

Продіабетичні антитіла – актуальні підходи до стандартизації лабораторних досліджень

М. І. Бобрик, В. М. Резніченко, І. В. Сідорова

Резюме

Неузгодженість методик, відсутність порівнянності результатів досліджень, виконаних різними методиками, приводить до діагностичних помилок та може впливати на безпеку пацієнта. Програма стандартизації досліджень аутоантитіл до острівцевого апарату підшлункової залози (IASP) має на меті покращити результати імуноаналізів, що визначають аутоантитіла, пов'язані з цукровим діабетом 1-го типу, і відповідність результатів між лабораторіями. IASP організовує міжнародні міжлабораторні порівняльні дослідження, надаючи учасникам неупереджену порівняльну оцінку. Таким чином, практикуючий лікар має можливість обирати лабораторії, які вже стандартизовані щодо еталонів, зазначених IASP, що забезпечить впевненість у результатах досліджень, отже – і у прийнятті клінічних рішень при веденні пацієнта.

Ключові слова: аутоантитіла, імуноаналіз, стандартизація, цукровий діабет

У 2021 р. Американська діабетологічна асоціація (American Diabetes Association, ADA) рекомендувала регламент використання досліджень продіабетичних аутоантитіл.

Рекомендація №2.4: скринінг ризику цукрового діабету 1-го типу за допомогою панелі аналізів на острівцеві аутоантитіла наразі рекомендується проводити в межах клінічних досліджень або пропонується для обстеження членів сім'ї першого ступеня споріднення пробанда з цукровим діабетом 1-го типу.

Рекомендація №2.5: персистенція аутоантитіл є фактором ризику розвитку клінічного діабету.

Продіабетичні антитіла

- **Антитіла до острівцевих клітин (ICA)** вперше виявили у сироватках хворих на цукровий діабет 1-го типу, які мали поліендокринні аутоімунні дефіцити, пов'язані з органоспецифічним аутоімунітетом.
- **Аутоантитіла до інсуліну.** Лікування екзогенними формами інсуліну може викликати

появу антитіл, спрямованих проти пептидів інсуліну, однак в 1983 році вперше описано аутоантитіла до інсуліну (IAA) у осіб з цукровим діабетом 1-го типу, які ще не отримували інсулін. IAA є частими (> 70 %) при дитячому діабеті та менш значущими маркерами цукрового діабету 1-го типу з клінічним початком після підліткового віку. Як правило, високоафінні IAA є більш предиктивними щодо цукрового діабету 1-го типу і мають певні характеристики, включаючи асоціацію з HLA-DRB1*04, подальше прогресування до аутоантитіл проти множинних бета-клітинних антигенів, зв'язування із залишками людського інсуліну та зв'язування з проінсуліном. На противагу цьому, у дітей з IAA з нижчою спорідненістю рідко відбувається прогресування до цукрового діабету 1-го типу.

- **Аутоантитіла до GAD** (глутаматдекарбоксілази) є частими (> 70 %) при цукровому діабеті 1-го типу, який спостерігається у будь-якому віці, і є типовим маркером діабету 1-го типу у дорослих, включаючи

М. І. Бобрик, к. мед. н.

Кафедра ендокринології, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ

І. В. Сідорова

Медична лабораторія ДІЛА, м. Київ

В. М. Резніченко

Державний заклад «Поліклініка №2» Державного управління справами, м. Київ

- так званий латентний аутоімунний діабет у дорослих (LADA). GADA також виявляються при неврологічних розладах, та при станах, не пов'язаних з діабетом. Спорідненість та епітопна специфічність GADA можуть стратифікувати прогресування до цукрового діабету 1-го типу та прогнозувати терапію інсуліном у осіб з LADA.
- **IA-2 та IA-2 β аутоантитіла.** У 1994 р. антиген 512 острівцевих клітин (ICA512) визнано специфічним для діабету аутоантигеном, що відноситься до білкової тирозинфосфатази. Аутоантитіла до IA-2 є дуже специфічними та предиктивними для цукрового діабету 1-го типу і часто виявляються (> 70 %) при клінічному початку захворювання. Зазвичай вони виникають разом з іншими аутоантитілами до бета-клітин, і хоча не використовуються в якості тесту першої лінії, можуть ідентифікувати людей з високим ризиком прогресування захворювання.
 - **Аутоантитіла до транспортеру цинку-8 (ZnT8).** У 2007 р. транспортер цинку-8 (ZnT8) визнано як аутоантиген цукрового діабету 1-го типу. Аутоантитіла до ZnT8 виявляються приблизно у 70 % пацієнтів з цукровим діабетом 1-го типу. Аутоімунітет проти С-кінцевого домену ZnT8 є високопрогностичним щодо прогресування до клінічного діабету.

Клінічна значущість продіабетичних антитіл

Аутоантитіла до бета-клітин циркулюють у крові, сигналізуючи про активну та специфічну для захворювання відповідь В-лімфоцитів. Вони можуть бути відтворюваними, і тому є чудовими та доступними імунними біомаркерами для цукрового діабету 1-го типу.

У осіб з клінічно маніфестним діабетом ці аутоантитіла використовуються для класифікації захворювань, розмежовуючи аутоімунний (тип 1) та неаутоімунний (головним чином, тип 2) діабет, а також для прогнозування необхідності лікування інсуліном.

Наявність або відсутність аутоантитіл до бета-клітин у крові є важливим додатковим критерієм, якщо діагноз не чіткий

за клінічними симптомами чи іншими лабораторними біомаркерами. Зокрема, підгрупа дорослих пацієнтів з діабетом, які клінічно перебувають без кетоацидозу та втрати ваги, спочатку не потребує інсулінотерапії, але в них розвивається залежність від інсуліну швидше, ніж у типових хворих на цукровий діабет 2-го типу і виявляються аутоантитіла (головним чином GADA). Ця повільно прогресуюча форма аутоімунного діабету 1-го типу, також звана LADA, виявляється у людей старше 30 років, часто неправильно діагностується і лікується як цукровий діабет 2-го типу. Нещодавно стало очевидним, що діти, у яких виявляється два або більше типів продіабетичних аутоантитіл, майже неминуче переходять до клінічно симптоматичного діабету. Ці результати призвели до визнання нової стадії діабету 1-го типу, яка класифікує наявність розвиненого аутоімунітету до бета-клітин (множинні аутоантитіла) у осіб без симптомів діабету як ранню стадію захворювання.

Таким чином, різна етіологія діабету впливає на клінічний фенотип пацієнтів і може бути виявлена шляхом дослідження аутоантитіл на користь тієї чи іншої терапії.

Особливо критичної інтерпретації потребують окремі позитивні результати аутоантитіл, оскільки 1–7 % осіб без діабету та однакова кількість осіб з цукровим діабетом 2-го типу мають хибнопозитивні аутоантитіла (тобто не пов'язані з цукровим діабетом 1-го типу, переважно низькоафінні) в залежності від межі позитивності та використовуваного методу аналізу. Тому очевидно, що дослідження для визначення продіабетичних аутоантитіл повинні бути узгоджені та вдосконалені, результати досліджень різними методиками повинні бути порівнянні.

Гармонізація та реалізація

Сьогодні більшість дослідницьких лабораторій використовують різні форми аналізу радіозв'язування (RBA) для виявлення аутоантитіл. Деякі комерційні імуноферментні

аналізи (ІФА) зараз виявляють GADA так само або краще, ніж RBA. IAA вважаються важливими аутоантитілами для прогнозування цукрового діабету 1-го типу у дітей, однак сучасні дослідження дають дуже мінливі результати. Гармонізація досліджень для виявлення аутоантитіл до бета-клітин є складною, але важливою для отримання порівнянних між лабораторіями результатів, особливо для багатоцентрових досліджень.

У 2000 році Товариство імунології діабету (IDS) та Центри контролю та профілактики захворювань США (CDC) створили Програму стандартизації продіабетичних антитіл для поліпшення порівнянності та як механізм оцінки нових аутоантигенів та методологій тестування. З 2012 року ця програма продовжується як Програма стандартизації острівцевих аутоантитіл (IASP), що фінансується Національним інститутом охорони здоров'я США (NIH), контролюється Товариством імунології діабету і організовується базовою лабораторією TrialNet Islet Cell при Університеті Флориди.

Метою програми є покращення виявлення та діагностики аутоімунного діабету шляхом:

- а) надання технічної підтримки, навчання та інформування про найкращі методи;
- б) проведення перевірки кваліфікації для оцінки лабораторних показників;
- в) підтримки розвитку високочутливих та специфічних технологій вимірювання;
- г) розробки довідкових матеріалів.

Кожні 18 місяців за Програмою стандартизації проходять міжнародні семінари, в яких лабораторії у всьому світі проводять «сліпий» аналіз зразків від 50 пацієнтів з вперше виявленим цукровим діабетом 1-го типу та до 100 контрольних груп. Цей формат забезпечує оцінку чутливості та специфічності кожного тесту та дозволяє оцінювати впровадження методів дослідження. Інші заходи Програми стандартизації включають оцінку стабільності стандарту BOO3 GADA та IA-2, оцінку протоколів стандартних методів для GADA та IA-2A та перевірку нових маркерів аутоантитіл.

Програмою стандартизації продіабетичних антитіл загалом рекомендовано: перед використанням дослідження на аутоантитіла для оцінки ризику цукрового діабету 1-го типу та діагностичної мети слід встановити його результативність на міжнародних семінарах, що базуються на засадах Товариства імунології діабету (IDS).

Стандартизація лабораторних методик у діабетології

Дослідження HbA1c та C-пептиду були гармонізовані. Зусилля з гармонізації імуноаналізів інсуліну все ще тривають, порівнянність імуноаналізів для визначення продіабетичних антитіл значно покращилася.

Разом із клінічним обстеженням Національні та міжнародні рекомендації регламентують фіксовані результати лабораторних досліджень для прийняття рішень щодо ведення пацієнта. Якщо лабораторні аналітичні процедури в конкретній лабораторії не стандартизовані, можна зробити неправильні висновки щодо діагностики або лікування пацієнта, хоча лікар дотримується рекомендацій медичних керівництв. У таких випадках можливим є вплив на безпеку пацієнта.

Протягом десятиліть використання результатів нестандартизованих досліджень підвищувало ризик помилок у діагностуванні та неправильних клінічних рішень.

В 1979 р. Tietz запропоновано модель стандартизації, яка є основою для стандартизації лабораторних досліджень у клінічній хімії. Ця модель була вдосконалена та описана в ISO 17511 (ISO 2003). Цей документ визначає шляхи встановлення або перевірки достовірності вимірювань, шляхи внутрішньої та зовнішньої оцінки якості. На додаток до внутрішньолабораторних аналітичних процедур, системи стандартизації також включають преаналітичний та післяаналітичний етапи щодо еталонів матеріалу зразка, стабільності зразка, звітності, контрольних діапазонів та інтерпретації.

Стандартизація процедур дослідження продіабетичних аутоантитіл

Стійка наявність двох або більше острівцевих аутоантитіл є майже певним предиктором клінічної гіперглікемії та діабету.

Швидкість прогресування залежить від віку першого виявлення аутоантитіл, кількості аутоантитіл, конкретних видів аутоантитіл та титру аутоантитіл.

Існують суперечки щодо того, чи слід повільно прогресуючий аутоімунний діабет з початком у дорослих називати прихованим аутоімунним діабетом у дорослих (LADA) або цукровим діабетом 1-го типу. Американська діабетологічна асоціація в 2021 року всі форми діабету, що пов'язані зі шляхом аутоімунної деструкції клітин, включила до рубрики «Цукровий діабет 1-го типу». Використання терміна LADA є загальним і прийнятним у клінічній практиці і має практичний вплив на підвищення обізнаності серед дорослих, у яких може розвинутися явна аутоімунна деструкція бета-клітин, тим самим прискорюючи ініціювання інсулінотерапії до погіршення контролю глюкози або розвитку діабетичного кетоацидозу.

Останнє дослідження міжлабораторного порівняння та стандартизації GADA відбулося в 2018 році, коли 37 лабораторій з 17 країн Північної Америки, Європи, Азії та Австралії подали результати 48 різних аналізів GADA, заснованих на 9 різних форматах аналізу. Медіана чутливості використаних методик становила 69 % (міжквартильний діапазон 64–76 %), специфічності – 98,9 % (міжквартильний діапазон 96,7–100 %), точності – 88,6 % (міжквартильний діапазон 84,5–90,7 %) відповідно.

Підкреслено значну різницю щодо виявлення титрів GADA при використанні різних форматів досліджень. Узгодженість титрів GADA зростала серед досліджень із використанням одного і того ж формату.

Щодо GADA, порівняння кількісних результатів ускладнилося впровадженням різноманітних місцевих нестандартизованих довільних одиниць та алгоритмів розрахунків для вираження результатів замість міжнародних одиниць, схвалених ВООЗ. Подальший аналіз не підтвердив достатню відтворюваність результатів ВООЗ у лабораторіях. Це спонукало до розробки загального протоколу, що включає альтернативний

Таблиця 1. Дані семінару Програми стандартизації острівцевих аутоантитіл (IASP) 2018 р. щодо результатів досліджень GADA методиками ADAP, ІФА, RBA, ECL, CLIA

Формат	Кількість досліджень	Чутливість (%)	Специфічність (%)	Точність (%)
ADAP (антитілозалежна аглютинаційна ПЛР)	1	80	100	92,9
bridge-ІФА	12	78,0 (68,0–80,0)	100,0 (95,5–100,0)	91,4 (88,6–92,8)
RBA (аналіз радіозв'язування)				
Усічений GAD65 aa96–585	4	69,0 (66,0–74,0)	100,0 (95,6–100,0)	88,2 (87,9–89,3)
Місцевий протокол	9	66,0 (50,0–72,0)	97,8 (95,7–100,0)	87,1 (82,1–88,6)
Гармонізований протокол	5	64,0 (58,0–82,0)	98,9 (94,4–100,0)	85,0 (81,4–92,9)
ECL (електро-хемілюмінесценція)				
ECL	2	78,0 (78,0–82,0)	97,2 (95,6–98,9)	91,1 (89,3–92,8)
ECL IgG специфічний	1a	66,0	96,7	85,7
ECL специфічний IgM	1a	30,0	97,8	73,6
ECL IgA специфічний	1a	28,0	97,8	72,9
CLIA (імунохемілюмінесценція)	2	72,0 (68,0–76,0)	96,7 (93,3–100,0)	87,9 (84,3–91,4)

набір стандартів сироватки GADA, відкалібрований щодо сироватки ВООЗ.

Висновки

Надання виробниками різноманітних методик досліджень з застосуванням довільних одиниць, розрахунків результатів замість міжнародних одиниць, схвалених ВООЗ призводить до невідтворюваності результатів ВООЗ у лабораторіях. Гармонізація лабораторних досліджень є необхідною умовою порівнянності біомаркерів, що сприяє діагностиці, класифікації та моніторингу пацієнтів. Процедура гармонізації тривала за часом та потребує значних міжнародних зусиль.

Ситуація щодо продіабетичних аутоантитіл (виявлені в 1974 р.) відрізняється, оскільки аутоантитіла сильно варіюють у окремих пацієнтів і можуть також змінюватися з часом. Для визначення продіабетичних аутоантитіл більшість лабораторій використовує твердофазний/рідкофазний імуноаналіз bridge-ELISA, інші виробники пропонують імуноферментні методики. Програма стандартизації досліджень аутоантитіл до острівцевого апарату підшлункової залози (IASP) має на меті покращити результати імуноаналізів, що визначають продіабетичні антитіла і відповідність результатів між лабораторіями.

При прийнятті клінічних рішень практикуючому лікарю слід враховувати чутливість, специфічність, точність методики, що

впливає на виявлення продіабетичних аутоантитіл. Однак допоки процес гармонізації не завершений, можливим є обстеження пацієнтів у лабораторіях, методики яких вже відповідають кращим міжнародним стандартам, що забезпечує надійність біомаркерів для прийняття клінічних рішень, нарешті, покращивши ведення та безпеку пацієнтів.

В МЛ ДІЛА методики дослідження продіабетичних антитіл відповідають кращим міжнародним стандартам:

- Антитіла до глутамінокислої декарбоксілази (GADA, антитіла загальні до транспортеру цинка 8 (ZnT8Ab) та С-кінцевого домену: стандарти відкалібровані за першим Міжнародним ВООЗ стандартом 97/550.
- Антитіла до інсуліну: методика – твердофазний імуноферментний аналіз.
- Антитіла до острівцевого апарату підшлункової залози (ICA) IgG та антитіла до тирозинфосфатази (IA-2): методика – хемілюмінесцентний імуноаналіз.

Таким чином, в портфелі МЛ ДІЛА представлений повний актуальний перелік досліджень продіабетичних антитіл, методики дослідження відповідають кращим міжнародним стандартам, що надає можливість отримати повну лабораторну оцінку щодо цукрового діабету 1-го типу.

Література

1. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes 2021. January 01 2021; volume 44 issue Supplement 1. <https://doi.org/10.2337/dc21>
2. Sebastian Hörber et al. Harmonization of immunoassays for biomarkers in diabetes mellitus. *Biotechnology Advances*, 39 (2020), 107359. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.02.015>
3. Vito Lampasona, David L Pittman, Alistair J Williams, Peter Achenbach, Michael Schlosser, Beena Akolkar, William E Winter, Participating Laboratories, Islet Autoantibody Standardization Program 2018 Workshop: Interlaboratory Comparison of Glutamic Acid-Decarboxylase Autoantibody Assay Performance, *Clinical Chemistry*, Volume 65, Issue 9, 1141–1152 (2019).