

Иммунопероксидазный анализ или иммунофлуоресценция: какой метод более достоверен для интерпретации почечной биопсии?

Image



Иммунопероксидазный анализ или иммунофлуоресценция: какой метод более достоверен для интерпретации почечной биопсии?

Биопсия почек является основным методом диагностики аутоиммунных заболеваний в нефрологии, включая гломерулонефриты. Ее эффективность зависит от качества проведения самой процедуры и экспертной оценки результатов опытным морфологом, что важно для точной диагностики и выбора грамотной стратегии ведения пациента клиницистом. Развитие иммунологии, а вместе с ней аналитических методов диагностики (в первую очередь иммуногистохимии), позволило точно выявлять специфичные маркеры патологического процесса. В настоящее время в нефроморфологии применяется несколько типов иммуногистохимических исследований, порой проводимых одновременно на одном срезе. Наиболее часто используются иммунпероксидазный и иммунофлуоресцентный методы. В связи с этим не совсем корректно противопоставлять иммуногистохимию иммунофлуоресценции, так как последняя является частным видом первой. После прочтения данного материала вы получите структурированное представление о существующих способах изучения нефробиоптата, а также узнаете, почему ИФ микроскопия эффективнее в диагностике ряда гломерулопатий.

Пожалуйста, нажмите на интересующий вас раздел, чтобы его открыть.

Иммунпероксидазная и иммунофлуоресцентная микроскопии: в чем основные различия методов?

На протяжении развития иммуногистохимических методов важным фактором оставалось стремление увеличить чувствительность антител к низким концентрациям антигенов. Это позволило объединить морфологический анализ тканей с результатами молекулярно-биологических тестов. В отличие от жидкостных иммунологических методов, которые выявляют белки, присутствующие в ткани в высоких концентрациях, сохранность антигена на фиксированных тканях варьируема и непредсказуема. Изготовление срезов из тканей, зафиксированных формалином и залитых в парафин, обеспечивает наилучшую морфологическую сохранность, но зачастую становится препятствием для исследований, где требуется взаимодействие с «активными» антигенами.

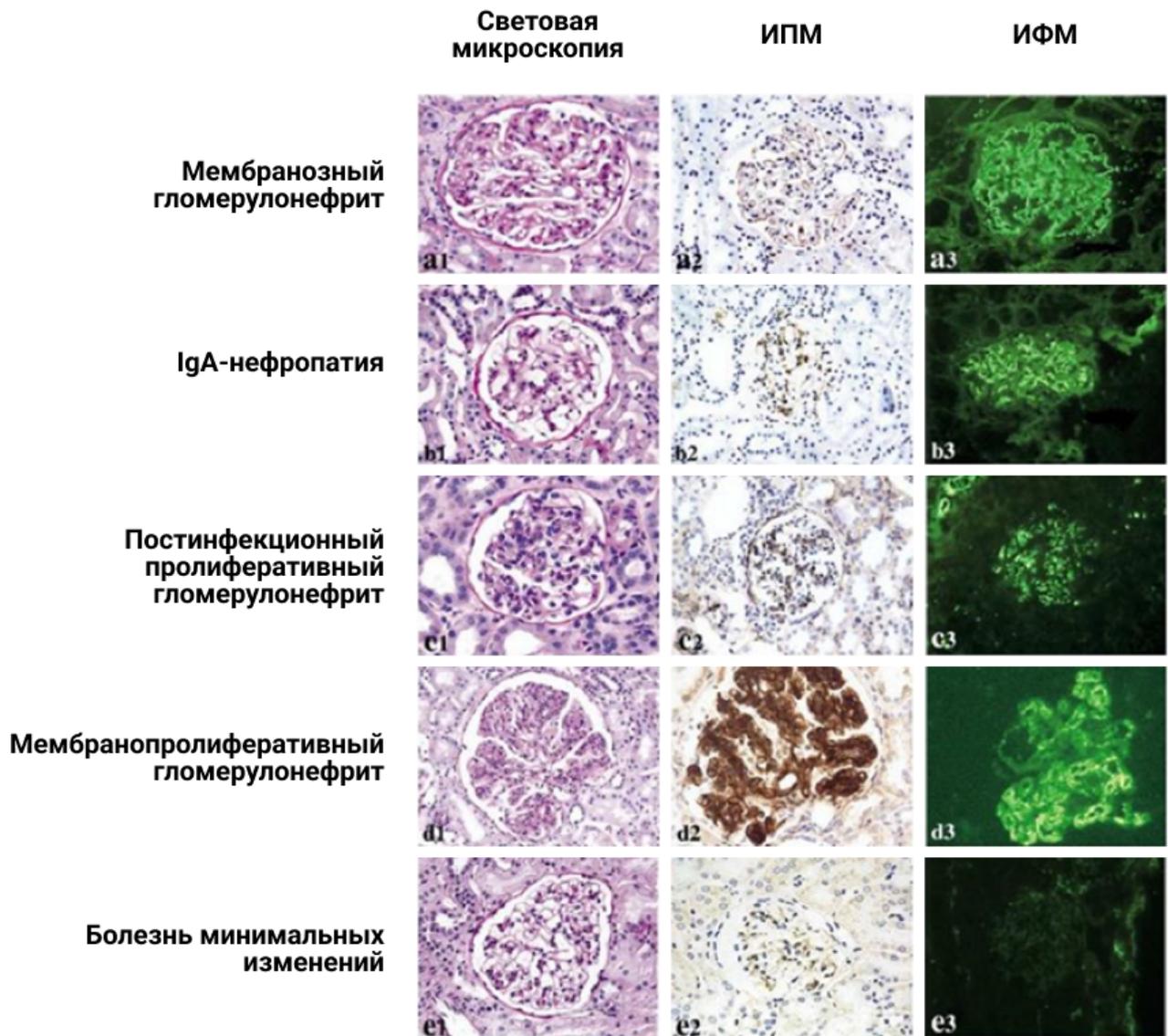
- Иммунопероксидазный метод основан на окислении донора электронов комплексом ферментной метки (пероксидаза) с субстратом (антиген). Некоторые доноры электронов при окислении окрашиваются и поэтому называются хромогенами. На этом эффекте основана окраска клеточных

маркеров, определяющих специфический фенотип.

- При иммунофлюоресцентном методе антитела химически конъюгируют с флюоресцентными красителями. Меченые антитела связываются с интересующим антигеном, что позволяет обнаружить его с помощью флюоресценции.

Как выглядят под микроскопом гломерулопатии, исследованные при помощи иммунопероксидазного и иммунофлюоресцентного методов¹?

Image



В каждом случае отмечается сходство паттернов иммуногистохимических реакций при применении ИПМ и ИФМ. В контексте болезни минимальных изменений ИПМ позволяет определять слабые мезангиальные отложения IgM, которые не обнаруживаются методом ИФМ. Благодаря ИПМ можно наблюдать структуру ткани и выявлять закономерные связи между такой структурой и иммуногистохимической реакцией, тогда как визуализационная возможность ИФМ не столь очевидная для изучения гистоархитектоники ткани¹.

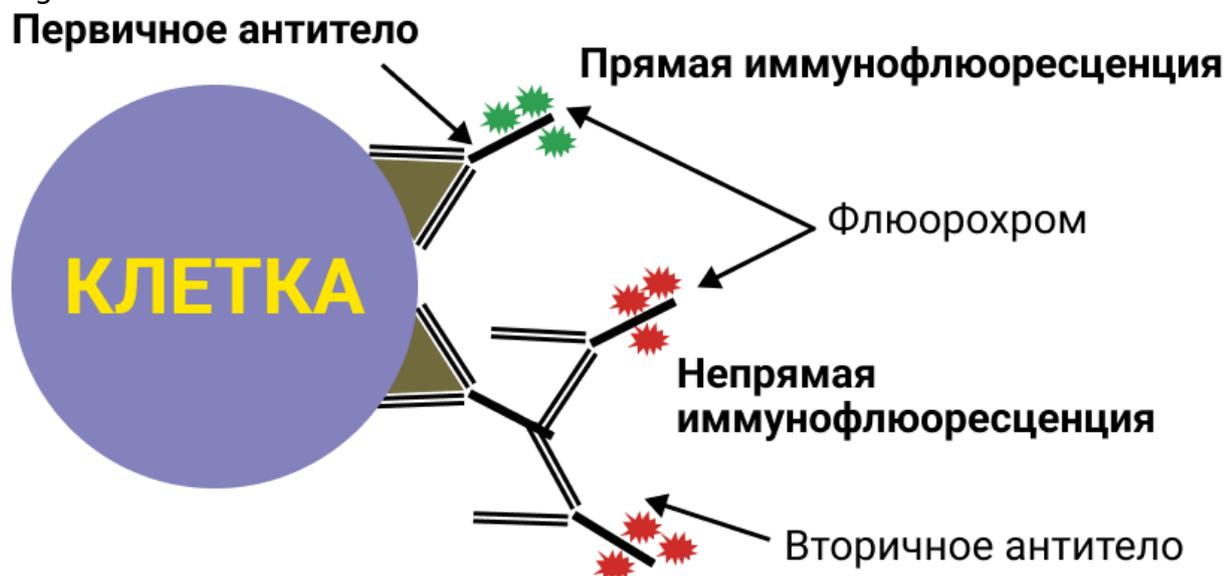
Имунофлюоресцентная микроскопия в нефрологии: «золотой стандарт» или нет?

Более пятидесяти лет ИФМ остается наиболее распространенным методом для обнаружения и визуализации различных молекул в биологических образцах, а также считается «золотым стандартом» при исследовании биоптатов почки. ИФМ представляет собой метод визуализации антигенов с использованием антител, меченных флюорохромом. Это распространенная лабораторная методика, применяемая в различных областях медицины. Данное решение, основанное на исследованиях Кунса и Каплана, широко используется как в научных работах, так и в клинической практике. Области его применения включают оценку параметров клеток в суспензии, культуры клеток, тканей, сфер и микроматриц для обнаружения специфических белков. ИФМ может проводиться как на свежих, так и на фиксированных образцах.

При проведении ИФМ антитела химически связываются с флюоресцентными красителями, такими как флюоресцеин изотиоцианат (FITC) или тетраметил-родамин изотиоцианат (TRITC). Существуют два способа проведения ИФМ: прямой и непрямой.

В первом случае само антитело против интересующего белка химически маркируется флуоресцентным красителем. При непрямой ИФМ первичное антитело не маркируется, а метку несет вторичное антииммуноглобулиновое антитело, направленное против определенной части молекулы первичного антитела^{2,3}.

Image



Преимущества и недостатки прямой и непрямой иммунофлуоресценции²

Image

Преимущества

Прямая иммунофлюоресценция

- Процесс окрашивания образцов быстрее и проще. Для использования антител одного вида (например, двух моноклональных мышиных) рекомендуется прямой метод окрашивания.
- Стандарты в диагностике заболеваний обычно ориентированы на прямую ИФМ.

Непрямая иммунофлюоресценция

- Более высокая чувствительность по сравнению с прямой ИФМ.
- Амплификация сигнала при непрямой ИФМ происходит благодаря возможности связывания более чем одного вторичного антитела с одним первичным.
- Вторичные антитела, имеющиеся на рынке, обычно более доступны по цене, имеют широкий выбор цветов и легче поддаются контролю качества. Также есть возможность хранения образцов и повторного проведения реакций.

Недостатки

Прямая иммунофлюоресценция

- Требуется быстрая доставка образцов в лабораторию, а также наличие криостатного микротомата и специализированного микроскопа.
- Изготовленные микропрепараты не могут быть сохранены и отсканированы, и реакцию невозможно повторить.

Непрямая иммунофлюоресценция

- Низкая специфичность; для мультиокраски требуется поиск антител различных видов или изотипов.
- Образцы с эндогенным иммуноглобулином могут иметь значительное фоновое окрашивание.
- Возможны как ложноположительные, так и ложноотрицательные реакции. Для улучшения качества необходимо немедленно помещать образцы в формалин.

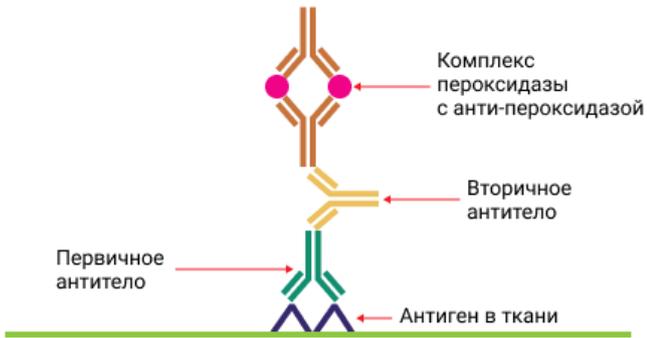
Эволюция иммунопероксидазного метода: от пероксидазной техники до новых перспектив

В 1968 году была предложена пероксидазная методика ИГХ, которая не только стала первым способом окраски антителами парафиновых срезов, но и помогла преодолеть некоторые ограничения ранее применявшихся флюоресцентных исследований. С самого начала существовало беспокойство относительно недостаточной воспроизводимости результатов ИПМ в отношении фиксированных формалином и залитых в парафин препаратов, а также воспроизводимости результатов как в пределах одной лаборатории в разные дни, так и в иных лабораториях. По мере развития техник ИПМ их область применения в диагностических и исследовательских целях расширяется. Многочисленные способы амплификации значительно улучшили метод, позволив обнаружить множество антигенов, выявление которых при фиксации или заливке в парафин ранее считалось невозможным. С развитием технологий появляются новые панели маркеров, обеспечивающие более глубокое понимание этиологии и патогенеза заболеваний⁴.

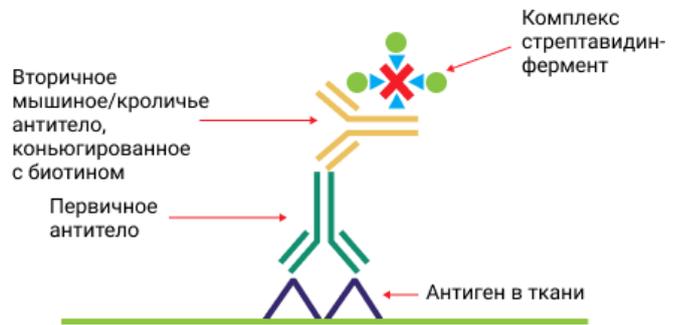
Различные варианты окрашивания при иммунопероксидажном методе²

Image

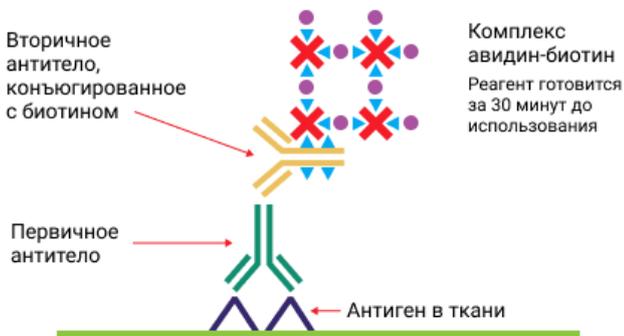
Пероксидазно-антипероксидазный метод (PAP)



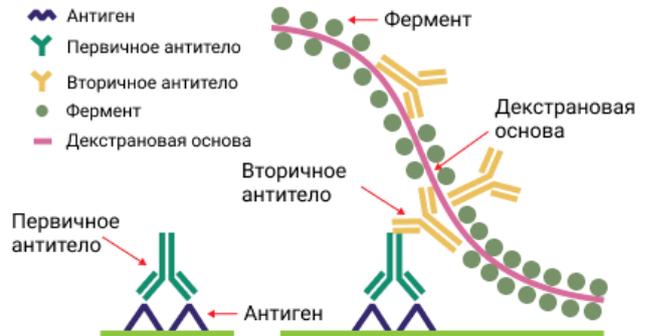
Методика с меченым стрептавидин-биотином (LSAB)



Авидин-биотиновая непрямая методика (ABC)



Двухэтапный полимерный метод (EnVision™)



Место иммунофлуоресцентного и иммунопероксидазного методов в диагностике гломерулопатий: что же лучше?

Современные методы ИФМ и ИПМ продолжают совершенствоваться, и каждый из них обладает своими достоинствами и недостатками, предоставляя исследователям и клиницистам обширный инструментарий, который значительно влияет на процесс иммунодиагностики¹.

ИПМ и ИФМ: основные преимущества и недостатки методов¹

Image

Преимущества

Иммунопероксидазный метод

- Материал долго хранится.
- Есть возможность провести и сравнить результаты СМ и ИПМ на одном и том же образце, что исключает необходимость в первоначальной специализированной обработке (например, при помощи криотехники).
- Полученные продукты являются стойкими, что позволяет архивировать слайды для последующего просмотра.
- Возможна дальнейшая обработка сохраненной ткани, залитой в парафин.
- Для пациентов с единственной почкой и других пациентов из группы высокого риска достаточно провести только одну биопсию для исследования при помощи как СМ, так и ИПМ, а также электронной микроскопии.

Иммунофлюоресцентный метод

- Высокая чувствительность (95–98%).
- Меньшее количество ложноположительных результатов.
- Упрощенная подготовка к проведению исследования.
- Нет необходимости в накоплении большого объема образцов перед началом исследования.
- Использование зарегистрированных стандартизованных реагентов.
- Более отчетливое представление морфологической картины.
- Высокая воспроизводимость результатов.
- Схожая стоимость ИПМ и ИФМ. Стоимость основного реактива выше, но общие затраты остаются невысокими.

Image

Недостатки

Иммунопероксидазный метод

- Чувствительность 73–86%.
- Необходимо немедленно помещать биоптат в раствор формалина (есть риск отсутствия клубочков в образце).
- Неотложная фиксация играет ключевую роль. Задержка фиксации тканей на несколько минут приводит к диффузной положительной реакции белков плазмы, которую нельзя устранить с помощью обработки протеазой.
- Расщепление протеазами обязательно для выявления иммуноглобулинов и комплементарных факторов в тканях, зафиксированных формальдегидом. Без достаточного расщепления окрашивание реакций невозможно.
- Интенсивность фоновой реакции высока, часть белка маскируется, что может привести к гипердиагностике и ложным результатам.
- Недостаток зарегистрированных антител.
- Методика недостаточно стандартизирована. Антитела, оборудование и реагенты поступают от разных производителей.
- Стоимость основных реактивов ниже, однако есть затраты на дополнительные реагенты (вторичные антитела и др.) и на оборудование для окраски.

Иммунофлюоресцентный метод

- Необходимость обработки других образцов ткани для СМ и ЭМ.
- Требуется использование свежих тканей, для чего необходим отдельный образец, специализированная обработка и специальные условия транспортировки.
- Необходимость в специальном микроскопическом оборудовании для обнаружения флюоресценции.
- Образцы неустойчивы из-за потери своих свойств, в связи с чем их невозможно хранить и возникает потребность в немедленной документации наблюдений.
- Интерпретация результатов требует определенного уровня квалификации и опыта эксперта из-за связанных с ней трудностей (например, в случае аутофлюоресценции тканей и необходимости распознавания паттернов, поскольку визуализируется только положительная реакция).
- Дополнительные проходы иглы повышают риск осложнений, связанных с процедурой биопсии, таких как кровотечение и повреждение тканей.

ИФМ и ИПМ: о чем говорят результаты клинических исследований?

В 2015 году были опубликованы результаты клинического исследования, проведенного профессором Мохаммадом Джафари и его коллегами. Авторы исследования пришли к выводу о том, что по сравнению с ИФМ ИПМ показывает уступающий диагностический уровень: чувствительность ниже на 11,45%, а специфичность меньше на 30,78%. Несмотря на то что ИПМ имеет более низкую общую прогностическую ценность, чем ИФМ, его воспроизводимость позволяет ему оставаться альтернативным или резервным способом исследования биопсийных материалов почек, особенно в случаях, когда проведение ИФМ не дает значимых результатов или недоступно⁵.

Образцы почечной биопсии, окрашенные IgG, IgM, C1q, IgA и C3c методами ИФМ и ИПМ¹

Image

ИФМ/ИПМ	a (+/+)	b (-/+)	c (+/-)	d (-/-)	Кол-во	Чувствительность*	Специфичность**	Хи-квадрат***	P
						a/(a+c)	d/(b+d)		
IgG	23	5	9	42	79	0,72	0,89	0,64	> 0,2
IgA	24	3	6	48	81	0,8	0,94	0,44	> 0,2
IgM	40	29	1	9	79	0,98	0,24	24,3	< 0,001
C1q	26	45	0	8	79	1,0	0,15	43,02	< 0,001
C3c	47	9	9	15	80	0,84	0,63	0,05	> 0,2
Σ	160	91	25	122	398	0,86	0,57	36,42	< 0,001

Данные клинического исследования д.м.н. Йохана Молне и соавторов показали совпадение заключений для этих методов лишь в 71% случаев (282 из 398 наблюдений). Большинство расхождений (74 из 116) были положительными по ИПМ, с мезангиальными отложениями IgM и C1q, которые не были обнаружены методом ИФМ. Статистически значимых различий в результатах между ИФМ и ИПМ для IgG, IgA и C3c не было ($P > 0,2$), однако для маркеров IgM, C1q отмечалась значимая разница в их детекции ($P < 0,001$)¹.

По данным другого клинического исследования, описанного Свасти Шубхамом и соавторами, подтвердилось отсутствие различий в результатах между ИФА и ИПМ для IgA, IgM и IgG. При этом статистически значимые различия были обнаружены в результатах оценки белков комплемента, что несколько снижает ценность ИПМ в диагностике комплемент-опосредованных заболеваний⁶.

Перспективы иммуногистохимического анализа нефробиоптата: о чем стоит помнить клиницисту?

Метод ИФМ для изучения ткани почек остается «золотым стандартом» нефробиопсии, обеспечивающим самую высокую чувствительность среди тканевых исследований компонентов комплемента и иммуноглобулинов. Он обладает множеством преимуществ и подтвердил свою ценность в выявлении расположения известных антигенов в клетках или специфических последовательностей ДНК в хромосомах. Благодаря сочетанию высокой чувствительности и мощного разрешения при визуализации антигенов ИФМ остается одним из основных методов исследования на протяжении многих лет, что объясняет необходимость ее использования патологами. При этом продолжают развиваться новые методы с применением амплификации, тем самым предоставляя исследователям и клиницистам широкий арсенал инструментов для диагностики. Важно отметить, что при выборе способа проведения исследования важную роль играет опыт использования морфологом того или иного метода диагностики, что существенно влияет на точность постановки диагноза.

Список сокращений

ИГХ — иммуногистохимическое исследование;

ИПМ — иммунопероксидазный метод;

ИФМ — иммунофлюоресцентная микроскопия;

СМ — световая микроскопия;

IgA — иммуноглобулин А;

IgM — иммуноглобулин М;

FITC (fluorescein isothiocyanate) — флуоресцеин изотиоцианат;

TRITC (tetramethylrhodamine isothiocyanate) — тетраметил-родамин изотиоцианат;

PAP (peroxidase, anti-peroxidase) — пероксидазно-антипероксидазный метод;

LSAB (labeled streptavidin-biotin) — методика с меченым стрептавидин-биотином;

ABC (avidin-biotin-peroxidase complex) — авидин-биотиновая непрямая методика;

EnVision™ — двухэтапный полимерный метод;

ЭМ — электронная микроскопия.

Список литературы

1. Johan Mölne, Michael E. Breimer, Christian T. Svalander. Immunoperoxidase versus immunofluorescence in the assessment of human renal biopsies. *American Journal of Kidney Diseases*, 2005; 45(4): 674-683.
2. Иммуногистохимические методы: Руководство / Ed. by George L. Kumar, Lars Rudbeck.: DAKO / Пер. с англ. под ред. Г.А. Франка и П.Г. Малькова. — М., 2011. — 224 с.
3. Zaqout S, Becker LL and Kaindl AM. Immunofluorescence Staining of Paraffin Sections Step by Step. *Front. Neuroanat.* 2020. 14:582218. doi:10.3389/fnana.2020.582218.
4. Nakene PK. Simultaneous localization of multiple tissue antigens using the peroxidase labeled antibody method: A study of pituitary glands of the rat. *J Histochem Cytochem.* 1968; 16: 557-560.

5. Jafari M, Monsef-Esfahani A, Solimani B. Diagnostic value of immunoperoxidase staining and immunofluorescence in the study of kidney biopsy specimens. Iran J Kidney Dis. 2015; 9(4): 286–90.
6. Shubham S, Bhardwaj M, Mahapatra HS. Comparative evaluation of immunoperoxidase versus immunofluorescent techniques in interpretation of kidney biopsies. Indian J Pathol Microbiol. 2016; 59(3): 305–9.

11207218/Iptacopan/Dig/06.24/0

Вам также может быть интересно

Image

Хотите всегда оставаться в курсе последних событий в нефрологии?

У Вас есть возможность бесплатно подписаться на новости и быть в числе первых, кто будет узнавать об обновлениях в клинических рекомендациях, вестей с зарубежных и российских конгрессов, а также мнений экспертов по самым сложным и дискуссионным вопросам.



Помогипочкам.рф

Сайт для пациентов о заболеваниях почек

[Перейти](#)

Телеграм канал помогипочкам.рф

Путеводитель по редким заболеваниям почек для пациента

[Перейти](#)

Source URL:

<https://www.pro.novartis.com/ru-ru/therapeutical-areas/nefrologiya/immunoperoksidaznyy-analiz-ili-immunoflyuorescenciya-kakoy-metod-bolee-dostoveren-dlya-interpretacii-pochechnoy-biopsii>