Ийлдсийн аутоэсрэгбиеийг эсэд суурилсан дархан туяарах аргаар илрүүлсэн үр дүн

Н.Баяртогтох[1], Г.Саранзаяа[1], О.Сувд[1], Т.Өлзийхүү[1], Ч.Гансүх[1], Т.Хонгорзул[1,2]

[1]АШУҮИС, Био-АС, Дархлаа судлалын тэнхим
[2]АШУҮИС, Био-Анагаахын хүрээлэн, Иммунобиологийн лаборатори
Цахим шуудан: nctm.bayartogtokh@gmail.com, Утас: 99178185

Түлхүүр үг:
HEp-2 эс
Бөөмийн эсрэг эсрэгбие
Стандарт аргачлал

Товч утга:

Үндэслэл: Тогтолцооны аутоиммун өвчний оношилгоонд өргөн ашигладаг бөөмийн эсрэг эсрэгбие (Anti-Nuclear Antibody, ANA)-ийг HEp-2 (Human Epithelial type 2) эсэд суурилсан шууд бус дархан туяарах аргаар илрүүлэхийг олон улсад алтан стандарт хэмээн үздэг.[1] Стандарт аргаар ийлдсийн ANA-г илрүүлэх туршилт судалгааны аргачлалыг хөгжүүлэх нь тогтолцооны аутоиммун өвчний оношилгоонд ач холбогдолтой юм.[2] **Зорилго:** HEp-2 эсэд суурилсан дархан туяарах аргаар ийлдсийн ANA-г илрүүлэх **Арга, аргачлал:** Хөлдөөсөн HEp-2 шугаман эсийг сэргээж өсгөвөрлөн урвалын хавтанд 500,000 эсийг сэлгүүлж 5%-ийн CO2-ийн агууламжтай 37ºC-ийн орчинд 24 цаг өсгөвөрлөж, бэхжүүлэв. HEp-2 эсийг тогтолцооны улаан яршил (ТУЯ) болон Шегрений хам шинж (ШХШ) онош бүхий үйлчлүүлэгчийн ийлдэс (1:80, 1:160), FITC (Fluorescein Isothiocyanate) флюресценци бүхий хоёрдогч эсрэгбие (1:500)-ээр үйлчилж дархан туяарах микроскопийн 20х, 40х өсгөлтөөр харж үнэлэв. Микроскопийн 40х өсгөлт болон ийлдсийн 1:160 шингэрүүлэлтийн HEp-2 эсийн бөөмийн бүтцийн туяаралтын үр дүнг ICAP (International Consensus on ANA Patterns) ангиллын үр дүнтэй харьцуулан үнэлэв. **Үр дүн:** HEp-2 эсийг ANA эерэг болон сөрөг ийлдсээр үйлчилж шууд бус дархан туяарах аргачлалаар шинжлэхэд сөрөг хяналтын ийлдсэнд туяаралт илрээгүй бол ТУЯ онош бүхий anti-dsDNA эерэг ийлдсээр үйлчлэхэд бөөм бүхэлдээ жигд туяарч харагдав. HEp-2 эсийг Шегрений хам шинж оноштой anti-SSA/B эерэг ийлдсээр үйлчлэхэд бөөмөн дотор цэгчилсэн туяаралт харагдав. ТУЯ онош бүхий ANA, anti-dsDNA эерэг ийлдсээр үйлчилсэн HEp-2 эсийн бөөмийн будагдалт жигд тод, харин ШХШ онош бүхий ANA, SSA/B эерэг ийлдсээр үйлчилсэн HEp-2 эсийн бөөмийн будагдалт цэгчилсэн байдлаар стандарт үзүүлэлттэй ойролцоо тодорхойлогдов. **Дүгнэлт:** HEp-2 эсийн бөөмийн антиген нь ANA-ийн төрөл ба тогтолцооны аутоиммун өвчний оношоос хамаарч ялгаатай тодорхойлогдов.

Үндэслэл: Эмнэлзүйн практикт тогтолцооны аутоиммун өвчнийг илрүүлэх хамгийн түгээмэл маркер нь бөөмийн эсрэг эсрэгбие (Anti-Nuclear Antibody, ANA) бөгөөд энэ нь өөрийн эсийн ДНХ, РНХ, гистон уураг зэрэгт чиглэсэн аутоэсрэгбие юм. ANA-г илрүүлэх шинжилгээ нь тогтолцооны улаан яршил, Шегрений хам шинж зэрэг тогтолцооны аутоиммун өвчний оношилгоонд чухал ач холбогдолтой.[2,3] ANA-г илрүүлэх хамгийн өндөр мэдрэг чанартай, найдвартай стандарт арга нь HEp-2 эсэд суурилсан дархан туяарах арга юм. HEp-2 эсийн шугаман өсгөвөрийг үйлчлүүлэгчийн ийлдсээр үйлчилж, үүссэн аутоэсрэгбиеийг флюресцент тэмдэглэгээтэй хоёрдогч эсрэгбие ашиглан тодорхойлдог.[4,5] HEp-2 эсийг ашиглан дархан туяарах аргаар ийлдсийн ANA-г илрүүлэх туршилт судалгааны аргачлалыг хөгжүүлж, стандарт аргаар ANA-г илрүүлэх боломжийг судлах нь бидний судалгааны үндэслэл болсон.

Зорилго: HEp-2 эсэд суурилсан дархан туяарах аргаар ийлдсийн ANA-г илрүүлэх

Арга, аргачлал: Энэхүү судалгааг АШУҮИС-ийн ШУТДС-ийн санхүүжилттэй хэрэгжсэн “Аутоиммун эмгэгийн оношилгооны ФХЭБУ-ын оношлуур үйлдвэрлэх” төслийн хүрээнд туршилт судалгааны загвараар хийж гүйцэтгэв. HEp-2 гэх хавдрын шугаман эсийг ОХУ-ын Новосибирск дэх эсийн сангаас захиалан авч дархан туяарах шинжилгээний антиген болгон ашиглав**.** Улсын Нэгдүгээр Төв Эмнэлгийн Хэрх үе

судлал, үе сэргээх төвд тогтолцооны улаан яршил, Шегрений хам шинж оношлогоо тавигдсан хоёр хүний цусны ийлдсийг ANA эерэг шинжлэгдэхүүн болгон ашиглав. Цус Сэлбэлт Судлалын Үндэсний Төвийн Сүхбаатар цус цуглуулах төвд цусаа хандивласан донорын цусны ийлдсийг ANA сөрөг шинжлэгдэхүүн болгон ашиглав.

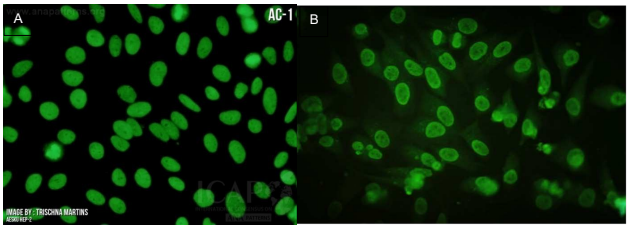
HEp-2 эсийг сэргээж, гэрлийн микроскопоор эсийн морфологи бүтэц болон ургалтыг харж, харах талбайд 80% ба түүнээс дээш ургалттай үед эсийг сэлгүүлэн өсгөвөрлөв. Эсийн өсгөврийн тавгаас эсийг бүрхүүл шилэн дээр байрлуулан бэхжүүлэв.

Эсийг анхдагч эсрэгбие буюу ANA эерэг ийлдсийг 1:80, 1:160 дахин, сөрөг ийлдсийг 1:80 харьцаагаар шингэрүүлж бүрхүүл шил тус бүр дээр 100 мкл хийн тасалгааны хэмд 30 минут инкубаци хийв. Харанхуй өрөөнд хоёрдогч эсрэгбие (хүний эсрэг IgG FITC)-ийг 1:500 дахин шингэрүүлэн бүрхүүл шил тус бүр дээр 100 мкл-ийг хийн тасалгааны хэмд 30 минут инкубаци хийв.

Бэхжүүлэгч медиумийг тавиур шилэн дээр дусаан бүрхүүл шилийг байрлуулан дархан туяарах микроскопийн 20х, 40х өсгөлт дээр 490-495 нанометрийн цэнхэр гэрлийн долгионд тааруулж туяаралтын эрчим болон будагдалтын хэв шинжийг үнэлэв.[6-10]

Үр дүн: HEp-2 эсийг тогтолцооны улаан яршил оношгой ANA эерэг (1:80 ба 1:160) ийлдэс, FITC бүхий хоёрдогч эсрэгбиеэр үйлчлэхэд эсийн бөөм жигд туяарч харагдаж байв. Шегрений хам шинж оношгой ANA эерэг ийлдсийн 1:80 ба 1:160 шингэрүүлэлтэд HEp-2 эсийн бөөмөөс гадна цитоплазм туяарч харагдаж байв.

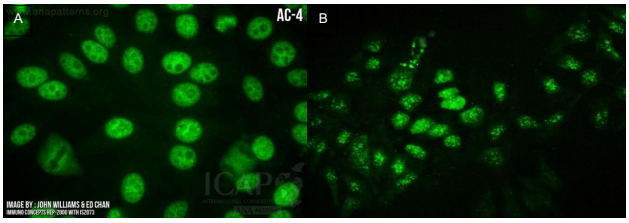
Олон улсын ICAP ангиллын AC-1 буюу anti-dsDNA эсрэгбие эерэг үеийн эсийн бөөмийн туяаралтыг ANA эерэг ийлдсээр үйлчилсэн HEp-2 эсийн бөөмийн туяаралттай харьцуулан харуулав (Зураг 1).



Зураг 1. ТУЯ өвчний үед илэрдэг эсийн бөөмийн антигенийг харьцуулсан байдал (40х өсгөлт)
A. ICAP ангиллын AC-1 хэв шинжийн эсийн бөөмийн жигд туяаралт, B. ANA эерэг ийлдсээр үйлчилсэн HEp-2 эсийн бөөмийн туяаралт

Стандартын AC-1 ба бидний судалгааны ANA, anti-dsDNA эерэг ийлдсээр үйлчилсэн HEp-2 эсийн будагдалтад FITC жигд тод туяарч харагдав.

Олон улсын ICAP ангиллын AC-4 буюу SSA/B эсрэгбие бүхий ANA эерэг эсийн будагдалт болон бидний судалгааны SSA/B эсрэгбие бүхий ANA эерэг ийлдсийн HEp-2 эс дээр харагдах байдлыг харьцуулахад ШХШ онош бүхий ANA, SSA/B эерэг ийлдсээр үйлчилсэн HEp-2 эсийн бөөмийн будагдалт цэгчилсэн байдлаар стандарт үзүүлэлттэй ойролцоо тодорхойлогдов (Зураг 2).



Зураг 2. ШХШ өвчний үед илэрдэг эсийн бөөмийн антигенийг харьцуулсан байдал (40х өсгөлт)
A. ICAP ангиллын AC-4 хэв шинжийн эсийн бөөмийн туяаралтB. ANA эерэг ийлдсээр үйлчилсэн HEp-2 эсийн бөөмийн туяаралт

Хэлцэмж: Тогтолцооны аутоиммун өвчний оношгой тавигдсан эмчлүүлэгчийн ийлдсийг ашиглан эсэд суурилсан дархан туяарах аргаар HEp-2 эсийн бөөмийн антигенийг тодорхойлон, стандарт үр дүнтэй харьцуулан судлав.

Эсэд суурилсан дархан туяарах аргаар HEp-2 эсийн бөөмийн антиген нь ялгаатай туяарч харагдаж байв. Ийлдсийн аутоэсрэгбиеийн агууламж өндөр байх нь эсийн бөөмийн туяаралтын эрчимтэй хамааралтай байсан нь Khalifah MJ (2022) нарын фермент холбоот эсрэгбиеийн шинжилгээгээр аутоэсрэгбиеийн тоон утга нэмэгдэх тусам HEp-2 эсийн бөөмийн туяаралт тодорч байсан судалгааны үр дүнтэй дүйж байна.[11]

Бидний судалгаагаар HEp-2 эсийн бөөмийн антигений туяаралтын хэв шинж нь олон улсын ICAP ангиллын стандарт туяаралттай ойролцоо тодорхойлогдов. Тухайлбал, ТУЯ оношгой үйлчлүүлэгчийн ийлдсээр үйлчилсэн эсийн бөөм AC-1 буюу тод жигд будагдсан нь Damoiseaux J (2019) нарын тодорхойлсон anti-dsDNA болон anti-histone аутоэсрэгбиеийн сонгодог зураглалтай дүйцэж байна.[12]

Харин Шегрений хам шинжийн үед ажиглагдсан AC-4 эсийн бөөмийн хэв шинж нь цэгчлэн туяарч харагдаж байсан нь anti-SSA/Ro болон anti-SSB/La аутоэсрэгбиеийн үед илэрдэг ICAP ангиллын шалгууртай ойролцоо байна.[10]

Бидний судалгаагаар ийлдсийн 1:160 шингэрүүлэлт болон дархан туяарах микроскопийн 40х өсгөлт дээр бөөмийн антигений ялгарал хамгийн тод байсан нь бусад судлаачдийн тодорхойлсон оношилгооны нөхцөлтэй тохирч байв. HEp-2 эсэд суурилсан дархан туяарах стандарт аргаар ийлдсийн ANA-г илрүүлэх нь эсийн бөөмийн антигенийг нарийвчлан судлах, тогтолцооны аутоиммун эмгэгийн ялган оношилгоонд ач холбогдолтой юм.

Дүгнэлт: HEp-2 эсийн бөөмийн антиген нь ANA-ийн төрөл ба тогтолцооны аутоиммун өвчний оношоос хамаарч ялгаатай тодорхойлогдов.

Талархал: Энэхүү судалгааг АШУҮИС-ийн ШУТДС-ийн санхүүжилттэй “Аутоиммун эмгэгийн оношилгооны ФХЭБУ-ын оношлуур үйлдвэрлэх” сэдэвт төслийн хүрээнд хийж гүйцэтгэв. Судалгааг гүйцэтгэхэд хамтран ажилласан МЯЭ-ийн Эмгэг судлалын тасгийн хамт олонд талархал илэрхийлье.

Ном зүй:

1. *Meroni PL, Schur PH. ANA screening: an old test with new recommendations. Ann Rheum Dis. 2010;69(8):1420-1422. doi:10.1136/ard.2009.127100*
2. *Mahler M, Meroni PL, Bossuyt X, Fritzler MJ. Current concepts and future directions for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. J Immunol Res. 2014;2014:315179. doi:10.1155/2014/315179*
3. *Nashi RA, Shmerling RH. Antinuclear antibody testing for the diagnosis of systemic lupus erythematosus. Med Clin North Am. 2021;105(2):387-396. doi:10.1016/j.mcna.2020.10.003*
4. *Bossuyt X, De Langhe E, Borghi MO, Meroni PL. Understanding and interpreting antinuclear antibody tests in systemic rheumatic diseases. Nat Rev Rheumatol. 2020;16(12):715-726. doi:10.1038/s41584-020-00522-w*
5. *Irure-Ventura J, López-Hoyos M. The past, present, and future in antinuclear antibodies (ANA). Diagnostics (Basel). 2022;12(3):647. doi:10.3390/diagnostics12030647*
6. *Bonroy C, Vercammen M, Fierz W, et al. Detection of antinuclear antibodies: recommendations from EFLM, EASI and ICAP. Clin Chem Lab Med. 2023;61(7):1167-1198. doi:10.1515/cclm-2023-0209*
7. *Buchner C, Bryant C, Eslami A, Lakos G. Anti-nuclear antibody screening using HEp-2 cells. J Vis Exp. 2014;(88):e51211. doi:10.3791/51211.*
8. *Tebo AE, Schmidt RL, Kadkhoda K, et al. The antinuclear antibody HEp-2 indirect immunofluorescence assay: a survey of laboratory performance, pattern recognition and interpretation. Autoimmun Highlights. 2021;12(1):4. doi:10.1186/s13317-020-00146-w*
9. *Von Mühlen CA, Garcia−De La Torre I, Infantino M, et al. How to report the antinuclear antibodies (anti-cell antibodies) test on HEp-2 cells: guidelines from the ICAP initiative. Immunol Res. 2021;69(6):594-608. doi:10.1007/s12026-021-09233-0*
10. *International Consensus on ANA Patterns (ICAP). ANApatterns.org. Accessed October 17, 2026. https://www.anapatterns.org/*
11. *Khalifah MJ, Almansouri O, Mowallad A, et al. Comparison of indirect immunofluorescence and enzyme immunoassay for the detection of antinuclear antibodies. Cureus. Published online November 3, 2022. doi:10.7759/cureus.31049*
12. *Damoiseaux J, Andrade LEC, Carballo OG, et al. Clinical relevance of HEp-2 indirect immunofluorescent patterns: the International Consensus on ANA Patterns (ICAP) perspective. Ann Rheum Dis. 2019;78(7):879-889. doi:10.1136/annrheumdis-2018-214436*

Results of Serum Autoantibody Detection Using a Cell-Based Indirect Immunofluorescence Assay

Bayartogtokh N[1], Saranzaya G[1], Suvd O[1], Ulziikhuu T[1], Gansukh Ch[1], Khongorzul T[1,2]

[1]Department of Immunology, School of Biomedicine, MNUMS
[2]Immunobiology laboratory, Biomedical Institute, MNUMS
E-mail: nctm.bayartogtokh@gmail.com, Tel: +976-99178185

Abstract:

Background: Indirect immunofluorescence (IIF) using HEp-2 cells is internationally recognized as the gold-standard method for detecting antinuclear antibodies (ANAs), which are widely used in the diagnosis of systemic autoimmune diseases. Developing and evaluating a standardized experimental protocol for ANA detection is important for improving the diagnosis of systemic autoimmune diseases.

Aim: To detect serum ANAs using an HEp-2 cell-based indirect immunofluorescence assay

Materials and Methods: Frozen HEp-2 cells were thawed, recovered, and cultured. Cells were seeded at a density of $5x10^5$ cells per reaction well and incubated at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 for 24 hours, followed by fixation. The fixed cells were incubated with serum samples from patients diagnosed with systemic lupus erythematosus (SLE) and Sjögren's syndrome (SjS), diluted at 1:80 and 1:160. A fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated secondary antibody was subsequently applied at a dilution of 1:500. Fluorescence patterns were examined using an immunofluorescence microscope at 20× and 40× magnifications. Nuclear staining patterns observed at a serum dilution of 1:160 under 40× magnification were evaluated with reference to the International Consensus on ANA Patterns (ICAP) classification.

Results: HEp-2 cells were evaluated using the indirect immunofluorescence (IIF) assay with ANA-positive and ANA-negative sera. No fluorescence was observed in the negative control serum. In contrast, serum positive for anti-dsDNA from a patient with systemic lupus erythematosus (SLE) produced a distinct homogeneous nuclear staining pattern, whereas anti-SSA/SSB-positive serum from a patient with Sjögren's syndrome (SjS) produced a speckled nuclear staining pattern. The homogeneous and speckled staining patterns observed in the respective SLE and SjS sera were consistent with the expected morphological characteristics of the corresponding reference patterns, supporting the applicability of the established HEp-2 cell-based IIF protocol for ANA detection and nuclear staining pattern assessment.

Conclusion: The HEp-2 cell-based indirect immunofluorescence (IIF) assay enabled the detection of serum ANAs and the differentiation of homogeneous and speckled nuclear staining patterns. The observed staining patterns were morphologically consistent with the corresponding reference patterns described in the International Consensus on ANA Patterns (ICAP) classification. These findings support the potential applicability of the established protocol for ANA detection and nuclear staining pattern assessment.

Keywords: HEp-2 cell, antinuclear antibody, standardized protocol