

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

“Согласовано”

Зам. начальника по науке
Главного управления кадровой
политики, учебных заведений и науки

доцент  Н.И. Доста

26.12.2000г.

“Утверждаю”

Первый заместитель министра
здравоохранения Республики
Беларусь

 В.М. Ореховский

26.12.2000г.

Решение № 154-00/11

ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ В ДИАГНОСТИКЕ
РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА

Методические рекомендации

Минск 2000

Учреждение-разработчик: Минский государственный медицинский институт, республиканский ревматологический центр

Авторы документа (группа экспертов):

Сорока Н.Ф. - координатор группы: докт.мед.наук, профессор, главный ревматолог Минздрава РБ, руководитель республиканского ревматологического центра;

Матвейков Г.П. - заслуженный деятель науки РБ, докт. мед. наук, профессор;

Досин Ю.М. - докт. мед.наук, зав.лабораторией коллагенозов ЦНИЛ МГМИ;

Калия Е.С. - канд. мед. наук, старший научный сотрудник лаборатории коллагенозов ЦНИЛ МГМИ;

Дубень С.А.- младший научный сотрудник лаборатории коллагенозов

Рецензенты:

доктор медицинских наук, профессор М.В.Зюзенков; доктор медицинских наук,

профессор А.Э.Макаревич; кандидат медицинских наук Г.М.Костин

Ответственный за выпуск: проректор по научной работе МГМИ, профессор С.Л.Кабак

В настоящих методических рекомендациях представлена клиническая оценка эффективности современных методов лабораторной диагностики ревматоидного артрита. Использован анализ мировой литературы и собственных исследований по данной проблеме.

Методические рекомендации утверждены Министерством здравоохранения Республики Беларусь в качестве официального документа.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
1. Данные клинического анализа крови при ревматоидном артрите	5
2. Биохимические исследования при ревматоидном артрите	9
3. Исследование синовиальной жидкости	12
4. Иммунологические показатели в диагностике ревматоидного артрита	15
4.1. Гуморальное звено иммунной системы	15
4.2. Клеточное звено иммунитета	20
4.3. Иммуногенетические параметры системы HLA	23
5. Гормональные исследования при ревматоидном артрите	23
6. Особенности изменений лабораторных показателей при отдельных формах ревматоидного артрита	25
7. Приложение 1	28
8. Приложение 2	29
9. Приложение 3	30
10. Список рекомендуемой методической литературы	30

Продолжение таблицы 3.

Цитоз	$0,2 \cdot 10^9$ /л	$>3 \cdot 10^9$ /л	до $50 \cdot 10^9$ /л	$>50 \cdot 10^9$ /л
Состав клеток	лимфоциты, моноциты до 75 %	лимфоциты до 80 %	полиморфно-ядерные нейтрофилы до 90 %	полиморфно-ядерные нейтрофилы > 90 %
Рагоциты	нет	от 2 до 15 %	более 40 %	отсутствуют
Общий белок	15 - 20 г/л	22 - 37 г/л	до 60 г/л	35 - 48 г/л
Глюкоза	3,5-5,5 ммоль/л	3,5-5,5 ммоль/л	2,0-3,5 ммоль/л	отсутствует

По: Астапенко М.Г., 1989, Насонов Е.Л. и соавт., 1997

В синовиальной жидкости больных РА значительно увеличено содержание общего белка - до 60 г/л и более (в норме: 15-20 г/л); существенно снижается содержание глюкозы - до 2,0 ммоль/л (в норме: 3,5-5,5 ммоль/л).

Ревматоидный процесс вызывает резкое качественное и количественное изменение клеточного состава СЖ - синовиоцитогаммы. Количество клеток в нормальной СЖ невелико - $0,18 \cdot 10^9$ /л, у больных РА оно может возрастать в 100 и более раз, до $20-25 \cdot 10^9$ /л.

Значительно меняется состав клеток: в нормальной СЖ клеточные элементы представлены преимущественно лимфоцитами и моноцитами (до 75 %), нейтрофильные лейкоциты составляют 10-15%, синовиоциты - клетки покровного слоя синовиальной оболочки - до 12%. В то же время, в СЖ больных РА резко возрастает количество полиморфноядерных нейтрофильных лейкоцитов, которые составляют 90% всех клеточных элементов.

В СЖ больных РА часть лейкоцитов, либо клеток макрофагального типа имеют своеобразные включения - вакуоли, несколько похожие, при бледно-зеленоватом окрашивании, на кисть винограда, в связи с чем они получили название **рагоцитов**.

Рагоциты определяют в нативной неокрашенной СЖ при помощи светового микроскопа с окулярами x7, x10, объектив x 40.

Рагоциты содержат фагоцитированные частицы: липидные и белковые вещества, иммунные комплексы с Ig A, M, G, ревматоидные факторы, компоненты комплемента. Рагоциты встречаются при различных заболеваниях: системной красной волчанке, инфекционных артритах, ревматическом и псориатическом артрите, подагре. Однако, при РА число их значительно больше, достигает 40%.

При снижении местной активности ревматоидного процесса характер синовиоцитогаммы меняется и, в определенной степени, нормализуется, обострение артрита коррелирует с усугублением цитологических признаков ревматоидного воспаления в СЖ.

Существенно отметить, что в СЖ больных РА обнаруживается РФ, нередко при отсутствии его в сыворотке крови. РФ в дебюте РА появляется в СЖ значительно раньше, чем в сыворотке крови. Выявляется также наличие СРП, который при воспалительных процессах в суставах, в частности, при РА возрастает до 0,05-0,06 г/л (в норме - до 0,001 г/л).

В СЖ отмечено повышение фагоцитоза и снижение активности комплемента. Для проведения данных исследований необходимо добавление в СЖ фермента гиалуронидазы, разрушающей гиалуроновую кислоту (50 ед. на 10 мл СЖ) и последующее центрифугирование (3000 об/мин, 15 мин.). Затем исследования следует проводить с центрифугатом, предварительно удалив осадок.

4. Иммунологические показатели в диагностике ревматоидного артрита.

В основе патогенеза РА лежат аутоиммунные реакции организма, которые в разной степени затрагивают гуморальное и клеточное звено иммунной системы и могут быть использованы в клинике для диагностики данной патологии.

4.1. Гуморальное звено иммунной системы.

Развитие РА связано с нарушением гуморального звена иммунной системы - гиперпродукцией различного спектра аутоантител, принадлежащих к разным классам иммуноглобулинов (Ig), реагирующих с антигенами с образованием циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК).

Особое значение (в связи с высокой частотой выявления - до 90 % и вероятным участием в тканевом повреждении) придается выявлению в сыворотке крови больных РА ревматоидных факторов (РФ), аутоантител реагирующих с Fc-фрагментом IgG человека и некоторых животных.

До настоящего времени неизвестно, в результате каких нарушений собственный IgG больного РА приобретает способность индуцировать биосинтез РФ, однако, имеется четкая клиническая связь частоты обнаружения РФ с тяжестью течения РА (активностью болезни, выраженностью органических поражений, длительностью заболевания). Данная зависимость подчеркивает патогенетическое значение РФ, как аутоантитела.

Таким образом, выявление данных аутоантител в крови является одним из наиболее важных диагностических критериев ревматоидного поражения.

Ревматоидный фактор может определяться различными иммунологическими методами, среди которых по простоте выполнения, не требующей сложного оборудования (дешевле!) следует выделить реакцию пассивной агглютинации (РФ - IgG-носитель) с использованием коммерческих стандартных наборов отечественного и иностранного производства. В них в качестве несущих IgG частиц наиболее часто применяется каучук (латекс), формализированные эритроциты и другие носители. Принципиальной основой разработки данных коммерческих наборов стала классическая реакция Waaler-Rose (1948), взаимодействия эритроцитов барана, sensibilizированных субагглютинирующей дозой IgG-гемагглютининов кролика, с РФ сыворотки больного РА.

В настоящее время стандартизированные тесты определения РФ нашли широкое применение во всем мире. Необходимо отметить, что они выявляют высокомолекулярный РФ класса IgM, в связи с его высокой агглютинирующей способностью и не определяют РФ, имеющие характеристики низкомолекулярных РФ классов IgA и IgG. Отсюда и тенденция к появлению термина "скрытый РФ", который может быть идентифицирован с помощью более сложных методов и дорогостоящего оборудования (иммуносорбционный анализ, ультрацентрифугирование и т.д.), а также условное разделение больных РА на серопозитивные и серонегативные варианты.

В норме РФ может встречаться в сомнительных титрах (1:20 с латекс-реагентом и ДРФ, 1:32 в реакции Waaler-Rose) не более, чем у 4 % обследованных лиц, вне зависимости от пола и расовой принадлежности, имея тенденцию к незначительному увеличению частоты выявления у пожилых людей. РФ может также встречаться у больных другими системными заболеваниями соединительной ткани, при хроническом гепатите, циррозе печени, туберкулезе, сифилисе, болезни Вальденстрема, онкологических заболеваниях, однако, не столь часто (10 %), и с невысокими показателями реакции.

Исследуя РФ у больных РА, можно получить существенную диагностическую помощь, так как РФ является важным критерием диагностики данного тяжелого заболевания на ранних этапах его развития (3-6 месяцы). Вместе с тем, выявление РФ, как и других аутоантител, при РА дает относительную информацию, которая при оценке нозологической специфики заболевания, должна интерпретироваться комплексно с другими результатами обследования больных.

В современной ревматологии все большее диагностическое значение придается новым иммунологическим методам исследования аутоиммунных нарушений, характерных для РА, в частности, выявлению антинуклеарных антител (АНА). Данные аутоантитела высокоспецифичны для аутоиммунных проявлений ревматических заболеваний. Исследование спектра АНА в

сыворотке крови позволяет прогнозировать направленность развития патологического процесса до начала развернутой клинической картины заболевания.

Антинуклеарные факторы представляют собой гетерогенную группу аутоантител к различным компонентам ядра (ДНК, гистонам, РНК, центромерам хромосом), а также антитела к ДНК (а-ДНК), реагирующие с пуриновыми и пиримидиновыми основаниями односпиральной (денатурированной) ДНК (ss-DNA) и углеводно-фосфатного остова двуспиральной (нативной) ДНК (ds-DNA).

Существуют различные способы выявления АНА: иммуноблоттинг, иммуноферментный, иммунофлюоресцентный, иммунохимический, электрофоретический, а также и другие методы.

Собственный опыт позволяет рекомендовать метод не прямой иммунофлюоресценции, основанный на реакции АНА с клетками-мишенями (эпителий карциномы гортани, HEp 2 - cell; кинетопластов, *Critidia lucilia*) с использованием специальных коммерческих слайдов.

Слайды обрабатываются сывороткой больных, а затем моноклональными антителами против иммуноглобулина G, мечеными FITC (флюоресцеином изотиоцианатом). После этого с помощью иммунофлюоресцентного микроскопа оценивается характер, тип и интенсивность свечения клеток и их компонентов.

Различают шесть основных типов иммунофлюоресцентного свечения: гомогенное, периферическое и пятнистое (крапчатое) типы ядерного свечения; нуклеолярный, центромерный и цитоплазматический типы свечения.

В диагностике РА наиболее важными являются следующие 2 типа иммунофлюоресцентного свечения:

1. **Гомогенное свечение.** Наблюдается однородное диффузное свечение внутри ядра с окрашиванием нуклеолей или без него. Данный тип иммунофлюоресцентного свечения обусловлен наличием антител к ss-DNA, ds - DNA, гистонам и может наблюдаться также при ювенильном ревматоидном артрите (ЮРА), системной красной волчанке.
2. **Спектральное (крапчатое) свечение.** Характеризуется крапчатым или зернистым свечением всей нуклеоплазмы. Антитела, дающие такое свечение, направлены против семейства негистоновых антигенов. При РА чаще встречается крупнокрапчатое свечение.

Приводим результаты собственного наблюдения за группой больных с различными заболеваниями (184 человека), обследованными в республиканском центре ревматологии.

Впоследствии 35 пациентам был выставлен диагноз серопозитивного ревматоидного артрита (причем у 15 больных РА имелись системные проявления патологического процесса).