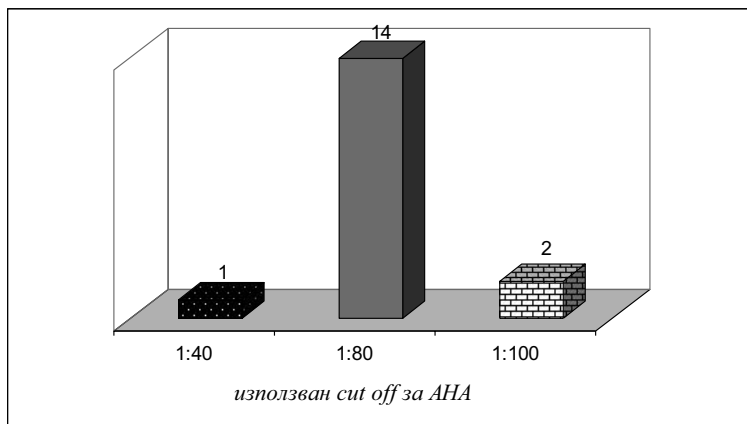
Отговор: Почти равномерно е разпределението и на вида лампи с преимущество за **живачните** лампи.



4. Какъв **cut-off** титър за АНА дава вашата лаборатория?

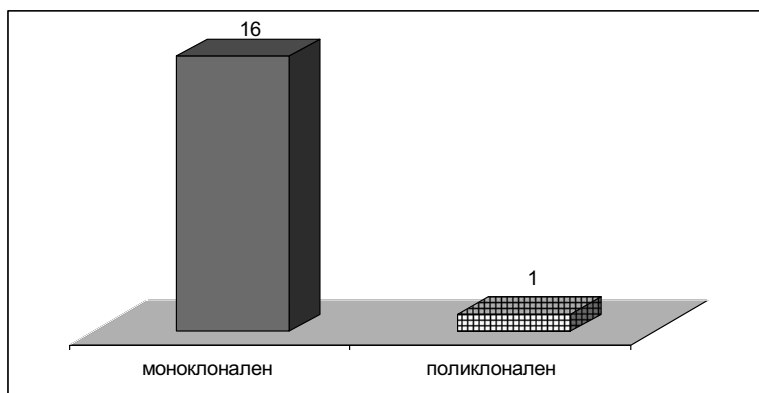
Отговор: Повечето лаборатории използват 1:80 cut-off титър за АНА – **82%** от всички анкетирани.

Един от колегите съобщава, че използва като cut-off титър за АНА при деца **1:40**, различен от използвания по принцип cut-off за възрастни в неговата лаборатория (Този cut-off не е включен в анкетата).



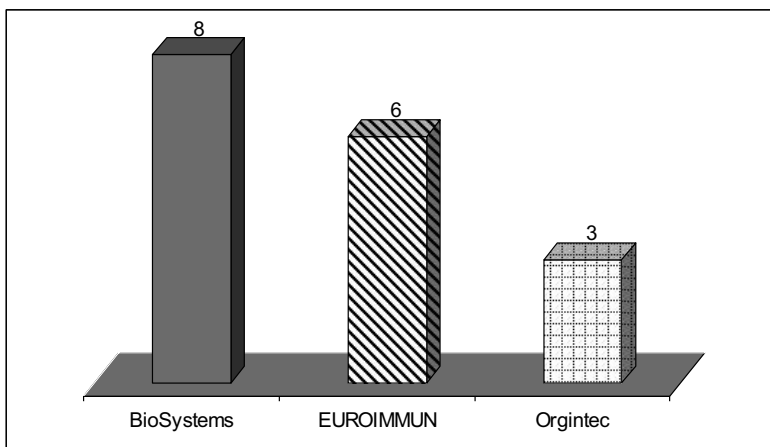
5. Какъв конюгат използвате?

Отговор: Повечето лаборатории използват моноклонален конюгат (в повечето пъти на фирмата производител на Нер-2 клетъчния субстрат).



6. На коя фирма са Нер-2 китовете, които ползвате?

Отговор:



ПРОТОКОЛ

от проведено заседание на Националната работна група по първични имунни дефицити (ПИД) по време на II лятно училище за родители на деца с ПИД в Цигов чарк, 16–18.06.2017 г.

От заседанието:

1. Обсъждане на организационни въпроси относно провеждане на работна сесия „Имуномедиирани редки болести“ в рамките на организираните от МУ – Пловдив дни на редките заболявания на 09.09.2017 г.

Решения:

- 1) Проф. Мурджева и проф. Балева – модератори.
- 2) Доклади от доц. Михайлова, доц. Спасова, д-р Гешева – да се изпратят заглавия на докладите.
- 3) Срок за представяне на материали за участие в работната сесия – 30.06.2017 г.
- 4) Да се уточни въпросът с регистрационните такси. Лекторите са освободени от такси.

2. Да се организира работна среща на лекарите с фирми, представящи имуномодулатори.

Решения:

- 1) Срещата ще се състои в Кюстендил, хотел „Стримон Спа“.
- 2) Предложени са няколко варианта за дати: 22–23.09.2017 г., 29–30.09.2017 г. и 6–7.10.2017 г. Тези варианти за дати да се подложат на обсъждане и да се избере консенсусен вариант.

3. Регистриране на Експертен център по редки заболявания – първични имунни дефицити в Пловдив.

Решения:

- 1) До края на годината да се финализира регистрацията.
- 2) Да бъдат изпратени шаблони на необходимите документи за регистрацията от д-р Гешева и д-р Лесичкова на екипа на проф. Мурджева.

4. Изготвяне и отпечатване на брошури с информация за лекарите относно ПИД.

Решения:

- 1) Да се изготвят отделни книжки за различните видове имунодефицити – хуморални, комбинирани, комплементни, фагоцитарни.
- 2) Да има определен шаблон за всички брошури и да се формират работни групи за различните нозологични единици:

- хуморални – д-р Гешева и д-р Лесичкова да изпратят материал за обсъждане;
- комбинирани – доц. Михайлова и сътрудници;
- комплементни – проф. Мурджева и проф. Балева;
- фагоцитарни – доц. Спасова има готов материал за неутропениите – да го изпрати за обсъждане.

3) Пилотно да се отпечата един вид брошура – например за хуморални, тиражът да бъде 5000 броя.

4) Доц. Михайлова има шаблон с консенсусен алгоритъм за лечението на основните видове ПИД – да го изпрати за обсъждане от Националната работна група и да бъде оформен като материал за отделна брошура.

5) Обсъден беше метод за разпространението на брошурите – предложено беше от доц. Спасова да се разпространят на конференция на педиатрите през есента на 2017 г. в Хисаря.

6) Решено беше да има отделна брошура за профилактика и лечение, но отложено във времето.

5. Националният регистър на редки заболявания беше обсъден.

Решения:

1) Периодично да се допълва с нови пациенти.

2) Координаторът Гергана Тодорова да изпрати новите изисквания с необходимите данни за пациента, които се включват в досието на пациентите.

6. Проф. Наумова предложи да се направят усилия за редовното проследяване състоянието на пациентите с ПИД от екип лекари и професионалисти. Предложено беше от доц. Михайлова в екипа да се включи клиничен психолог. Проф. Наумова подчерта важността от редовното проследяване състоянието на пациентите, поне веднъж на шест месеца от лекарски екип – имунолози, педиатри.

Решение:

1) Да се организира среща с пациентите в Клиниката по клинична имунология, в която да им бъде обяснена важността от редовното проследяване на тяхното състояние. Да се включи в срещата клиничен психолог, който да подпомогне процеса на комуникация и обучение на пациентите.

7. Г-н Панушев предложи да се проведе информационна кампания в медиите – основно в сутрешни блокове, коментарни предавания, токшоу програми. В тях да се представи достъпно и с различни гледни точки информация за Първичните имунни дефицити. Според него информираността сред обществото относно ПИД е недостатъчна, пациентите имат притеснения относно приемането на заболяването си и това води до нежелание да се включат по-активно в процеса на взаимодействие с лекарския екип.

Решение:

1) Да се проучи включване на лекари, пациенти и членове на пациентската организация в коментарни предавания по телевизията.

8. Обсъди се осъществяването на по-тясно взаимодействие с Българската педиатрична асоциация. Проф. Наумова вече е контактувала с проф. Владимир Пилософ.

Решения:

1) Доц. Спасова предложи да се направи съвместна сесия в рамките на годишния конгрес на Българската педиатрична асоциация.

2) Да се организира работна среща между БАКИ и БПА.

9. Обсъди се идеята за подобряване на диалога със Здравната каса с цел осигуряване по-пълноценна грижа за пациентите.

Решения:

1) Да се работи в посока регистриране и включване на нови лекарства в позитивния лекарствен списък.

2) Предложение от доц. Спасова – да се работи в посока регистрация и включване на препарата Имукин на фирма Boehringer Ingelheim.

17.06.2017 г.

Цигов чарк

Протоколирал: Г. Тодорова

Присъствали:

проф. д-р Елисавета Наумова, УМБАЛ „Александровска“ – София

проф. д-р Мариана Мурджева, МУ – Пловдив

проф. д-р Виктория Сарафян, МУ – Пловдив

проф. д-р Мария Николова, НЦЗПБ – София

доц. д-р Мария Спасова, МУ – Пловдив

доц. Д-р Снежина Михайлова, УМБАЛ „Александровска“ – София

д-р Невена Гешева, УМБАЛ „Александровска“ – София

д-р Спаска Лесичкова, УМБАЛ „Александровска“ – София

д-р Мария Ивановска, МУ – Пловдив

д-р Петя Гарджева, МУ – Пловдив

г-н Александър Панушев – Химимпорт фарма

Гергана Тодорова – ПИД експертен център

ОСМИ НАЦИОНАЛЕН КОНГРЕС
по редки заболявания
и XII балкански конгрес по генетика на човека

Събитието се проведе през 8–10 септември 2017 г. в грандхотел „Пловдив“, гр. Пловдив.

Модератори на сесията „Редки заболявания в имунологията“ бяха проф. М. Мурджева и проф. М. Балева.

Бяха изнесени следните доклади:

Редки имуномедиирани заболявания в България – предизвикателството продължава – М. Мурджева и М. Балева

Молекулна диагностика и генетичен скрининг на първичните имунни дефицити – С. Михайлова

Сигнални пътища на T- и B-клетъчни активационни маркери при общ вариабелен имунен дефицит – Н. Гешева

Firazyr (Icatibant) за лечение на херидитарен ангиоедем – фирма Shire – Т. Белева-Попова

Ataxia telangiectasia – клиничен случай – П. Янкова

Хомозиготен MyD88 дефицит – клиничен случай и обзор на литературата – Н. Спасов

ИНФОРМАЦИЯ

за XI конференция за оценка на качеството в имунологията

XI конференция за оценка на качеството в имунологията се проведе в София на 15.12.2017 г. В програмата ѝ, в допълнение на двата ежегодни доклада за външна оценка на качеството (ВОК) на показатели за клетъчния и за хуморалния имунен отговор, беше включено и разглеждане на имуофлуоресцентното определяне на антинуклеарни антитела (АНА). Заседанието се ръководеше от проф. Халачева и доц. Кюркчиев и започна с представяне на данните за флуоцитометрично определяне на клетъчни популации (схеми 4А, 4Б и 4В) от проф. М. Николова. Отбелязано бе, че през 2017 г. има един нов участник и съответно участията в схема 4А са 19 (в сравнение с 18 през 2016 г.), а в схеми 4Б и 4В – по 10, както и през 2016 г. В някои от центровете е подновено оборудването. Анализът и обобщението на резултатите показва:

- Добри резултати по отношение определянето на процент, но големи вариации, в т.ч. отклонения от сертифицираните интервали за абсолютния брой и за трите подсхеми;
- Много лоши резултати за активирани Т-клетки (HLA-DR+CD3+), което не сме наблюдавали досега. Според проф. Николова възможните източници на грешки при флуоцитометричния анализ и подходите за елиминирането им са:

1. Използване на моноклонални антитела от различни производители за определяни на активирани (HLA-DR+CD3+) Т-клетки. За избягването на този източник на вариации би могъл да се постигне консенсус за препоръчителни клонове и флуорохроми.

2. Различни аналитични подходи. За подобряването им е препоръчително използване на FMO (Fluorescence Minus One) контроли.

3. Точно използване на информацията за моноклонални антитела, аналитични подходи и т.н.

4. Изводът, който може да се направи, е, че проблемът с абсолютния брой на клетките при различните схеми остава, като най-сериозен е той при определянето на HLA-DR(+) клетки.

Във връзка с първия доклад се изказаха проф. Наумова, проф. Халачева, доц. Попова, проф. Алтънкова, проф. Генова, проф. Михайлова, д-р Николов, доц. Кюркчиев. Основните въпроси, които бяха поставени и обсъдени, могат да се обобщят както следва:

1. Възможността за използване на свежа кръв успоредно с фиксираната кръв в схема 4А (доц. Попова), за да бъде ВОК възможно най-близък до ежедневната практика и да се избегне проблемът с хематологичните броячи, които не разграничават добре фиксираните популации бели кръвни клетки.

По този пункт аргументите и становищата бяха противоречиви. Прие се от повечето участници, че използването на свежа кръв (дори като пилотно проучване) ще усложни провеждането на ВОК поради необходимостта от своевременно изпращане на пробите до лабораториите в страната (проф. Николова), използването на консенсусни референтни стойности (с използване на Z-критерий за отклонение), при което поради малкия брой участници интервалът на допустимо отклонение се увеличава), както и изборът на пробата за сертифицирането на лабораториите (доц. Кюркчиев). От друга страна, фиксираната кръв се използва и е утвърден материал за имунофенотипизиране в големи международни схеми за ВОК.

2. Да се предоставят ли стойностите на абсолютния брой левкоцити при работа с фиксирана кръв, или всеки участник да ги определя самостоятелно?

По време на обсъждането бе подчертано от доста участници, че определянето на абсолютния брой по индиректен метод във фиксирани, за разлика от пресни кръвни проби дава много различни стойности в зависимост от хематологичния анализатор. Това неминуемо се отразява и на абсолютните стойности при имунофенотипния анализ, което може да бъде една от причините за наблюдаваните при ВОК несъответствия по този показател.

3. Унифициране на флуорохрома, с който са маркирани антителата срещу HLA-DR (проф. Алтънкова) и на аналитичния подход (поставяне на маркера) при определяне на HLA-DR(+) Т-клетки (проф. Михайлова, проф. Николова), като се вземе под внимание и степента/профилът на HLA-DR експресия в зависимост от клетъчната популация (проф. Наумова).

Като цяло, становището е, че флуорохромът и използваните комбинации от моноклонални антитела имат значение. Проф. Николова подчерта, че е уместно да се използва PE конюгирано анти-HLA-DR моноклонално антитяло, а при анализа да се включи dim-популацията (проф. Николова, проф. Алтънкова, проф. Михайлова),

4. Организиране на кръгла маса/работна среща (проф. Алтънкова, д-р Николов) за използване в рутинната практика клетъчни маркери, при които има аналитични затруднения, като HLA-DR(+), CD38(+) Т-клетъчни субпопулации и др.

5. Проблеми при определяне на абсолютния брой CD34+ клетки в кръвни продукти, предназначени за трансплантация при използване на единична платформа – намаляване на броя на микросферите (проф. Генова при аферезни продукти и проф. Михайлова при единици кръв от пъпна връв). Проф. Николова е имала подобни инцидентни наблюдения при определяне на абсолютен брой CD4 клетки в периферна кръв, което подсказва, че проблемът е свързан по-скоро със стандартния материал (епруветките TRU-Count), отколкото с обработката на биологичната проба.

6. Да се обсъди възможността за виртуален анализ на аналитичния произход за някои показатели (проф. Алтънкова, проф. Наумова).

7. Приемане/отхвърляне на индивидуални резултати на участник поради

технически грешки, неправилен аналитичен подход и др. Задължително трябва да става след обсъждане на казуса от Контролния съвет, който да вземе решение.

8. Да се въведе ли качествен контрол за IGRA тестовете? (проф. Николова). Общото становище бе, че този ВОК е крайно необходим.

В резултат на дискусиите се реши:

1. Да продължи използването на стандартизиран материал (фиксирана кръв) за схеми 4А, 4Б и 4В.

2. Да не се съобщават предварително стойностите на абсолютния брой левкоцити.

3. Като първа стъпка, преди организиране на работни срещи, проф. Николова да изпрати флуоресцентни образи за CD3/HLA-DR комбинацията, като всеки от участниците в този ВОК да използва собствения аналитичен подход при едни и същи образи (виртуален анализ на проби). След анализиране и обобщаване на резултатите може да се обсъди и приеме единен подход за поставяне на маркерите.

4. Реша се да се пристъпи към въвеждане на контрол за IGRA тестовете през следващата година, като с организирането на първия пилотен кръг се ангажира проф. Николова.

Конференцията продължи с докладване на резултатите от ВОК за хуморален имунитет за 2017 г. от проф. Михайлова. В началото на доклада бяха представени критериите за оценка на резултатите и за успешно участие във ВОК, приети с решение на Контролния съвет. Отчетено бе значимо намаляване на процента и степента на отклоненията от консенсусните стойности в схема 1 (ИгА, ИгГ, ИгМ, ИгЕ, СРР), стигащо до липса на такива за някои от показателите, като продължават да преобладават несъответствия в резултат на технически грешки. Схемите за автоантитела като цяло показват много добри резултати, но за някои проби не е достигнат консенсус. В резултат на анализа на данните в тези схеми проф. Михайлова постави за дискусия следните въпроси:

- Резултатите за даден параметър трябва да са сравними независимо от използвания метод/кит. Вариации при определяне на автоантителата (от отрицателни до силно положителни – оценка 4), особено за анти-RNP и анти-CCP са тревожни и поставят въпроса за интерпретация на такива резултати при пациент. Не е ли уместно да се направи опит за оценка на различните китове, използвани за определяне на даден показател?
- Критериите за оценка (score) на автоантителата би следвало да се унифицират, което ще увеличи възможността за постигане на консенсус при използване на различни китове с различни референтни граници. Това е от значение и за клиничното интерпретиране на резултатите, особено при проследяване на пациентите.
- „Виртуален“ ВОК – включване схема на ВОК с резултати на пациенти за интерпретация както от аналитична, така и от клинична гледна точка.

Отношение по поставените за обсъждане въпроси взеха проф. Алтънкова, акад. Петрунов, проф. Наумова, проф. Балева, д-р Тодорова, доц. Славов.

По отношение на китовете бе посочено, че основните проблеми са някои структурни разлики в антигените при определяне на едни и същи антители, напр. анти-ССР (д-р Тодорова), както и проблеми с отделните слотове на една и съща фирма, напр. по-лошо качество при голяма поръчка (доц. Славов). Проф. Балева предложи всяка лаборатория да дава информация с какви реактиви работи особено за RNP, Sm, ССР.

Акад. Петрунов повдигна въпроса за целесъобразността от определянето на общия ИгЕ в схема 1, като акцентира, че специфичните ИгЕ са по-важни. Проф. Наумова се аргументира, че показателят трябва да се задържи предвид важноста на общия ИгЕ за имунолозите в диагностиката на имунните дефицити, напр. определяне на хипер ИгЕ синдром. Проф. Алтънкова подчерта, че трябва да вземем под внимание факта, че имуноглобулините са обект на ВОК и в клинична лаборатория.

В резултат на дискусиите се прие:

- Да се предоставя заедно с резултатите от ВОК детайлна информация за използваните китове.
- Общият ИгЕ да остане като показател в схема 1 на ВОК по имунология.

Премина се към втората тематика на конференцията – въпроси, свързани с определянето на ANA, възникнали по време на Първата работна среща за стандартизиране на ANA флуоресцентни образи (14.06.2017, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, София). Заседанието се ръководеше от доц. Кюркчиев, който постави за обсъждане следните точки:

1. Титър 1:80 или 1:160 да бъде приет за cut-off?
2. Да се приеме ли ICAP класификацията в нашата работа?
3. До каква степен типът светения и евентуалните им съответстващи антигени да бъдат описвани и коментирани с клиницистите?
4. Да се уточни и синхронизира използването на: клетъчен субстрат и тип конюгат (поли- или моноспецифичен)?

Дискусията се фокусира основно върху cut-off на титъра за определяне на ANA – 1:80 или 1:160. Проф. Мурджева и доц. Кюркчиев направиха предложение cut-off 1:160 да бъде при пациенти без данни за аутоимунно заболяване. При данни за аутоимунно заболяване той да се интерпретира динамично на базата на информацията от клиничните данни и други тестове.

Проф. Балева изказа мнение, че трябва да се направят по-широки изследвания и в рамките на 1 година да вземем такова решение. Акад. Петрунов подчерта, че това е сериозно популационно проучване, изисква много ресурси – както материални, така и човешки. Проф. Мурджева също смята, че е много хубаво, но е трудно да се направи такова мащабно проучване. Техният екип има публикации за ANA при различни пациенти. При титър 1:40 ANA се установяват в 16% от здравите, а при 1:80 и 1:160 процентът пада на 5%. Базирайки се на своя опит, предлага за cut-off на титрите да се приеме предложението им с доц.

Кюркчиев. Проф. Халачева намира за смущаващо да приемем различен cut-off при здрави и болни и счита, че трябва да приемем един титър. За приемане на предложението според проф. Алтънкова е важно уточняването на периода на проследяване на пациента. Изказано бе и становище за „сива зона“ 1:160 (доц. Манолова). Проф. Наумова подкрепи определянето на „сива зона“ с аргумента, че пациентите често не могат да се проследят от имунолога, който да интерпретира резултата. Д-р Тодорова подчерта, че целта не е да се постави диагноза чрез cut-off. Важна е грижата за пациента. Повишаването на cut-off би подобрило лечението на пациента, тъй като ще се изключат практически здрави пациенти с нисък титър на ANA.

Обсъди се и въпросът дали се приема ICAP. Доц. Кюркчиев има резерв с аргумента дали типът светене ще бъде приеман на доверие, дали да се пускат допълнителни тестове и дали няма да се подбие репутацията на лабораториите, ако не се открият съответните на светенето антитела. Акад. Петрунов предложи всяка лаборатория да реши за себе си в зависимост от подготовката на кадрите.

Повдигнат бе и въпросът за цитоплазменото светене – как да се описва при даване на резултата за ANA. Д-р Тодорова предложи да се вземе предвид становището на ICAP. Такъв вид светене се дава като ANA (-) цитоплазмено светене и се препоръчва определяне на съответните антитела. Според проф. Алтънкова това трябва да се включи в имунологичния стандарт.

В резултат на дискусиите се прие:

1. Предложението 1:160 да бъде аналитичен cut-off, а после да има динамична интерпретация при установяване на автоимунно заболяване.

2. Конюгатът при ИИФ за ANA да бъде ИгГ или поликлонален според нуждите на лабораторията. Може да се използва и друг субстрат освен HEp-2 клетки.

3. Самостоятелното цитоплазмено светене да се обозначи като ANA (-) цитоплазмено светене (според ICAP).

4. По въпроса какъв да бъде скрининг методът за ANA – имуноензимен или ИИФ, се прие да е ИИФ.

Доц. Кюркчиев оповести и предложението на Лабораторията по клинична имунология към УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ за участие в Програмата на БАКИ със скрининг на ANA на здрави хора, първа линия родство на пациенти с автоимунни заболявания (системен лупус, синдром на Съогрен и системна склероза).

ПРОГРАМА

за дейността на сдружение „Българска асоциацията по клинична имунология“ през 2018 година

1. Организационна дейност

1.1. Провеждане на заседание на УС на 3 месеца, а при необходимост по-често.

1.2. WEB страница на БАКИ

- Попълване на подразделите в новата WEB страница.
- Създаване на версия на английски език.
- Отразяване на дейността на БАКИ, в т.ч. информация за национални и международни форуми в областта на имунологията, трансплантологията, печатни издания и други новини.
- Публикуване на информация, насочена към младите специалисти, желаещи да специализират и да придобият специалност в България, както и информация за награди и стипендии за участие в национални и международни форуми.
- Ежедневно проверяване на електронната поща.

1.3. Набиране на нови членове, включително и от други специалности.

2. Публикационна дейност

- Издаване на годишник, 12-и брой, на Сдружението с информация за проведените курсове и конференции през 2018 година.

3. ВОК:

- Продължаване на схемите:

Схема 1 за определяне на имуноглобулини (Г, А, М, Е), С3 и С4 фракции на комплемента, СРП – 2 цикъла с по 3 проби;

Схеми 2А (АНА и анти-ДНК антитела), *2Б* (ЕНА антитела); *2В* (АНЦА), *2Г* – антикардиолипинови и β 2-*GP* антитела; *2Д-ССР*, *РФ-1* цикъл с 3 проби от INSTANT

Схема 3 – определяне на HLA-B27 – 1 цикъл с 5 проби;

Схема 4 – определяне на левкоцитни популации с флоуцитометрия;

Схема 5 – IGRA – пилотна схема.

4. Провеждане на мероприятия:

- Честване на **Международния ден на имунологията**.
- Отбелязване на **седмицата на ПИД**, 22–29 април 2018 г., по места с различни прояви.
- **Експертна среща между педиатри и имунолози** – 16–17 юни 2018, Почивна база на МУ – Пловдив в Цигов чарк.

- **Лятно училище за ПИД пациенти** съвместно с МУ – Пловдив и Джефри Модел Център – България, Почивна база на МУ – Пловдив в Цигов чарк, 15–16 юни 2018
- **Пети Национален конгрес по имунология** – 23–25 ноември 2018 г.
- **Трета тематична среща „Имунология и хранене“.**
- **Клинико-диагностични работни срещи по определена патология.**

5. Продължаване на работата по минипроектите в рамките на Националната профилактична програма под надслов „Имунология за по-добро здраве“.

Председател:
/проф. Е. Наумова/

Членове: 1.....
/акад. Б. Петрунов /

2.....
/проф. д-р М. Балева/

3.....
/проф. д-р И. Алтънкова/

5.....
/доц. д-р П. Петрова /

DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE OF THE TITER OF ANTINUCLEAR ANTIBODIES

*Marta Baleva, Spaska Lesichkova, Nevena Gesheva,
Nelia Kojuharova, Mariana Dimitrova, Anastasia Mihailova,
Elisaveta Naumova*

*Department of Clinical Immunology with Stem Cell Bank,
Univeristy Hospital Alexandrovska, Sofia*

RESUME

The diagnostic value of the determination of ANA in different diseases has been studied. Authors note the significance of ANA in systemic lupus and scleroderma. They discuss the problems in the interpretation of the high ANA titers in other autoimmune disorders as in diseases without autoimmune pathogenesis and healthy. They show the question about the connection between determination of ANA with indirect immunofluorescent test on HEp-2 cells and new tests for recognition of different antibodies to nuclear antigens.

Keywords: ANA titer, autoimmune diseases.

Correspondence: prof. Marta Baleva, Department of Clinical Immunology, University Hospital Alexandrovska, Sofia, 1. G.Sofiski str. e-mail: marta.baleva@gmail.com

In 1948 *M.M. Hargraves et al.* [1] discovered a new type of cells in the bone marrow of patients with systemic lupus erythematosus and named them LE cells – mature polymorphonuclear leukocytes that had fagocyted free nuclear material from other white blood cells. This discovery has lead to many studies and eventually to the discovery of the antinuclear antibodies (ANA) and a wide range of their subtypes. Before the development of the indirect immunofluorescent (IIF) methods, LE cells were the only instrument for the immunological confirmation of lupus. Sixty years ago – in 1957, two groups of authors described serum factors responsible for the arising of LE cells: *E.J. Holborow et al.* [2] described „a serum factor in LE sera with affinity for tissue nuclei“ using an IIF technique on rat liver, and *G. J. Friou* used an immunofluorescent method on calf thymus [3], and in 1958 the second group named this antibody „lupus globulin factor“ [4, 5]. In 1975 the HEp-2 tumor-cell line was introduced as a plate for the detection of the described antibody. This cell line was isolated back in 1955 by *A.E. Moore et al.* [7]. HEp-2 cells have hundreds, maybe even thousands, of possible autoantigens [8] and represent the ideal substrate for the determination of ANA. The use of this line has lead to a new understanding of the diagnosis of autoimmune rheumatic diseases. Several important questions arouse with the use of HEp-2: 1. The threshold titer discriminating between positive and negative results usually is 1:80. Can this value be higher? 2. What is the positive predictive value of this test? 3. What is the negative predictive value of this test? 4. What is the

connection between the results of this test and the determination of antibodies against other nuclear antigens? 5. Is the IIF method comparable with the newer methods, such as the multiplex analysis and the automated ANA tests?

The aim of our study was to evaluate the diagnostic significance of the ANA titer of 1:160 when determined with HEp-2 IIF. The reason to undertake this study were the large number of patients' and physicians' inquiries whether in ANA titer 1:160 the patient does have an autoimmune disease and whether treatment is required.

MATERIALS AND METHODS

Overall 283 consecutive patients who were investigated in the Department of Clinical Immunology for the period 01.01.17-31.03.17 were included in this study. This cohort represented a heterogenous population referred to our department by different specialists with the following clinical diagnoses: systemic lupus erythematosus (SLE), frequent infections, including with primary immunodeficiencies (PID), juvenile rheumatoid arthritis (JRA), glomerulonephritis (GN), cystitis and chronic renal failure (CRF), dermatoses (pemphigus, angioneurotic edema, erythema nodosum, contact dermatitis), other autoimmune diseases – rheumatoid arthritis (RA), Raynaud's syndrome, scleroderma (SD), dermatomyositis / polymyositis (DM/PM), Henoch – Schoenlein vasculitis (H-S), Wegener's granulomatosis (WG) and other vasculitis, Hashimoto's thyroiditis, autoimmune hepatitis, Crohn's disease, iridocyclitis, thrombocytopenia, antiphospholipid syndrome (APS), and other diseases.

ANA were determined using ANA HEp-2 kit (BioSystems).

RESULTS

Figure 1 shows the distribution (%) of ANA titer in our population of 283 patients. ANA were negative in 56/283 (20 %) patients, in titer 1:160 – in 103/283 (36%), 1:320 – in 64/283 (23%), 1:640 – in 39/283 (14%), and 1:1280 – in 21/283 (7%).

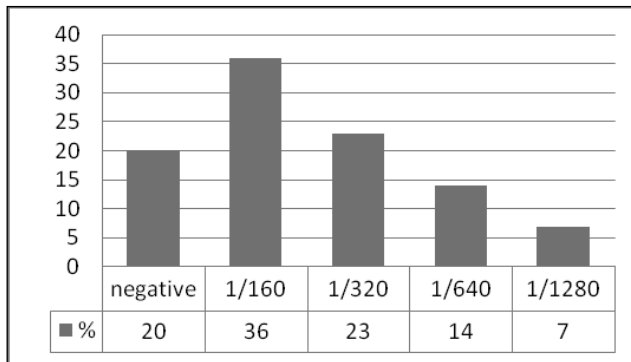


Figure 1. ANA titer in the investigated patients (%)

Therefore, the patients can be divided into the following groups: negative ANA, ANA in titer 1:160, 1:320, 1:640, and 1:1280.

1. *Negative ANA*

The distribution of ANA-negative patients according to the underlying diagnosis is shown on figure 2. Negative ANA had patients with: suspected SLE – 11%, JRA – 23%, kidney diseases – glomerulonephritis (GN) and nephrotic syndrome (NS) – 21%, frequent infections – (11%), and other diseases (34%).

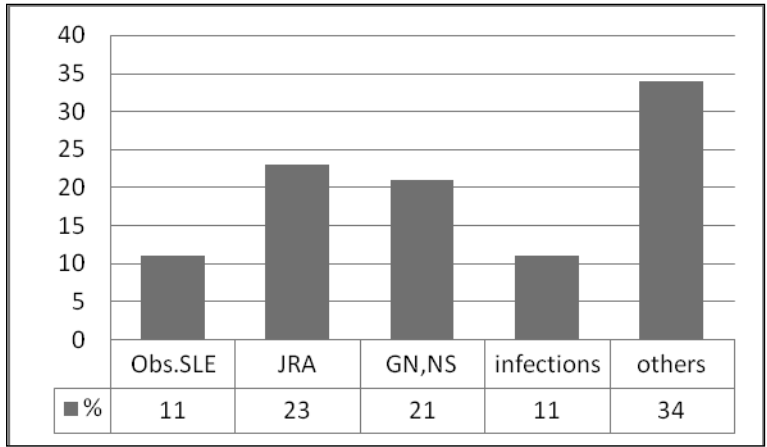


Figure 2. Distribution of ANA-negative patients according to the underlying disease (%)

2. *ANA 1:160*

This group comprised of overall 103/283 patients (36%) with the following underlying diseases: autoimmune diseases – 53%, GN, cystitis and CRF – 17%, frequent infections (including 3 patients with PID) – 16%, gastro-intestinal diseases – 4%, dermatoses – 4%, and other diseases – 6%. The distribution of this group according to the underlying disease (%) in presented on Figure 3.

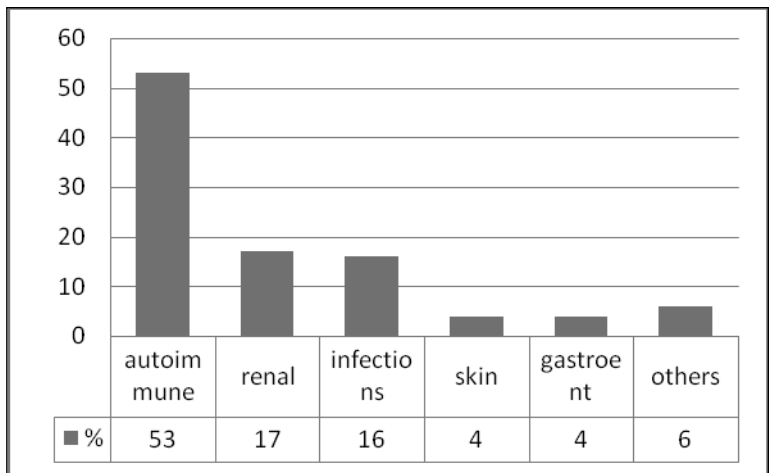


Figure 3. Distribution of patients with ANA 1:160 according to the underlying disease (%)

3. ANA 1:320

This group included 64/283 болни (23%). Their distribution according to the underlying disease is presented on Figure 4: 44 patients with autoimmune diseases (68%); patients with kidney diseases – 16%; and with other diseases – 16% .

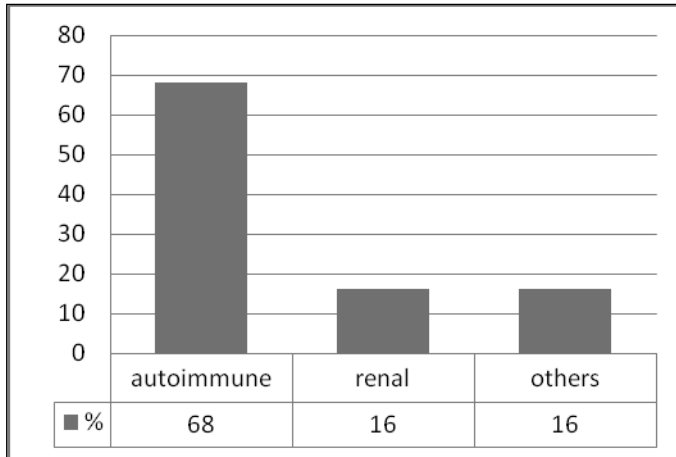


Figure 4. Distribution of patients with ANA 1:320 according to the underlying disease (%)

4. ANA 1:640

This group consisted of 39/283 болни (14%): 33 with autoimmune diseases (85%) – 22 of them with SLE, 3 with cutaneous lupus, 1 with RA, 4 with JRA, 1 with scleroderma, 1 with autoimmune thrombocytopenia, and 1 with vasculitis; 6 with other diseases (15%). The distribution of these patients according to the underlying diseases is shown on Figure 5.

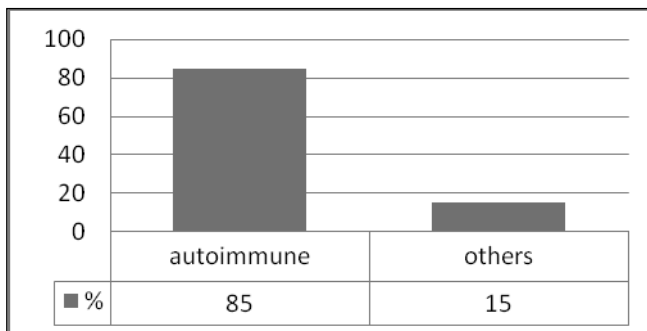


Figure 5. Distribution of patients with ANA 1:640 according to the underlying disease (%)

5. ANA 1:1280

This group comprises of 21/283 patients (7%): 17 with autoimmune diseases (81%) – 12 with lupus, 3 with JRA, 1 with polymyositis, 1 with idiopathic thrombocytopenia; 4 patients had other diseases – atopic dermatitis, cirrhosis, GN, CRF. The distribution of these patients according to the underlying disease is shown on Figure 6.

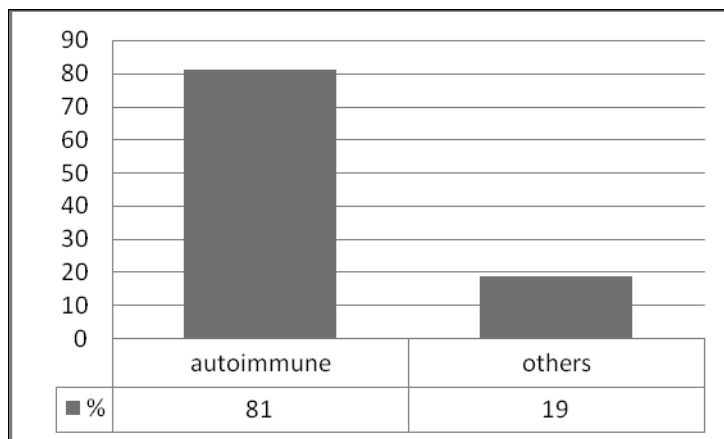


Figure 6. Distribution of patients with ANA 1:1280 according to the underlying disease (%)

DISCUSSION

ANA as a diagnostic criterion

The determination of ANA is one of the most frequently used tests in the clinical immunology in general. **ANA are a diagnostic criterion for several autoimmune rheumatic diseases, but on the other hand these autoantibodies are merely a component in the complex clinical-laboratory characteristics of these diseases.** Table 1 shows the diseases that are known to be associated with positive ANA [9]. Many recommendations have been published concerning the technique and the standardization of ANA testing, especially using IIF on HEp-2 cell line.

Table 1. Diseases and conditions with positive ANA

Diseases and conditions	% (+) ANA
Diseases in which ANA testing is crucial	
Systemic lupus erythematosus	95–100%
Scleroderma	60–80%
Diseases in which ANA testing is useful	
Sjogren's syndrome	40–70%
Dermatomyositis / polimusositis	30–80%
Diseases in which ANA testing is useful for monitoring and prognosis	

Juvenile oligoarthritis with uveitis	20–50%
Raynaud's syndrome	20–60%
Diseases in which positive ANA are a diagnostic / classification criterion	
Drug-induced lupus	~ 100%
Autoimmune hepatitis	~ 100%
Mixed connective tissue disease	~ 100%
Diseases and conditions in which ANA are not important for the diagnosis	
Rheumatoid arthritis	30–50%
Multiple sclerosis	25%
Idiopathic thrombocytopenic purpura	10–30%
Autoimmune thyroid diseases	30–50%
Discoid lupus	5–25%
Infectious diseases	Different %
Malignancies	Different %
Silicone breast implants	15–25%
Fibromyalgia	15–25%
Relatives of patients with SLE or scleroderma	5–25%

Autoimmune diseases and ANA

Table 1 reveals that in two diseases – systemic lupus and scleroderma – the determination of ANA is crucial as these autoantibodies represent a classification criterion (accepted in 1982 for SLE [10] and in 1980 for scleroderma [11]). The sensitivity and the specificity of ANA testing for SLE are respectively 96% and 96% [10], and for scleroderma – и 97% and 98% [11]. In 2013 the joint initiative of the American College of Rheumatology (ACR) and the European League against Rheumatism (EULAR) confirmed the importance of anti-centromere antibodies or of “centromere-pattern on ANA testing”, and the anti-topoisomerase I (anti – Scl-70) and anti – RNA polymerase III antibodies, determined in accordance with local laboratory standards for the diagnosis of scleroderma [12]. According to the 2012 Classification criteria of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC) the determination of ANA has 33,6% sensitivity and 96,8% specificity [13].

In our study, 72/283 patients (25%) were referred for ANA testing for the diagnosis lupus (and in 6 of them this diagnosis was suspected but not definitive, 10 had cutaneous lupus, and in the rest 56 the diagnosis SLE has already been made). In the 6 patients with suspected SLE ANA were negative (8,3%). Low-to-medium ANA titers (1:160 to 1:320) had respectively 15 and 14 patients (including 7 with cutaneous lupus and ANA titer of 1:320) – 40,3%. High ANA titers of 1:640 had 25 patients (including 3 with cutaneous lupus), and of 1:1280 – 12 patients – i.e., 37/72 lupus patients (51,4%) had high ANA titers. The sum of all positive patients (titers 1:160 to 1:1280) shows that 66/72 болни (91,4%) have positive ANA in different

titer. This is in accordance with the well-known idea of the importance of ANA as a diagnostic criterion for SLE [10, 13].

Overall 4 patients had scleroderma – 1 had negative ANA, and 3 patients had positive ANA – 1 in titer 1:160, 1–1:320, 1 – 1:640. Due to the small number of scleroderma patients no definitive conclusions can be drawn. The same applies for the patients with dermatomyositis / polymyositis – 4 patients with ANA 1:160, 1:320 and 1: 1280; and for the patient with Sjogren's syndrome with ANA titer of 1:320, and for the 2 patients with Raynaud's syndrome and positive ANA of 1:160. In our previous study [14] we investigated ANA in 2 groups of patients: I – with Raynauds's syndrome, and II – with Raynaud's phenomenon as a part of the clinical manifestations of systemic lupus or scleroderma. In group I ANA were negative in 70% of the cases, whereas 80% of the second group had medium titers of positive ANA.

All 8 RA patients had low-to-medium positive ANA: 4 in titers 1:160, and 4 – 1:320. As shown in table 1, the determination of ANA is not crucial for the diagnosis of RA, but ANA can be low-positive in 30–50% of the patients. In RA and osteoarthritis patients the determination of ANA does not support the diagnosis and therefore it is not recommended [6]. Moreover, ANA are not recommended for the evaluation of fatigue, back pain or other musculo-skeletal pains, except for the cases when systemic connective tissue diseases is suspected based on the existence of other symptoms and signs.

The patients with JRA are of special interest. This subgroup includes 44 patients with the following results: 13 with negative ANA (30%), 24 with low-to-medium positive ANA (54%), and 7 (16%) with high ANA titers of 1:640 and 1:1280. The interpretation of the results of ANA testing in children sometimes is very difficult, because ANA can be positive in both healthy children and in children in non-autoimmune diseases [15, 16]. P.M.G. Deane et al. [16] investigated 500 children admitted to Pediatrics and found positive ANA in 113 and 31 of them (27%) had no autoimmune disease at the admission and during the 37-months follow-up. The major clinical signs and symptoms at the admission were musculo-skeletal pains and hypermobility, and the mean ANA titer was 1:160. In 25 of the investigated children the symptoms subsided by the end of the follow-up, in 5 the authors observed marked improvement and 1 child developed autoimmune hepatitis. According to the authors, the determination of ANA in children with musculo-skeletal and dermatological symptoms without clinical data for autoimmune disease does not aid the diagnosis but increases the cost of the investigation process. In the lack of autoimmune constellation, the prognosis in ANA-positive children is generally favorable.

The studies performed by J.L. McGhee et al. [15] showed that in patients with JRA ANA titers could vary between 1:80 and 1:640 that are lower than the titers in children with SLE and in JRA these autoantibodies have no diagnostic value. According to the same authors, ANA titers \geq 1:1080 raise strong suspicion for SLE, and the titers \leq 1:320, especially in children below 13 years, practically exclude this diagnosis. The ANA titers cannot differentiate the children with JRA from these with other musculo-skeletal diseases [15]. Overall 84% of our patients with JRA have ANA titers \leq 1:320 and only 16% ANA 1:640 or 1:1280.

According to P.N. Malleson et al. [17], ANA titers of 1:160 or more are so frequent in little children, that these have low or no diagnostic value. Thirteen years after this study the same authors [18] raised the following questions: If ANA are positive in a child with fever and rash, does the child have lupus; or do they mean JRA in a child with swollen knee; or in a child with JRA do they predict uveitis? The authors suggested that ANA testing cannot give satisfactory answers to these questions and that ANA testing should be limited to the diagnosis of SLE, mixed connective tissue disease (MCTD) and similar systemic diseases, and titers below 1:640 should be ignored if no other systemic signs are present and in the cases when the child has no systemic disease like SLE. Table 1 shows that 20-50% of the JRA patients are ANA-positive. The investigation of these autoantibodies in JRA could be useful for disease monitoring and prognosis. A. Kavanaugh et al. [9] suggested that ANA testing is not useful for the diagnosis of JRA but the positive test could predict the development of uveitis.

Overall 11 of our patients had vasculitis: 2 were ANA negative (1 with H-S, 1 with undifferentiated vasculitis); 5 had ANA of 1:160 (2 with WG, 3 with undifferentiated vasculitis); 4 had ANA of 1:320 (2 – with H-S, 1 – with Churg Strauss' vasculitis, 1 with undifferentiated vasculitis); 1 had ANA of 1:640 and undifferentiated vasculitis. In patients with systemic vasculitis ANA are rarely positive and could be an epiphenomenon due to interference with high-titer ANCA (especially pANCA) [19]. Yet, the determination of ANCA is crucial in this group.

In our patients with other autoimmune diseases ANA testing revealed the following results: *negative ANA* – 1 patients with Crohn's disease; *ANA 1:160* – 3 with Hashimoto's thyroiditis, 1 with APS, 4 with autoimmune anemia + thrombocytopenia, 1 with autoimmune hepatitis; *ANA 1:320* – 1 with type 1 diabetes, 1 with Hashimoto's thyroiditis, 1 with autoimmune thrombocytopenia, 1 with agranulocytosis, 2 with hepatitis; *ANA 1:640* – 1 with autoimmune thrombocytopenia; *ANA 1:1280* – 1 with idiopathic thrombocytopenia.

For each of the stated diseases there are literature data for the presence of positive ANA in different titers. According to the literature [20] 35% of the patients with autoimmune thyroid diseases have positive ANA. The percentage of ANA-positive patients with liver diseases is shown in table 2 [21]. Still, some authors do not recommend the investigation of ANA in RA, primary biliary cirrhosis, autoimmune thrombocytopenia and autoimmune thyroiditis [22].

Table 2. ANA in patients with liver diseases

Disease	ANA
Chronic active hepatitis	60%
Chronic persistent hepatitis	15–30%
Acute viral hepatitis	20%
Primary biliary cirrhosis	5%
Autoimmune hepatitis	95%

Other diseases

We investigated overall 23 patients with different infections: 6 were ANA –negative, 16 (3 of them with PID) had ANA of 1:160, 1 patient with genital herpes had ANA of 1:320. Table 1 shows that ANA can be positive in different percentage of patients with infections.

We investigated ANA in 44 patients with renal diseases: 12 were ANA-negative, 18 had ANA 1:160, 10 – ANA of 1:320, 3 – 1:640, 1 – 1:1280, i.e., very high ANA titers (1:640 and 1:1280) had overall 4/44 (9%). These 4 patients require further investigation and follow-up of ANA and their specificity in order to exclude lupus nephritis.

We also detected negative ANA in patients with hyperbilirubinemia, holangio-hepatitis, erythema nodosum, epilepsy, myocarditis, pericarditis, subileus, perioral dermatitis, where negative ANA were an expected result. Also an expected result were ANA of 1:160 in patients with gastro-intestinal diseases (toxic hepatitis and steatosis), dermatoses (pemphigus, angioneurotic edema, erythema nodosum), in whom these autoantibodies have little or no diagnostic significance.

Several patients had ANA of 1:320 at the background of angioneurotic edema (1), iridocyclitis (7), chronic urticaria (1). High-positive ANA of 1:640 had 3 patients with dermatological conditions (alopecia, pemphigus, aphthosis), and of 1:1280 – 2 patients (with atopic dermatitis and with cirrhosis). In these patients the presence of medium-to-high positive ANA is not always associated with underlying autoimmune disease. On the other hand, ANA can be found in a wide variety of diseases and conditions other than connective tissue diseases and these autoantibodies may have neither diagnostic nor prognostic value in such cases [6].

ANA titer in healthy individuals and ANA reference range

The detection of positive ANA in healthy individuals suggests that the autoantibodies are an important part of the physiological immune response [23]. The prevalence of positive ANA differs depending on the gender and the age: in elderly patients (especially in women over 65) this prevalence is higher [24, 25]. Using HEp-2 line between 20% and 31.7% [9,24] of the healthy individuals have ANA of 1:40, 13.3% – of 1:80, 5% – of 1:160 [9, 24], and 9,6% – in titers \geq 1:160 [26], 3% \geq 1:320 [9], 17,8% – 1:640 [27], 7,6% – 1:1280 [27], 2,5% – 1:2560 – [27], 5,9% – 1:5120 [27]. The follow-up of 40 healthy individuals with positive ANA for 3,5 – 5 years has shown that none of these individuals developed autoimmune disease despite the fact that 29 still had high ANA titers by the end of the follow-up [27].

ANA sensitivity and specificity

Different authors have published varying data on the sensitivity and specificity of ANA in different diseases (Table 3).

Table 3. ANA specificity and sensitivity [according to 6, 27, 28]

Disease	Specificity	Sensitivity
SLE	93%	57%
Sjogren's syndrome	48%	52%
Scleroderma	85%	54%
PM/DM	61%	63%
Raynaud's syndrome	64%	41%

ANA titer of 1:160

The investigation of ANA on cell substrates is believed to be the “gold standard” in the diagnosis of the systemic autoimmune rheumatic diseases [8,29,30]. Many laboratories have accepted ANA titers of 1:160 as significant in patients with connective tissue diseases [6]. In accordance with the literature data, many practicing physicians consider higher ANA titers to be more significant for the diagnosis. On the other hand, a lot of studies have shown that below 1:80 or 1:160 ANA have little significance as diagnostic marker or for the evaluation of disease activity [29]. According to many authors, the test can be compromised due to the lack of standardization or due to the presence of “false-positive results” – i.e., ANA are not a reference method and could lead to incorrect diagnosis, unnecessary worries for the patient, and consults and expenses for further investigations [29]. “False-negative results” also represent a serious problem because they could also lead to incorrect diagnosis or to the false relief that there is no autoimmune disease when a serious autoimmune rheumatic disorder is present [29].

Tables 1–6 and the literature data concerning the prevalence of ANA in healthy individuals combined with the low prevalence of SLE (40–50 per 100 000) and other connective tissue diseases suggest that not all individuals with positive ANA have systemic autoimmune rheumatic disease. The use of higher titers ($\geq 1:640$) generally is associated with higher diagnostic specificity but with lower diagnostic sensitivity [9]. On the other hand, as ANA titers of 1:160 have insufficient sensitivity, they cannot rule out SLE [24]. According to many authors, ANA of 1:160 is more of a screening than of a diagnostic test [6]. Others raise the question “Which scenario is worse – false-positive or false-negative ANA?” [29] and “What would the rheumatologists prefer – ANA test with high sensitivity and low specificity for systemic autoimmune diseases or vice versa?” [29].

In many cases, as in our study, the investigated patients could be referred for ANA testing despite the low probability for systemic autoimmune disease, or the test could be automatically ordered. In such a high prevalence of ANA among the healthy population, it could become a serious problem, especially if misused, if inappropriate or if false-positive. The misinterpretation of the positive results, especially in lower titers, could lead to unnecessary complementary tests, stress for the patient, misdiagnosis and inappropriate treatment [27,31]. S. Narain et al. [31] present cases of SLE diagnosed mainly on high-titer ANA with a 3-years corticosteroid treatment by the end of which the patients had neither SLE, nor ANA. One should not forget

that the misuse of corticosteroids in such cases could lead to serious complications, such as osteoporosis, catarrhact, diabetes, infections, osteonecroses, hypertension, and unnecessary diagnostic and therapeutic expenses [32].

Positive and negative predictive diagnostic value of ANA

The positive predictive value (PPV) of ANA titers has been investigated by many authors. A.M. Abeles and M. Abeles [33] have studied patients with different diagnoses made by their general practitioners, internists, ophthalmologists, endocrinologists, orthopedical surgeons, etc.:

Titer	PPV (rheumatic diseases)	PPV + ANA (SLE)
≥ 1:40	8,8%	2,2%
≥ 1:80	10%	2%
≥ 1:160	11,6%	2,9%
≥ 1:320	18,9%	4%
≥ 1:640	26,9%	6%
≥ 1:1280	38,9%	5,6%
≥ 1:2560	46,2%	N/A
≥ 1:5120	57,1%	N/A
No titer	0	0

According to H.A. Mariz et al. [27] the possibility to differentiate between the healthy persons and those having autoimmune diseases vary depending on the cut-off of the test. In dilutions 1:80 the sensitivity of ANA testing on HEp-2 is 90,2% and the specificity is 87,1%, with high negative predictive value (NPV) of 98,1% for the presence of disease. In dilution 1:160 (recommended by the ANA Subcommittee of the International Union of Immunological Societies Standardization Committee [24]) the sensitivity is 83,7%, the specificity – 93%. In dilution 1:1280 the sensitivity is 65,4%, and the specificity – 97,9%, NPV – 94,6%, PPV – 84,9% PPV. In 1:5120 cut-off, the sensitivity is 44,4%, the specificity – 99,2%, and the PPV – 90,6%.

The increase in ANA titers is associated with increase of PPV for both autoimmune rheumatic disease and SLE. The titer of 1:160 (that according to the majority of authors is the first positive titer) has low PPV. Overall 36% of our patients had ANA 1:160.

J. Damoiseaux et al. [34] have cited other authors that suggest that positive ANA could precede the diagnosis of SLE by 2–2,5 years, of scleroderma – by 3 years, and of Sjogren's syndrome – by 3–7,5 years. Others [35] have found that this period could be even longer, up to 10 years.

In response to the problem with the diagnostic significance of ANA titers, many authors suggest to create a local algorithm for the determination of ANA, to educate the staff, to perform local validation of the platforms, to clarify the significance of each titer and type of fluorescence in different diseases and disease stages. Of special interest is the differentiation of outpatients' data from the results of hospitalized

patients with proper evaluation of the automated methods that could respond to the insufficiencies of the manual techniques [30].

In 2013, a working group formed by several organizations (IUIS/WHO/AF/CDC)* formulated 25 recommendations for the standardization of ANA as a diagnostic method [30], including the evaluation of ANA titers for screening purposes in every local laboratory – the titer should be above the 95-th percentile for healthy persons. In general, ANA titer of 1:160 on HEp-2 or HEp-2000 could be used for screening for autoimmune rheumatic diseases. One major shortcoming of the method is the need for qualified personnel for the reading of the test results. This requires educational programs for aimed at proper reading and interpretation of ANA results [30]. The tests based on the use of a mixture of nuclear antigens should not be referred to as „ANA test“ or „ANA screen“.

Why ANA are so frequently found?

The question why ANA test is so frequently found positive in individuals without underlying autoimmune diseases has been widely discussed. One explanation is the immune tolerance. Another suggestion is that ANA might have other functions besides autoimmunity that remain unknown by now.

Functions of ANA and why they are so frequent in the clinical practice:

- ANA tests determine low-avidity antibodies [36]. As many nuclear antigens have certain molecular charge, ANA could cross-react with normal antibodies without aberrant expression [37]. This is especially valid for the natural antibodies of IgM subclass that have multiple functions, including cleansing of viral antigens and remnants of apoptotic cells.
- Another explanation for the high percentage of positive ANA in the normal population is the presence of significant immunoregulatory disturbances and of high number of people in “risk situations” when the appearance of a trigger factor could lead to the development of autoimmune disease. Moreover, a wide range of genetic polymorphisms could predispose to the development of autoimmune rheumatic disease [38]. These polymorphisms are probably a result of evolutionary selection aimed at giving protection and inducing immune response in different populations of immune cells. When limited or in suitable combinations, these polymorphisms could lead to the development of serological changes without clinical manifestations. ANA specificity in healthy persons remains unclear and this fact makes the evaluation of the underlying mechanisms of their appearance very difficult.
- While the majority of ANA-positive healthy persons never develop an autoimmune disease, other patients in the pre-immune stage of collagen diseases have positive ANA that precede the full-blown clinical manifestation of their condition [35, 36]. Yet, the differentiation between “normal” and “pathogenic” ANA remains very difficult.
- ANA have been found positive in tuberculosis, malaria, leprosy but their

specificity is unclear and seems to differ from that in the known autoimmune diseases [39,40].

- The induction of ANA in viral infections (i.e., in Epstein-Barr virus) can be observed in patients with high risk for the development of lupus, because in such cases the viral infection could promote autoreactivity as a cross-reactivity to the viral antigens. In such cases the virus-induced antibodies could be referred to as classical ANA [41]. In such cases, the development of lupus is secondary to the expression of cross-reacting autoantibodies and possible immune reactivity. This means that ANA are not a single population of antibodies, but can have different characteristics and expression in health and in disease (pathological antibodies).
- Many antibodies have been linked to certain diseases but the exact mechanisms of organ damage remain unclear [36]. The target antigens of ANA are highly conservative and wide spread and should be shielded from autoantibody interactions. The pathogenic properties of these autoantibodies could be detected using immunization of serum transfer or monoclonal antibodies to animal models [36].
- ANA can have protective role. This explains the discrepancies between serological and clinical markers – i.e., some seropositive but clinically negative patients may be protected from certain disease manifestations, e.g., renal involvement.
- D.S. Pisetsky [36] has proposed the following classification of ANA: **non-pathogenic** (benign, indifferent, innocuous, found in a wide range of individuals and not associated with clinically manifested disease); **pathological** (found exclusively in autoimmune diseases or in the pre-autoimmune stages when still no disease manifestations are present; pathological antibodies can be **pathogenic** – cause disease symptoms, or non-pathogenic); **pathogenic** (causing disease symptoms via different mechanisms – immune complex deposition, cytokine stimulation, receptor binding); **nephritogenic** (ANA causing nephritis); **interferonogenic** (ANA inducing cytokine production via interferon stimulation by PDCs and immune complexes); **protective** (preventing the development of disease via inhibition of the immunological activity of nuclear antigens, stimulation of nuclear antigen cleansing via non-phlogistic pathways or via blocking of the formation of pathogenic immune complexes; such autoantibodies may be found in viral infections).

According to this classification, the serology of autoimmune rheumatic diseases is far more complex than assumed so far and the clinical manifestations can be far more diverse than the serological. If we assume that certain ANA can have protective role, this classification gives new insight in the evaluation of the inter-relations between serology and clinical manifestations, including the possibilities for the development of a new class of biological agents affecting autoreactivity.

In conclusion: Initially the results of ANA testing were used and interpreted by rheumatologists and clinical immunologists. ANA were found to be positive in a

wide range of other diseases, different from autoimmune rheumatic disorders, and therefore ANA tests were ordered by other specialists, including general practitioners, dermatologists, nephrologists, gastroenterologists, oncologists, hematologists, obstetricians, and cardiologists. This transition has had crucial impact upon the diagnostic significance of ANA testing, especially in the post-analytical stage, because IIF ANA screening has limited specificity and is highly influenced by the pre-analytical probability for the presence of certain autoimmune disease [42].

Despite the development of our knowledge on ANA and their diagnostic significance, many questions concerning the terminology and nomenclature, standardization, their diagnostic role, the delicate interactions among the clinical and laboratory personnel, the interpretation of the results, the development of algorithms and the economical base of certain methods remain unanswered. An important factor is the growing number of referrals for ANA testing that requires the use of faster and preferably automated tests for ANA testing. And last, but not least, the digitalization of IIF methods remains to be discussed because it is expected to reduce the interpretation variations associated with type and intensity of fluorescence [43]. These new aspects of ANA testing will probably require new algorithms and criteria for the diagnosis of autoimmune diseases, new educational programs, new criteria for quality control and reimbursement. An interesting aspect of this problem is the multiplex analysis that still leaves several unanswered questions: the detection of rare antibodies, qualitative evaluation of the results, interpretation. These tests are known to detect ANA years before the development of clinical symptoms, even before the currently used IIF on HEp-2 [44].

IIF on HEp-2 has 50 years history and is very important for the diagnosis of autoimmune rheumatic diseases. This test can detect a large number of antibodies against nuclear antigens but is difficult to perform, time-consuming (due to the need of serial dilutions) and requires visual reading of fluorescence [45]. The test is subjective and sometimes the results are difficult to interpret [46]. Moreover, the wide variety of microscopes, light intensity, magnifications and the HEp-2 cell line carry the risk of test variability [47]. And finally, a major limitation of this method is the lack of specificity, as it may be positive in a wide spectrum of autoimmune diseases, infections, neoplasms, and in healthy persons [30, 48, 49].

The test is difficult to standardize, the reading of the results can be highly subjective and carries the risk for false-positive and false-negative results. It remains unclear whether this test could be the “gold standard”. This depends on the development of new digital technologies for antibody detection [42], the new tendencies for consolidation and unification of laboratory methods, and the local legislation for reimbursement of medical testing.

*International Union of Immunologic Societies/World Health Organization/Arthritis Foundation/Centers for Disease Control and Prevention (IUIS/WHO/AF/CDC) – <http://www.autoab.org>

REFERENCES:

1. Hargraves MM, Richmond H, Morton R: Presentation of two bone marrow elements: the 'tart' cell and the "LE' cell. *Proceedings of the Mayo Clinic*. 1948; 23: 25–28.
2. Holborow EJ, Weir MM, Johnson GD. A serum factor in LE sera with affinity for tissue nuclei. *Br Med J* 1957; 2: 732–734.
3. Friou CJ: Clinical application of lupus serum nucleoprotein reaction using fluorescent antibody technique. *J Clin Invest* 1957; 36: 890–897.
4. Friou GJ, Finch SC, Detre KD. Interaction of nuclei and globulin from lupus erythematosus serum demonstrated with fluorescent antibody. *J Immunol* 1958; 80:324–329.
5. Friou GJ. Clinical Application of a Test for Lupus Globulin-Nucleohistone Interaction Using Fluorescent Antibody *Yale J Biol Med* 1958; 31: 40–47.
6. Kumar Y, Bhatia A, Minz RW. Antinuclear antibodies and their detection methods in diagnosis of connective tissue diseases: a journey revisited. *Diagnostic Pathology* 2009, 4:1 doi:10.1186/1746-1596-4-1
7. Moore AE, Sabachewsky L, Toolan HW. Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells. *Cancer Res* 1955; 15:598–602.
8. Meroni PL, Schur PH. ANA screening: an old test with new recommendations. *Ann Rheum Dis* 2010; 69:1420–1422.
9. Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, et al. Guidelines for Clinical Use of the Antinuclear Antibody Test and Tests for Specific Autoantibodies to Nuclear Antigens. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:71–81.
10. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 1272–1277.
11. Subcommittee for scleroderma criteria of the American rheumatism association diagnostic and therapeutic criteria committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthr Rheum* 1980; 23: 581–590.
12. van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J et al. Classification Criteria for Systemic Sclerosis: An ACR-EULAR Collaborative Initiative. *Arthr Rheum* 2013;65:2737–2747.
13. Petri M, Orbai AM, Alarcón GS, Gordon C, et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthr Rheum* 2012; 64:2677–86.
14. Baleva M, Nikolov K. Antinuclear and anticardiolipin antibodies in patients with Raynaud's syndrome – marker of undifferentiated connective tissue disease? *Rheumatology* 1998; 6 (1): 36–38.
15. McGhee JL, Kickingburd LM, Jarvis JN. Clinical utility of antinuclear antibody tests in children. *BMC Pediatrics* 2004; 4:13. doi: 10.1186/1471-2431-4-13
16. Deane PMG, Liard G, Siegel DM, Baum J. The outcome of children referred to a pediatric rheumatology clinic with a positive antinuclear antibody test but without an autoimmune disease. 1995; 95: 892–895.
17. Malleson PN, Sailer M, Mackinon MJ. Usefulness of antinuclear antibody testing to screen for rheumatic diseases. *Arch Dis Child* 1997; 77: 299–304.
18. Malleson PN, Mackinon MJ, Sailer – Hoeck M, Spencer CH. Review for the generalist: The antinuclear antibody test in children – When to use it and what to do with a positive titer. *Ped Rheumatol* 2010; 8:27. <http://www.ped-rheum.com/content/8/1/27>.

19. Lee SS, Lawton JWM, Chak W. Distinction between antinuclear antibody and p-ANCA. *J Clin Pathol* 1991;44:962–963.
20. Tektonidou MG, Anapliotou M, Vlachoyiannopoulos P, Moutsopoulos HM. Presence of systemic autoimmune disorders in patients with autoimmune thyroid diseases. *Ann Rheum Dis* 2004;63:1159–1161. doi: 10.1136/ard.2004.022624.
21. Baleva M, Altankova I. Clinical significance of the immunological parameters. In: *Clinical laboratory in the clinical medicine. Medinform 2017*; Ed.: Z. Krastev and T. Shipkov, pp 18–48.
22. Mutasim D, Adams BB. A practical guide for serologic evaluation of autoimmune connective tissue diseases. *J Am Acad Dermatol* 2000; 42:159–174.
23. Li Q-Z, Karp DR, Quan J, et al. Risk factors for ANA positivity in healthy persons. *Arthritis Research & Therapy* 2011; 13:R38.
24. Tan EM, Feltkamp TE, Smolen JS, et al. Range of antinuclear antibodies in “healthy” individuals. *Arthritis Rheum* 1997;40:1601–11.
25. De Vlam K, De Keyser G, Verbruggen G, et al. Detection and identification of antinuclear antibodies in the serum of normal blood donors. *Clin Exp Rheumatol* 1993;11:393–397.
26. Hayashi N, Koshiba M, Nishimura K, et al. Prevalence of disease specific antinuclear antibodies in general population: estimates from annual physical examinations of residents of a small town over a 5-year period. *Mod Rheumatol* 2008;18:153–160.
27. Mariz HA, Sato EI, Barbosa SH, et al. Pattern on the antinuclear antibody-HEp-2 test is a critical parameter for discriminating antinuclear antibody-positive healthy individuals and patients with autoimmune rheumatic diseases. *Arthr Rheum* 2011;63:191–200. doi: 10.1002/art.30084.
28. Habash-Bseiso DE, Steven HY, Glurich I, Goldberg JW. Serologic testing in connective tissue diseases. *Clin Med Res* 2005; 3:190–193.
29. Fritzler MJ. The antinuclear antibody test: last or lasting gasp? *Arthritis Rheum* 2011;63:19–22.
30. Agmon-Levin N, Damoiseaux J, Kallenberg C, et al. International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. *Ann Rheum Dis* 2014; 73:17–23.
31. Narain S, Richards HB, Satoh M, et al. Diagnostic accuracy for lupus and other systemic autoimmune diseases in the community setting. *Arch Intern Med* 2004;164:2435–2441.
32. Boumpas DT, Chrousos GP, Wider RL et al. Glucocorticosteroid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. *Ann Intern Med* 1993; 119:1198–1208.
33. Abeles AM, Abeles M. The Clinical Utility of a Positive Antinuclear Antibody Test Result. *Am J Med* 2013; 126:342–348.
34. Damoiseaux J, Andrade LE, Fritzler MJ, Shoenfeld Y. Autoantibodies 2015: From diagnostic biomarkers toward prediction, prognosis and prevention. *Autoimmun Rev* 2015; 14:555–563.
35. Arbruckle MR, McClain MT, Robertone MV et al. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2003; 349:1526–33.
36. Pisetsky DS. Antinuclear antibodies in rheumatic disease: a proposal for function-based classification. *Scand J Immunol* 2012; 76: 223–228.
37. Pisetsky DS. Antinuclear antibodies in healthy people: the tip of autoimmunity iceberg? *Arthr Res Ther* 2011; 13:109.

38. Cho JH, Gregersen PK. Genomics and the multifactorial nature of human autoimmune disease. *N Engl J Med* 2011; 365: 1612–23.
39. Bonfa E, Ilowet R, Scheiberg M, De Souza JM. Comparison between autoantibodies in malaria and leprosy with lupus. *Clin Exp Immunol* 1987; 70:529–37.
40. Adebajo AO, Charles P, Maini RN, Hazleman BL. Autoantibodies in malaria, tuberculosis and hepatitis B in West African population. *Clin Exp Immunol* 1993; 92:73–6.
41. Harley JB, James JA. Epstein-Barr virus infection induces lupus autoimmunity. *Bull NYU Hosp Jt Dis* 2006; 64:45–51.
42. Mahler M, Fritzler MJ. The Clinical Significance of the Dense Fine Speckled Immunofluorescence Pattern on HEp-2 Cells for the Diagnosis of Systemic Autoimmune Diseases. *Clin Dev Immunol* 2012; Article ID 494356, doi:10.1155/2012/494356
43. Hiemann R, Buttner T, Krieger T, et al. Challenges of automated screening and differentiation of non-organ specific autoantibodies on HEp-2 cells. *Autoimmun Rev* 2009;9:17–22.
44. Perez D, Gilburd B, Cabrera-Marante O, et al. Predictive autoimmunity using autoantibodies: screening for anti-nuclear antibodies. *Clin Chem Lab Med* 20017; doi: 10.1515/ccim-2017-0241.
45. Satoh M, Chan EK, Sobel ES, et al. Clinical implication of autoantibodies in patients with systemic rheumatic diseases. *Expert Rev Clin Immunol* 2007;3:721–38.
46. Tan EM. Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): their immunobiology and medicine. *Adv Immunol* 1982;33:167–240.
47. Hiemann R, Buttner T, Krieger T, et al. Challenges of automated screening and differentiation of non-organ specific autoantibodies on HEp-2 cells. *Autoimmun Rev* 2009;9:17–22.
48. Narciso-Schiavon JL, Freire FC, Suarez MM, et al. Antinuclear antibody positivity in patients with chronic hepatitis C: clinically relevant or an epiphenomenon? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009;21:440–6.
49. Satoh M, Chan EK, Ho LA, et al. Prevalence and sociodemographic correlates of antinuclear antibodies in the United States. *Arthr Rheum* 2012; 64:2319–27.

ГОДИШНИК
на БАКИ
2017

Българска
Първо издание

Предпечат МАРИАНА ХРИСТОВА
Коректор СТЕЛА ЗИДАРОВА

Формат 70/100/16
Печатни коли 6,25

© Издателство „ДАЙРЕКТ СЪРВИСИЗ“, 2018

ISSN 1313-47-52