

Autoimmun encephalitis

labordiagnosztikai vonatkozásai

Az autoimmun encephalitisekhez társuló
autoantitestek diagnosztikai jelentősége

dr. Beleznay Zsuzsanna

Semmelweis Egyetem Laboratóriumi Medicina
Intézet Immunológiai Laboratórium

2019.05.28.



Immun-közvetített encephalitis

paraneopláziás
(onkoneurális)
encephalitis

autoimmun
encephalitis

A **tumor**os szövetekben olyan vázelemek jelennek meg, amelyek normális körülmények között nincsenek jelen.

Ha a beinduló immunvédekezés során termelődő immun sejtek átjutnak a BBB-en, és az idegrendszerben találkoznak a tumoros alkotókhöz hasonló szerkezetű, de funkcionális alkotókkal - autoimmun reakciót indítanak be.

Neuronális sejtfelszíni fehérjék és szinaptikus alkotók (receptorok, ion vagy metabolit csatornák, ill. ezekhez kapcsolódó regulátor fehérjék) ellen termelődő autoantitestek által kiváltott encephalopathia.

Ismeretlen etiológiájú.



Professor Rolf Zinkernagel

„...an autoimmune disease is a viral disease in which the virus is unknown’

“Viral déjà vu”

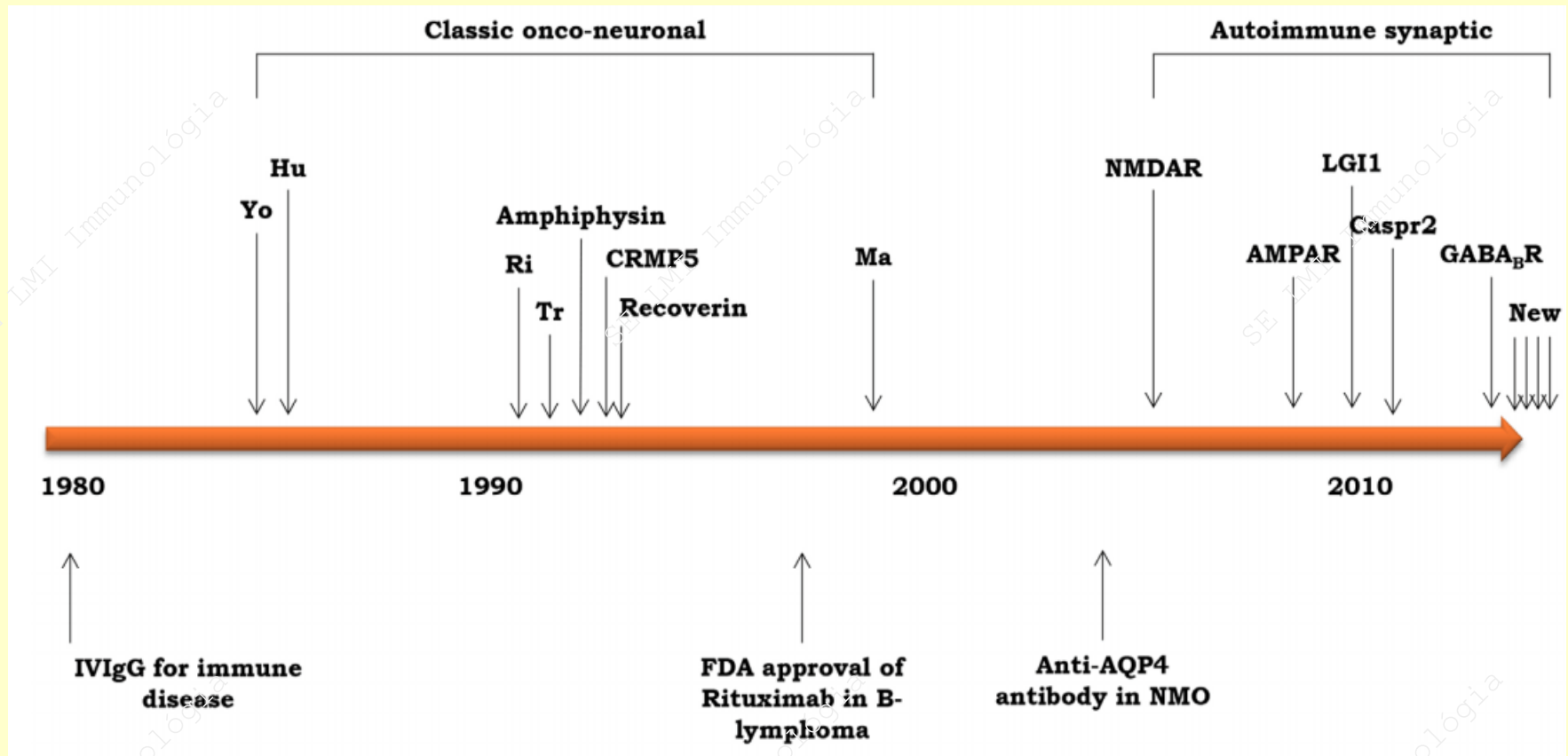
90-es évek



Aichele P, Bachmann MF, Hengartner H, Zinkernagel RM (1996) Immunopathology or organ-specific autoimmunity as a consequence of virus infection. Immunol Rev 152:21–45



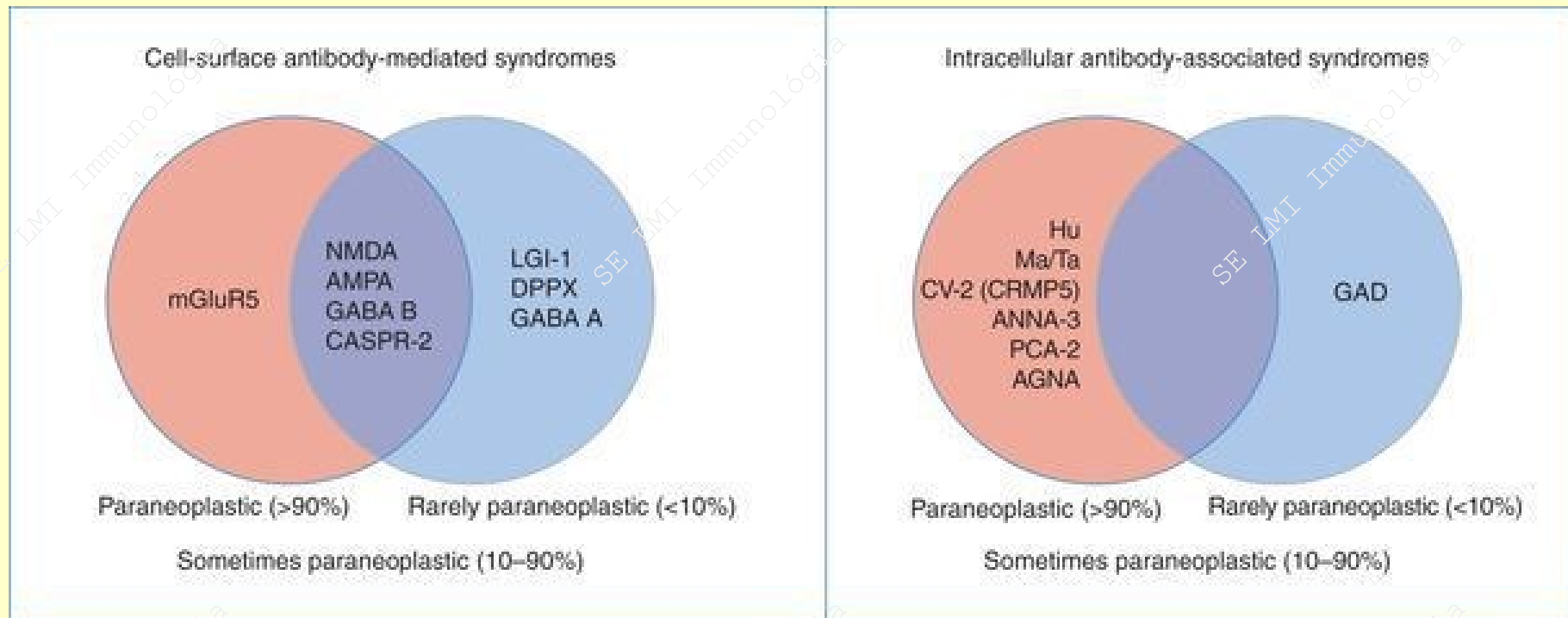
Autoantitestek időrendi leírása



Lee, S K & Lee, S-T: The Laboratory Diagnosis of Autoimmune Encephalitis
Journal of Epilepsy Research 2016; 6(2): 45-52.



Az intraneuronális és szinaptikus antitestek paraneopláziás előfordulása



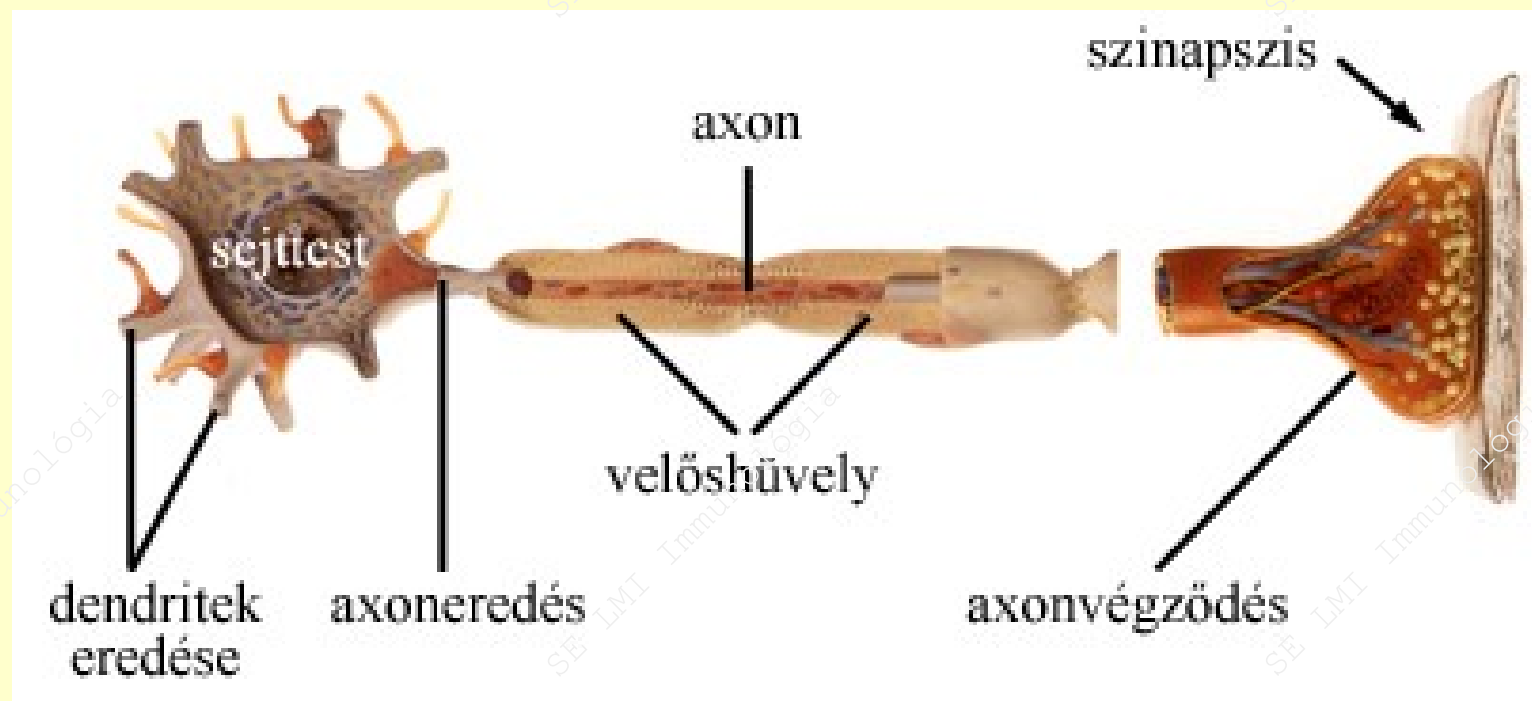
A klasszikus onkoneuronális autoantitestek esetében mindig szükséges a tumorkutatás.

Az autoimmun encephalitisre jellemző szinapszishoz kötött receptor és ion/metabolit csatornák esetében alacsony a neopláziás esetek száma.

Antineuronális autoantitestek osztályozása

neuronális intracelluláris
autoantigének

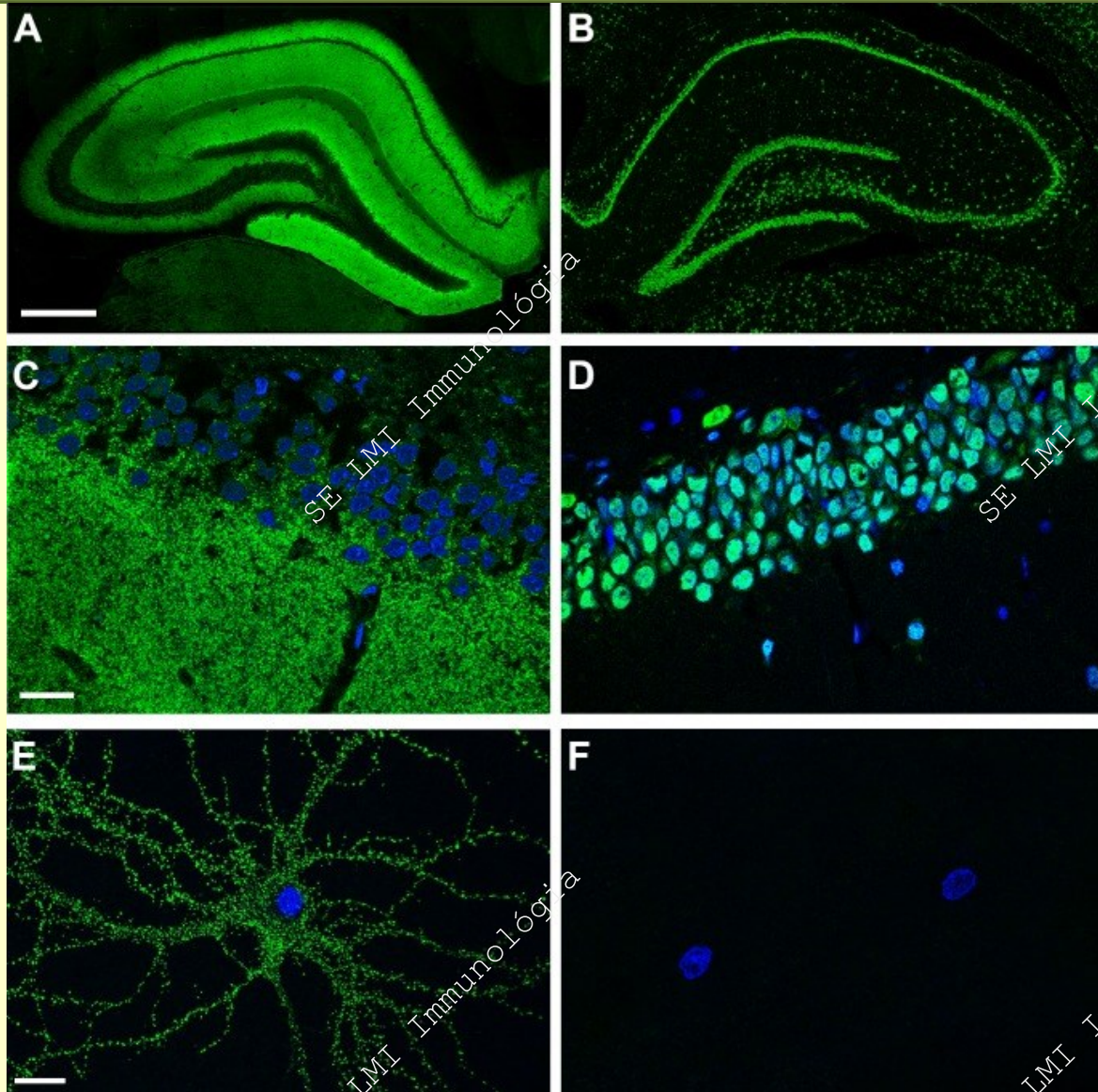
szinaptikus autoantigének
extracelluláris
(intracelluláris)



Sejtfelszíni és intracelluláris neurológiai antitestek az agyban

NMDAR

Hu



Általános szűrés majom cerebellumon immunfluorescens módszerrel

- A szinapszishoz kötött antitestek neuropil festődést mutatnak, és a legjobb szövet erre a hippocampus, kisebb intenzitással, de hasonló reakció látható a cerebellumon
- Az onkoneuronális v. klasszikus paraneopláziás antitestek meghatározása a cerebellum jól elkülöníthető rétegeiben a legnagyobb intenzitású
- A gyárilag előállított majom kisagy metszet nem fixált szövet → az antigének intaktak
- Az intracelluláris antigén esetén az antitest hozzáférhetőség kérdéses lehet -> detergens használatával a sejtmembrán átjárható



Cerebellum

Cerebellar
folia

White matter

molekuláris réteg

granuláris réteg

Purkinje sejtek

fehér -
állomány

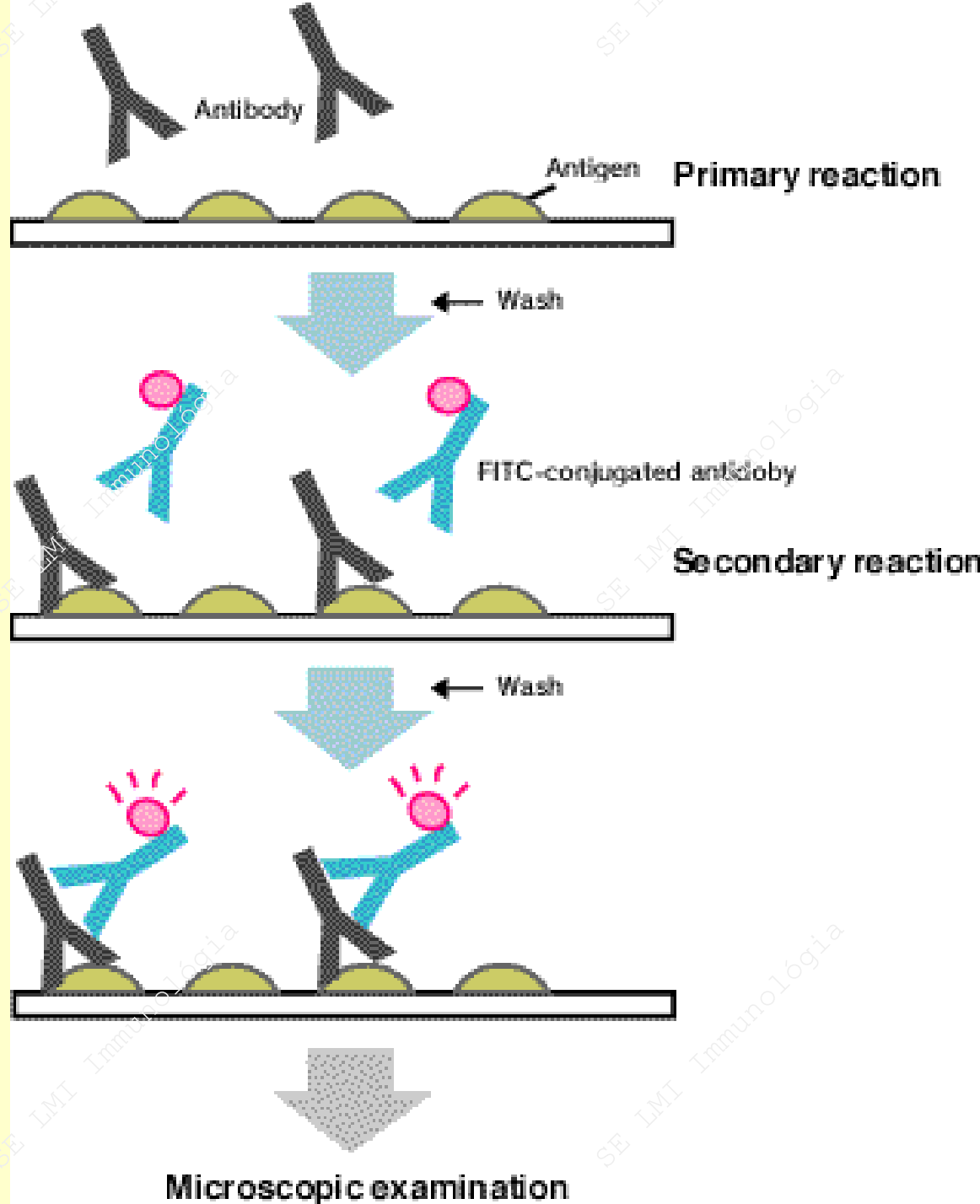


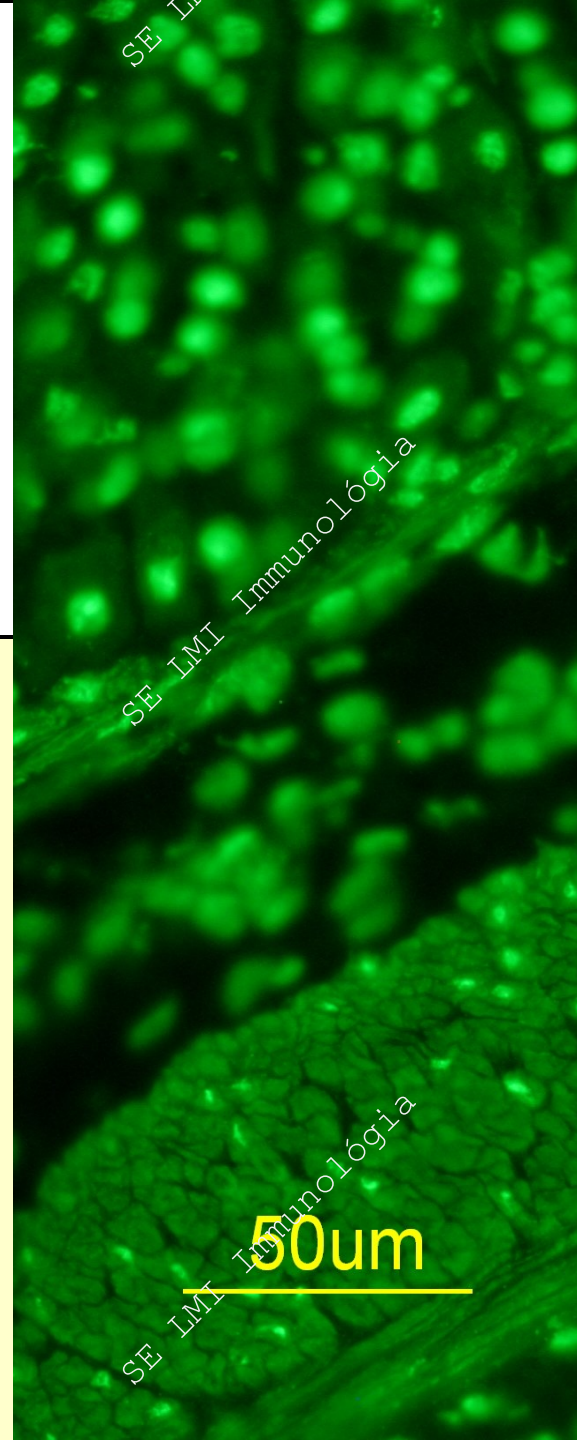
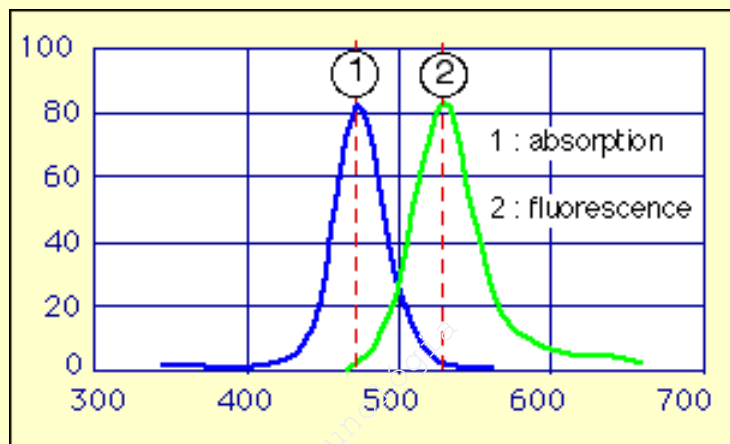
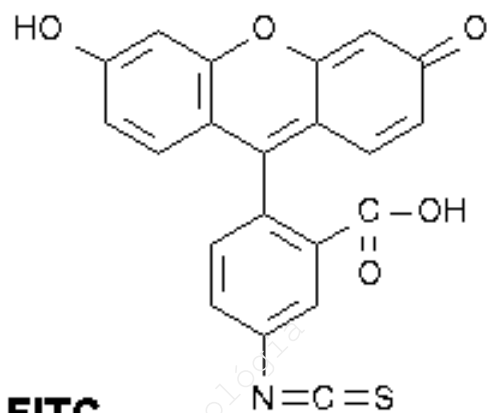
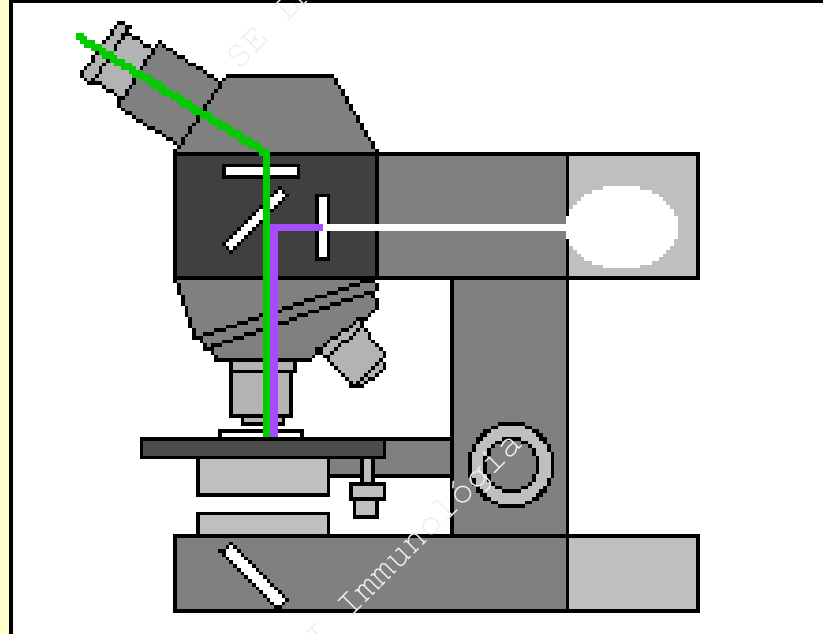
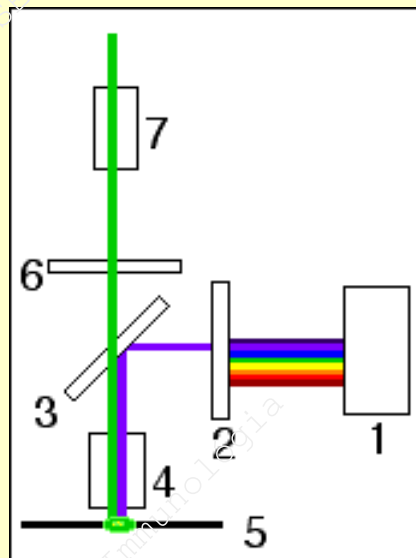
indirekt immun- fluoreszcencia



Szubsztrát:

- szövetek
(szerv specifikus)





Onkoneuronális intracelluláris autoantitestek

Cerebellum granuláris réteg
Hu, Ri

granuláris réteg

50um



PC

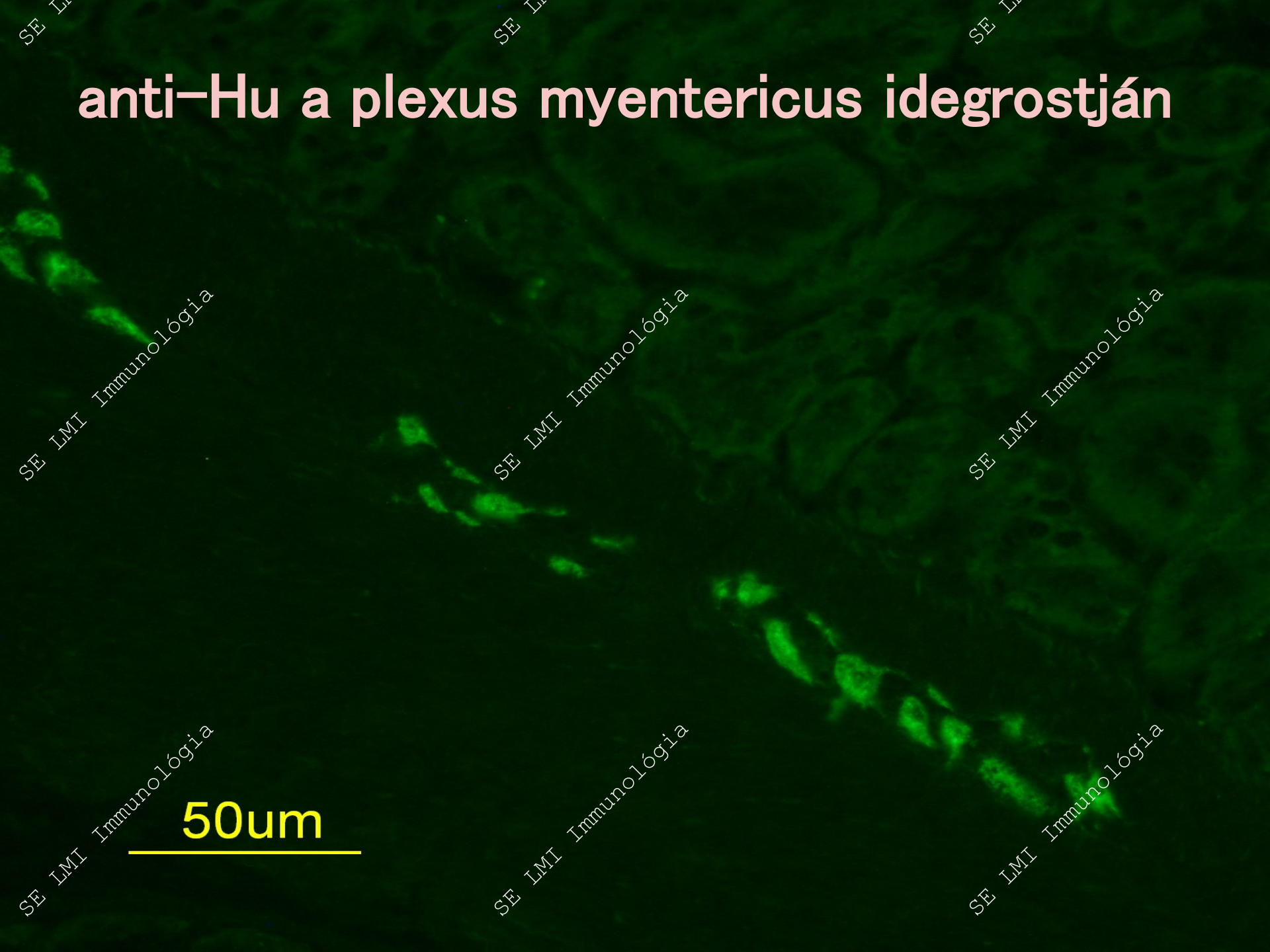
ANNA-1/Hu
ANNA-2/Ri

aprósejtes tüdőkarcinóma

petefészek- és emlőkarcinóma

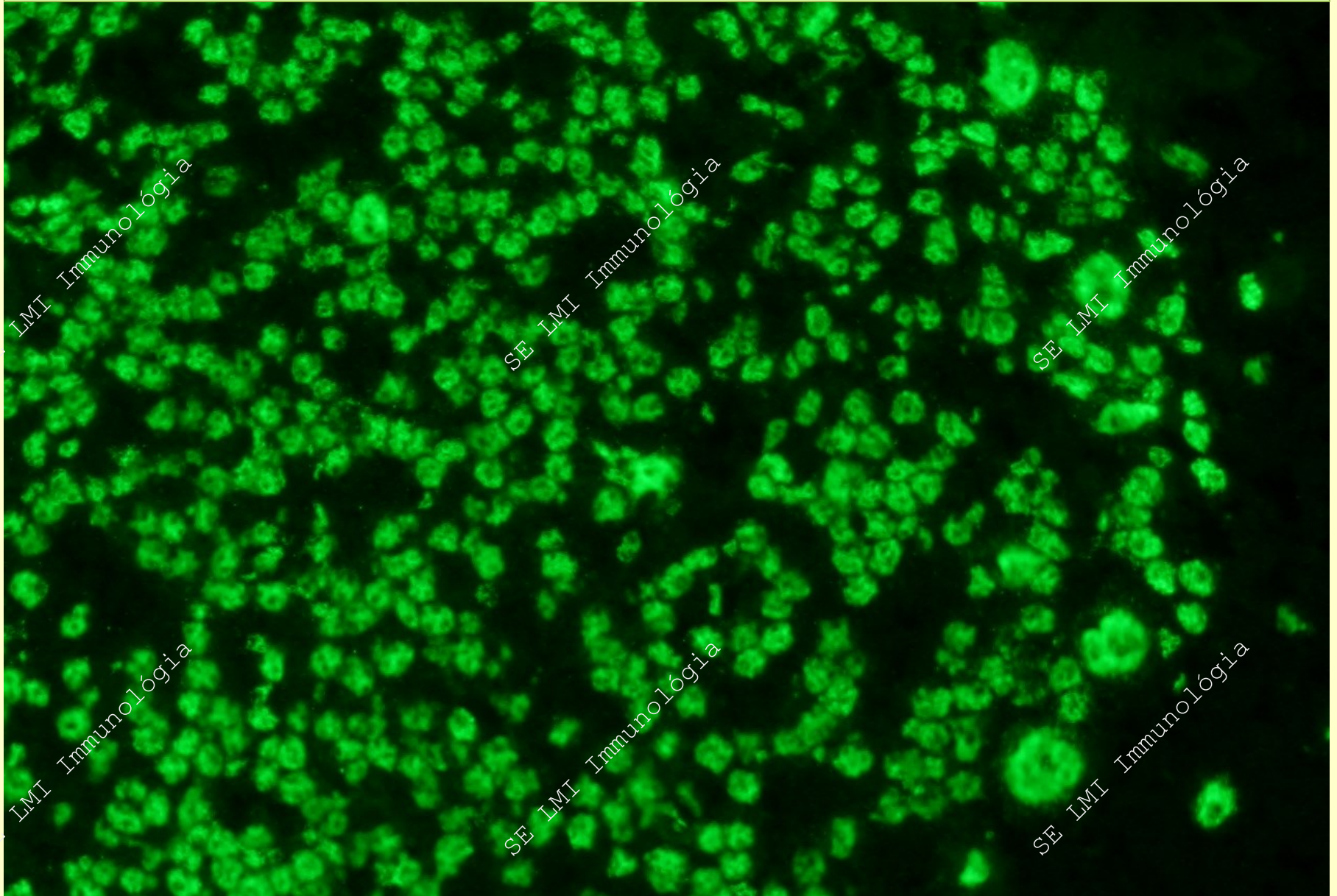
50um

anti-Hu a plexus myentericus idegrostján



50um

Antinukleáris antitest zavarja a leolvasást



Onkoneuronális intracelluláris autoantitestek

Cerebellum Purkinje-sejtek
Ma1/2
Tr (DNER)

anti- Ma autoantitestek



cerebrális neuronok sejtmagja

heretumor

50um

majom cerebrum



SE LMI Immunológia

SE LMI Immunológia

SE LMI Immunológia

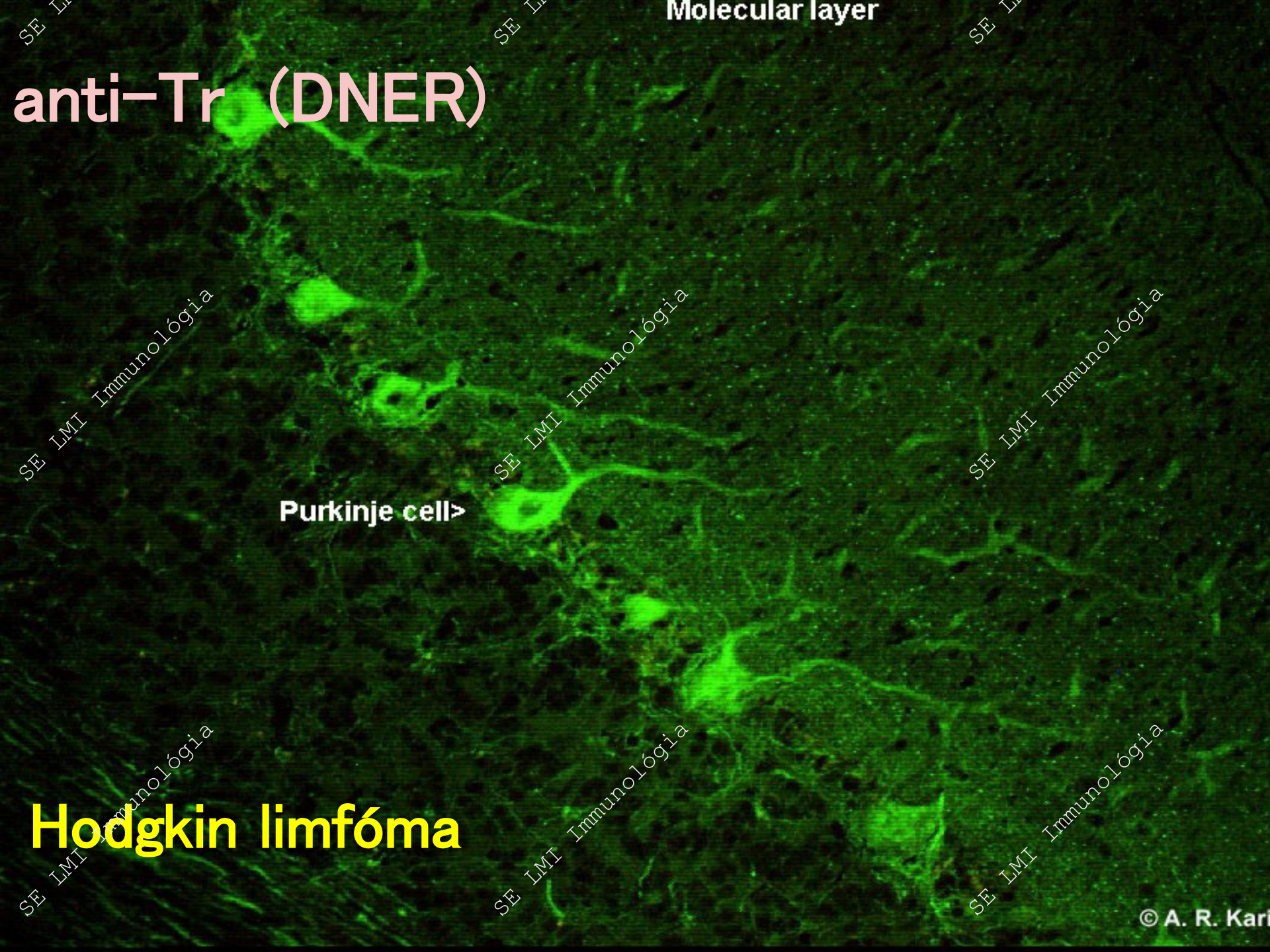
SE LMI Immunológia

SE LMI Immunológia

SE LMI Immunológia

Ma-1/Ma-2 differenciál analízise

majom here



Molecular layer

anti-Tr (DNER)

Purkinje cell>

Hodgkin limfóma

© A. R. Karl

A paraneopláziás encephalitisben előforduló tumor fajták

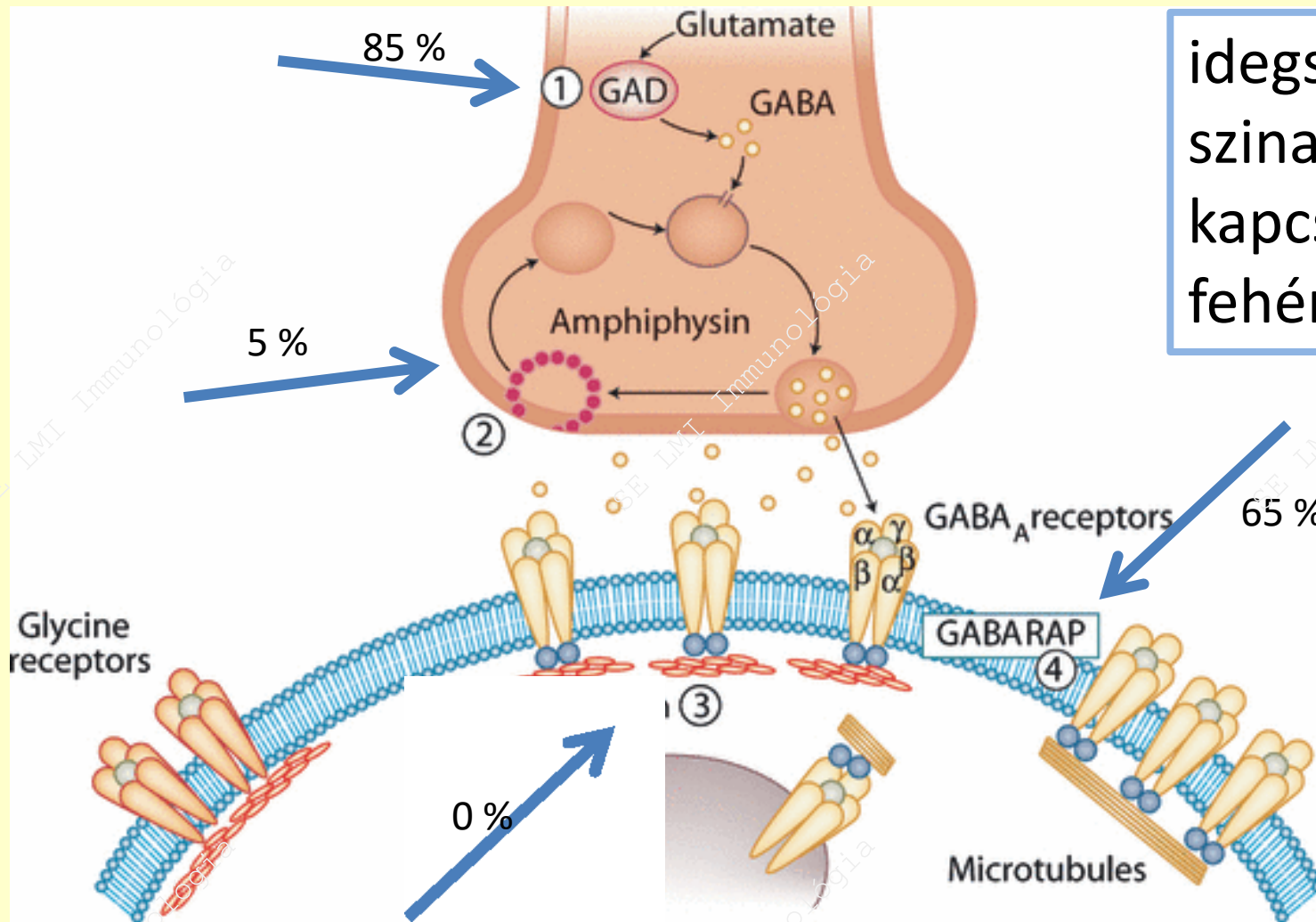
- aprósejtes tüdőkarcinóma
- emlőkarcinóma
- petefészek tumor
- heretumor
- Hodgkin limfóma

Nincs éles határvonal a
paraneopláziás és autoimmun
encephalopátiák között

Intracelluláris autoantitestek a szinapszis végződéseken

neurológiai GAD
amphiphysin
(GABA_A RAP)

GAD-encephalitis



idegsejtek gátló
szinapszisához
kapcsolódó
fehérjék

agytörzs

agy

Stiff-person spektrum betegségek - GAD encephalitis

- A stiff-person (merev ember) szindróma ritka neurológiai tünetegyüttes
- az **axiális izomzat progresszív merevsége,**
- az **agonista és az antagonist izmok egyidejű kontrakciója,**
- időnként **akaratlan izomgörcsök**
- fokozott **érzékenység az ingerekre** (a zaj, érzelmi stressz), ami izomgörcsöket indít el



Neurológiai GAD elleni antitest

molekuláris réteg

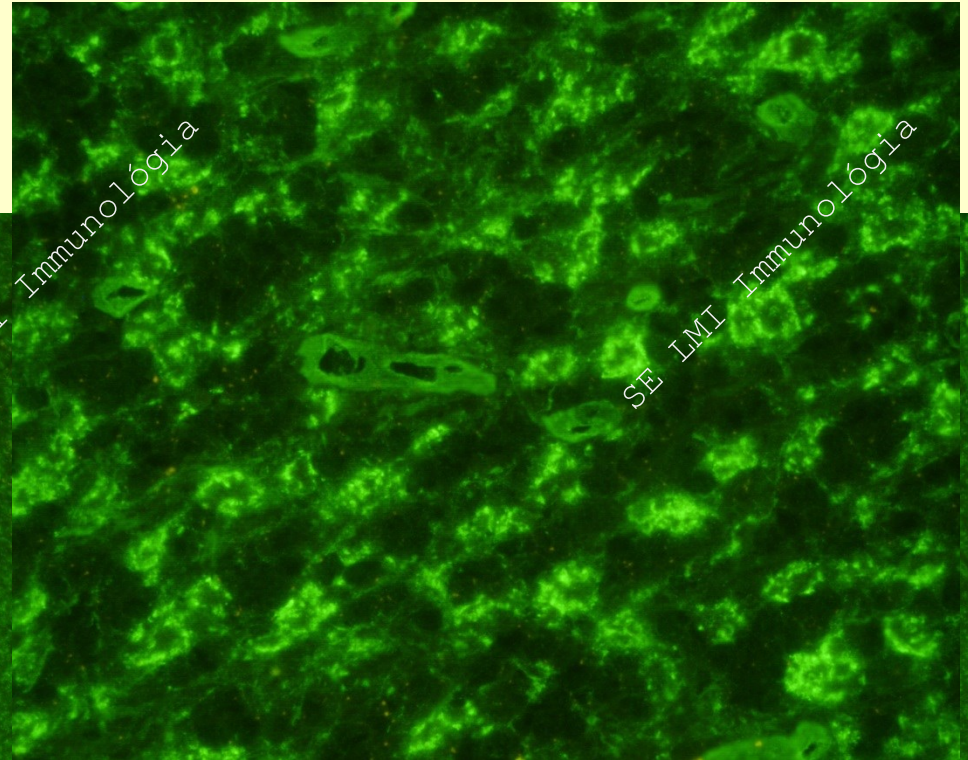
granuláris réteg

fehérállomány

majom cerebellum IIF

Azonos antigén – más kórkép

Endokrin Pancreas
IDDM



Majom cerebellum
Stiff-person szindróma



Nem keresztreakció!

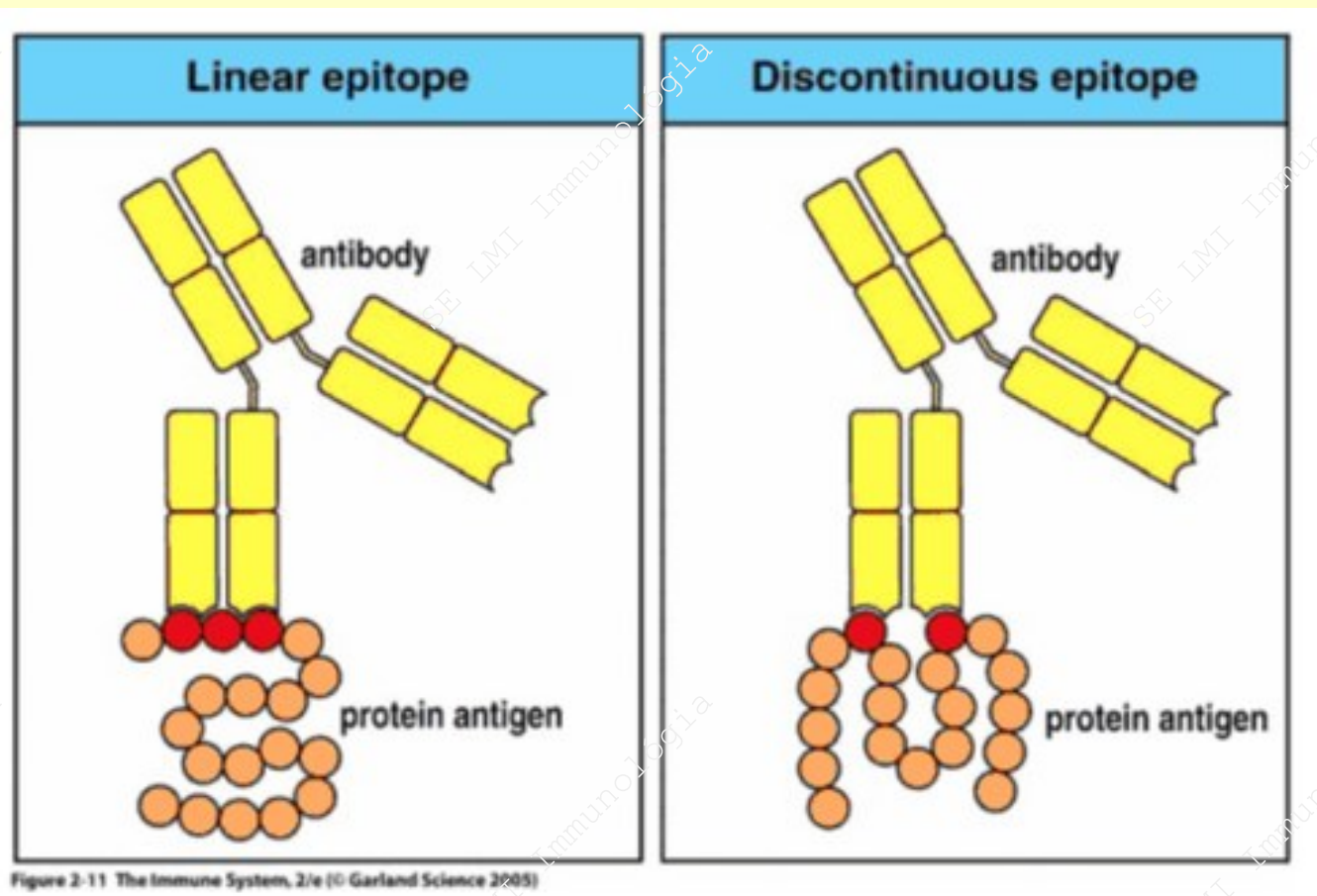
- **Autoantigen:** Glutamatdecarboxylase (**GAD**)
- **Insulin-függő Diabetes Mellitus**
 - GAD 65kDa *konformációs epitóp*
radioimmunassay
- **Stiff-person spektrum betegségek**
 - GAD 65/67 kDa

ELISA

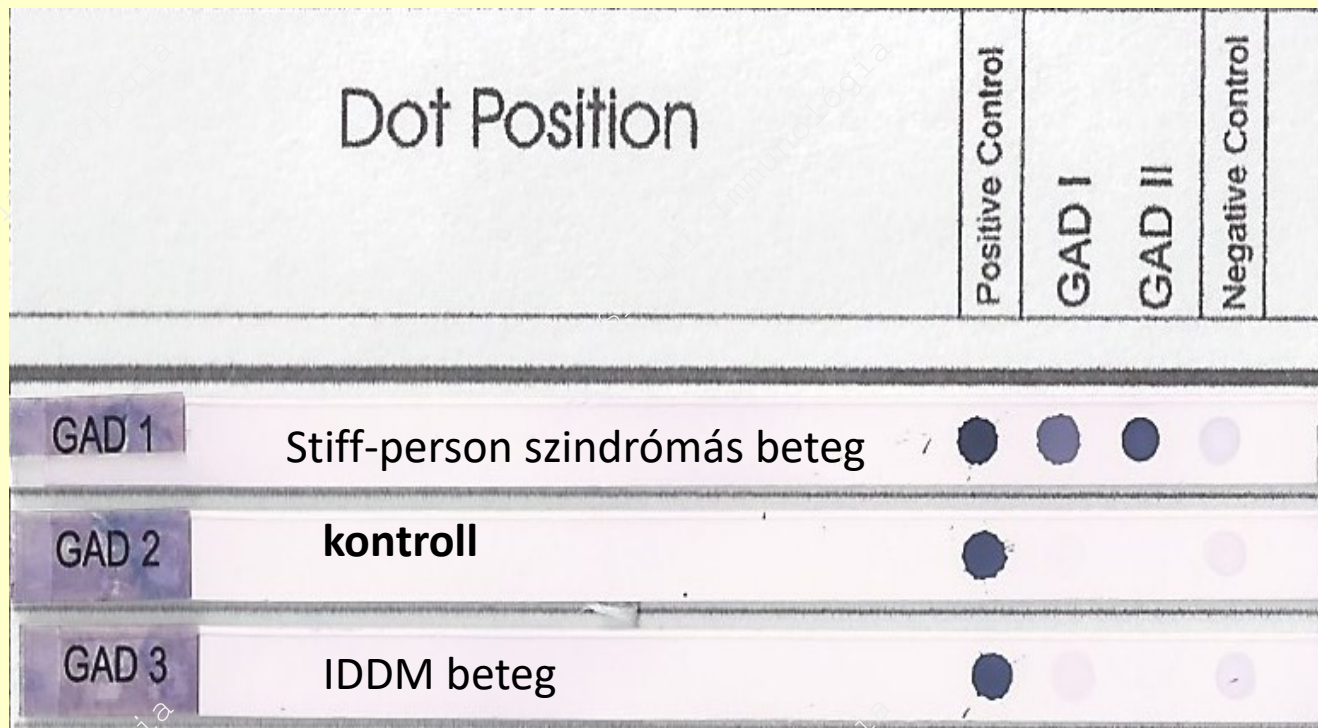
lineáris epitóp
immunoblot-analízis



lineáris epitóp - konformációs epitóp



Dot Blot neuronális anti-GAD kimutatására



Általánosan – a klasszikus
onkoneuronális antitestek
lineáris epitóppal, míg a
sejtfelszíni – receptor –
autoantitestek konformációs
epitóppal rendelkeznek

Szinapszis felszíni – receptor -autoantitestek meghatározás általános irányelvei

- Általános javaslat szérum és CSF minta párhuzamos analízise (érzékenység: **CSF > szérum**)
- Időfaktor fontos! A betegség megjelenése és a kezelés elkezdése között eltelt időre a határvonal **40 nap**.
- A szűrés mindig a kezelés megkezdése előtti mintából történjék
- **IgG izotípus** (IgG1/IgG4), IgA skizofréniában, IgM kérdéses
- betegség lefolyásával CSF titer jobban korrelál (?)

Improving the antibody-based evaluation of autoimmune encephalitis

Table 2

Number of true-positive and true-negative cases (as determined by the clinical testing kits and research laboratory, or research laboratory alone) along with corresponding sensitivity and specificity measures of the commercial testing kits

	True positive	True negative	Sensitivity	Specificity
NMDAR serum	50	240	86% (n = 43)	99.2% (n = 238)
NMDAR CSF	38	399	92.1% (n = 35)	99.8% (n = 398)
LGI1 CSF	8	237	62.5% (n = 5)	100% (n = 237)
Caspr2 CSF	3	242	66.7% (n = 2)	100% (n = 242)
AMPA CSF	1	422	0% (n = 0)	100% (n = 244)
GABA _B	4	241	100% (n = 4)	100% (n = 241)
GAD65	7	238	100% (n = 7)	100% (n = 238)

Abbreviations: AMPA = α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid; Caspr2 = contactin-associated protein-like 2; LGI1 = leucine-rich glioma-inactivated 1; GABA = γ -aminobutyric acid; GAD65 = glutamic acid decarboxylase 65 kDa; NMDAR = NMDA receptor.

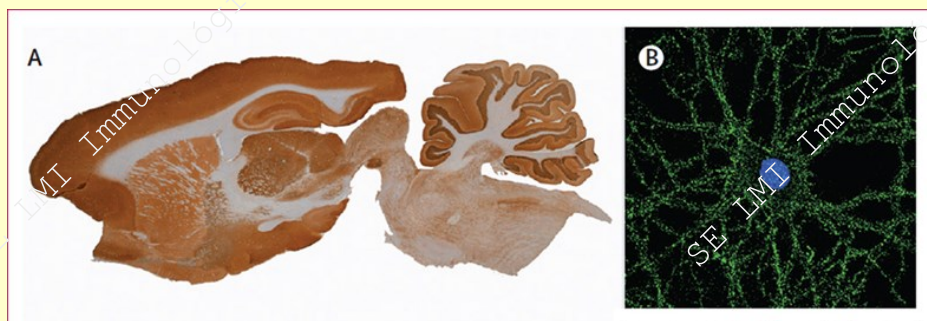
L. McCrackenet al. *Neurology: Neuroimmunology & Neuroinflammation* (2017) **11**, 1-7

Laboratóriumi tapasztalatok

- abszolút antitest titer: szérumban > CSF
- csak CSF pozitivitás! ?
 - minta hígítások (liquor hígítatlan, szérumban 1:20) – totális IgG koncentráció eltérése miatt
 - szérumban egyéb antitestek elfedhetik a reakciót
- gyakran (VGKC), ~ mindig (NMDAR, GAD, GlyR) intratekális Ig szintézis
- mikor detektálható CSF-ben az antitest?
- plazmaferézis és egyéb kezelések a szérumban és a CSF-ben párhuzamosan befolyásolhatják az antitest szintet

Szinapszis felszíni – receptor - autoantitestek meghatározás módszerei

- szűrés immunhisztokémiai (indirekt immunfluoreszcencia) módszerrel emlős agyszöveten
-> hippocampus, cerebellum
- élő sejt (hippocampus) felszíni festése
- sejt alapú mérés (cell based assay)
-> transzfektált sejtek használata

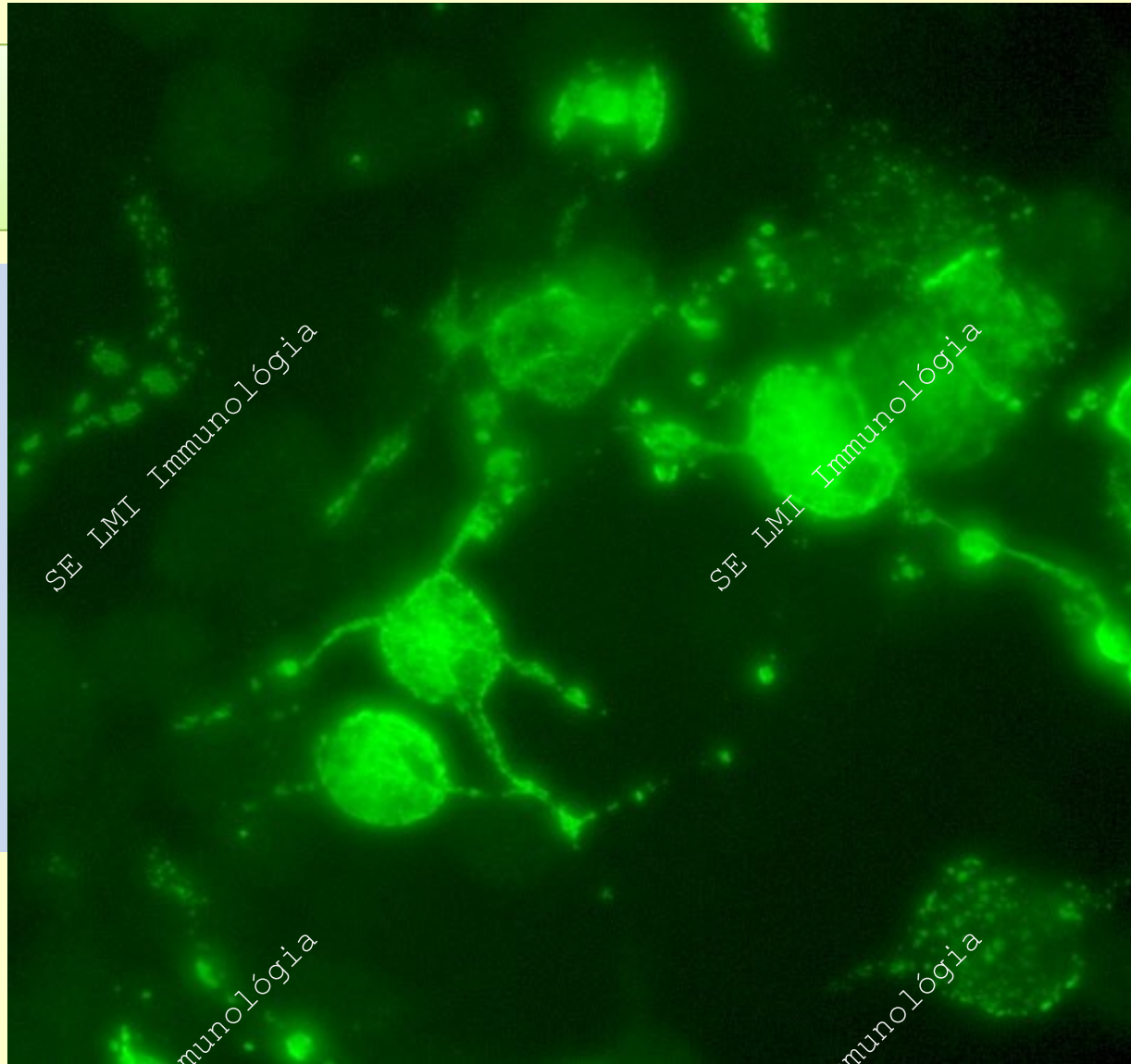
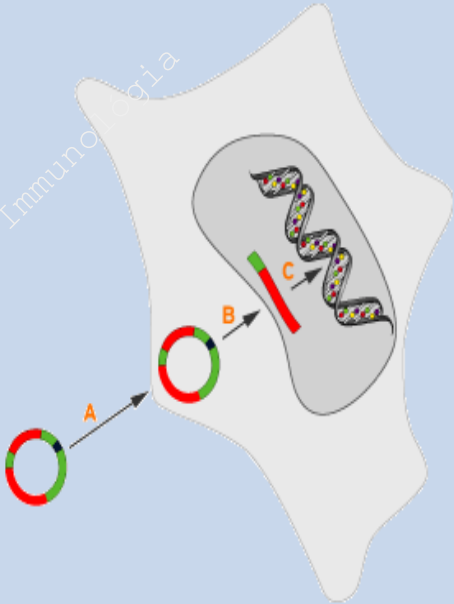


GABAAR elleni antitest

M Petit-Pedrol et al.

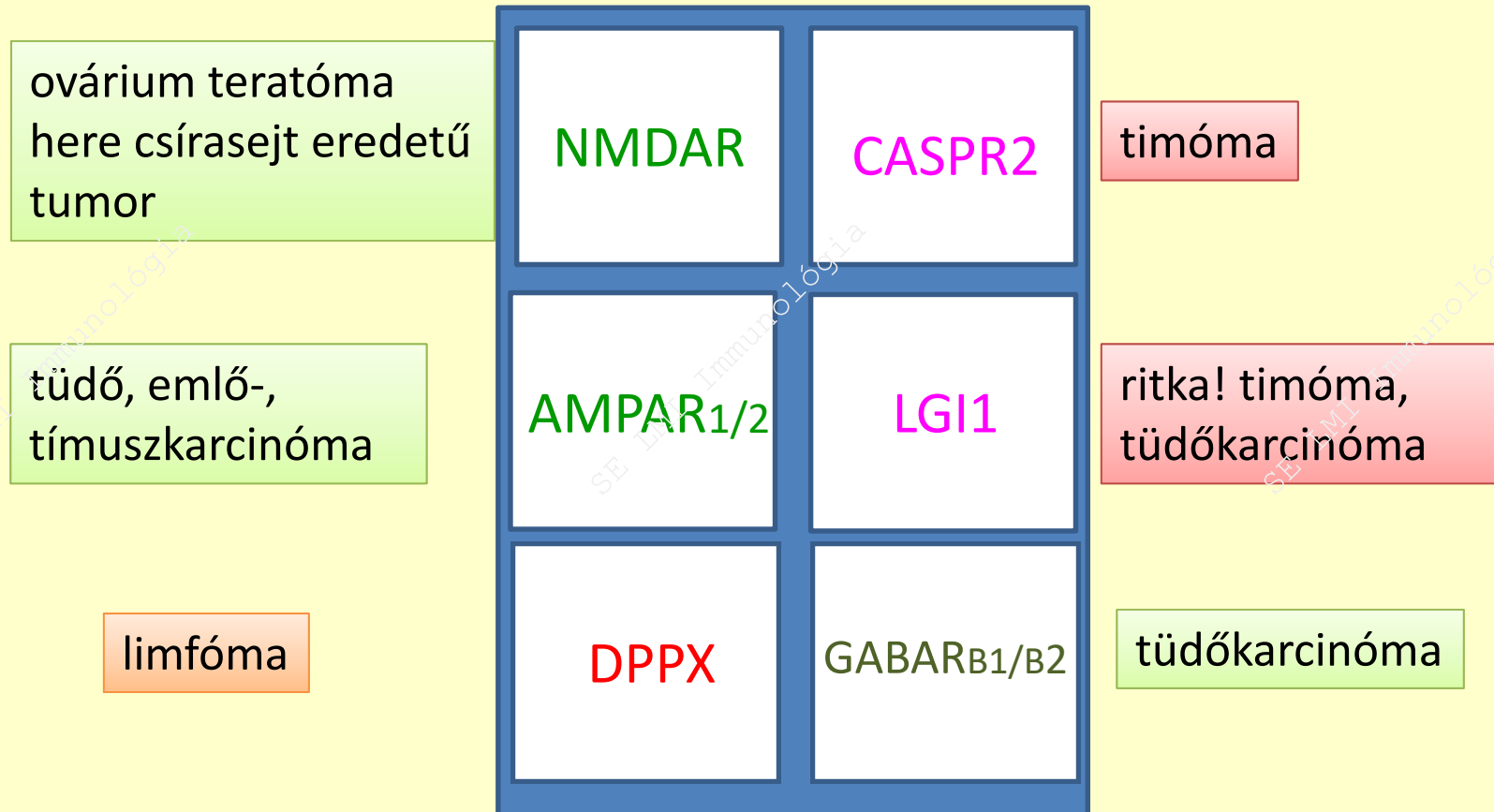
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70299-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70299-0)

a vizsgálandó fehérje stabil transzfekciója



Használt sejt típus: HEK293

Autoimmun encephalitis panel



NMDAR N-methyl-D-aspartate receptor

AMPA_R α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor

Caspr2 contactin-associated protein-like 2

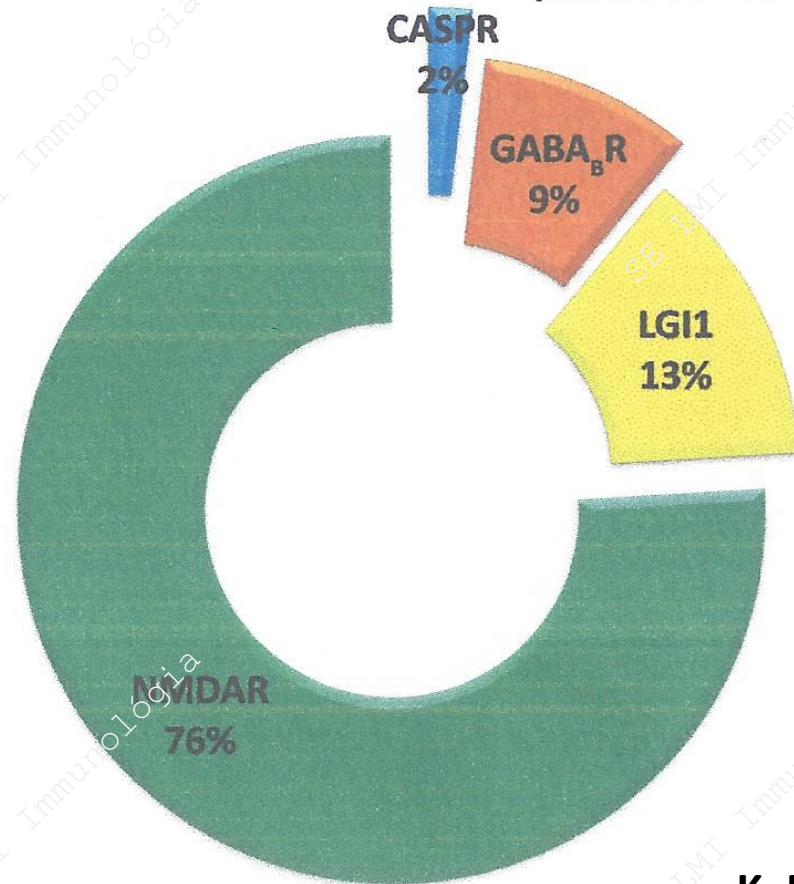
LGI 1 leucine-rich glioma-inactivated 1

DPPX dipeptidyl-peptidase like protein-6

GABA_{B-R} γ-aminobutyric acid-B receptor

Az autoimmun encephalitis típusainak gyakorisága Magyarországon

POZITIVITÁSOK SZÁZALÉKOS MEGOSZLÁSA
(2011. 06. 30. – 2017. 08. 08.)



Antitest	Betegek száma	%
AMPA _{1/2} R	0	0
CASPR	1	2
GABA _B R	5	9
LGI1	7	13
NMDAR	41	76
Összes pozitív egyének száma	54	100

N összes vizsgálatkérés = 836

N vizsgálatkérésekhez tartozó egyének száma = 717

N összes pozitív eset = 85

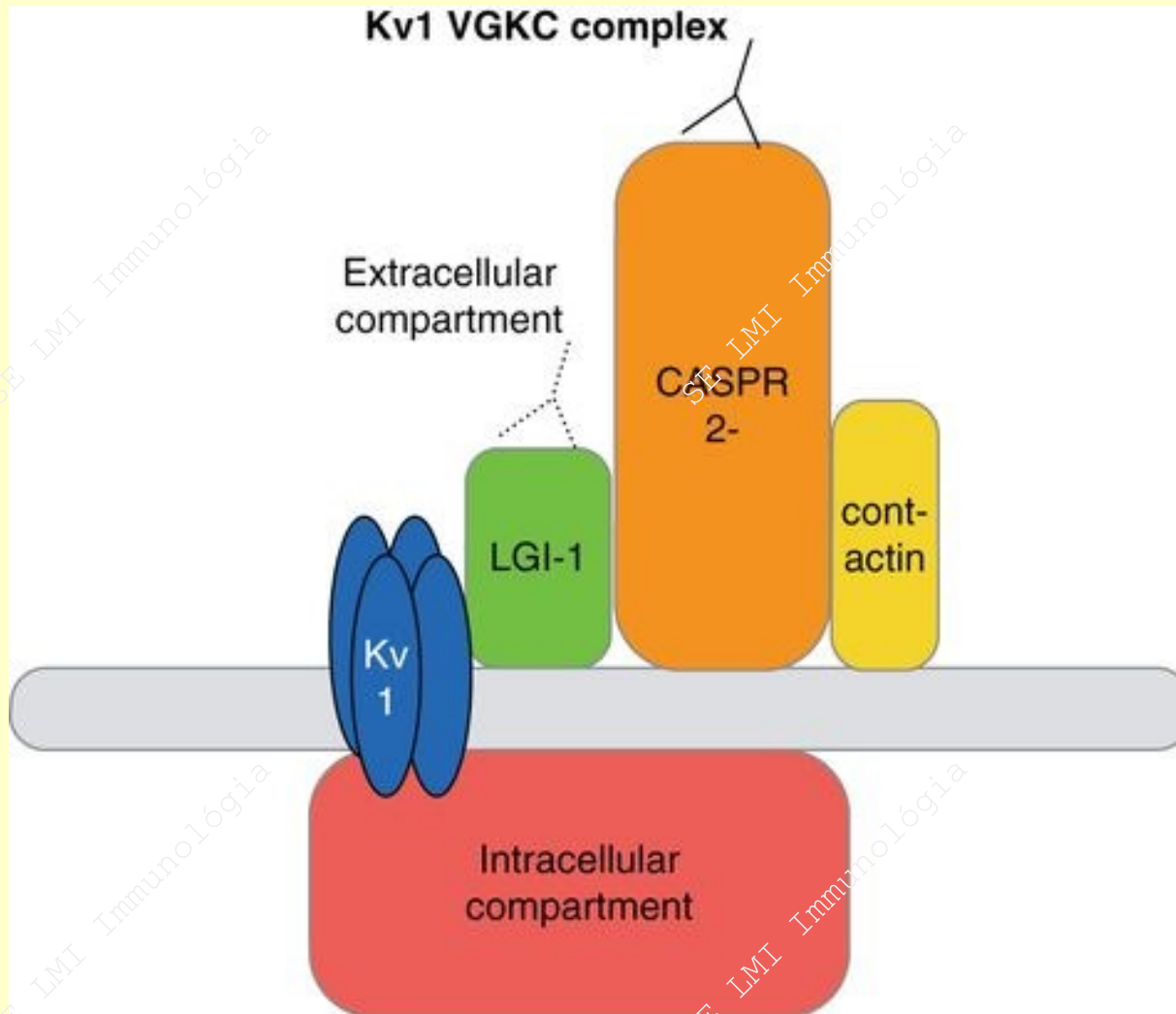
N összes pozitív esethez tartozó egyének száma = 54

K. Böröcz et al. Orv. Hetilap (2018) 159, 107

A hat leggyakoribb receptor, illetve az azokhoz asszociált fehérjék ellen talált autoantitestek megoszlása (táblázat)

Az autoimmun encephalitishez
kapcsolódó autoantitestekre
vonatkozó ismereteink
folyamatosan változnak

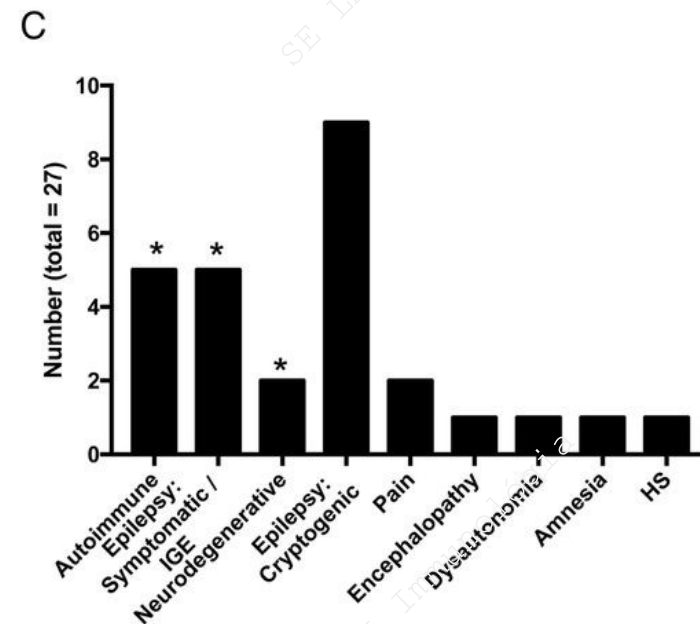
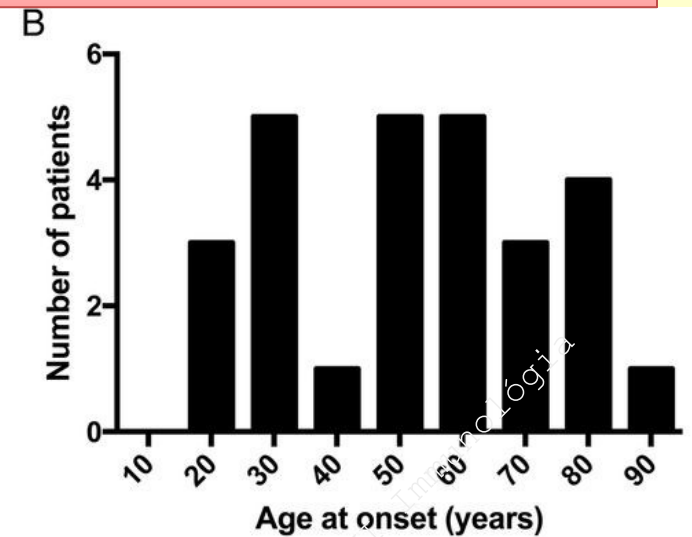
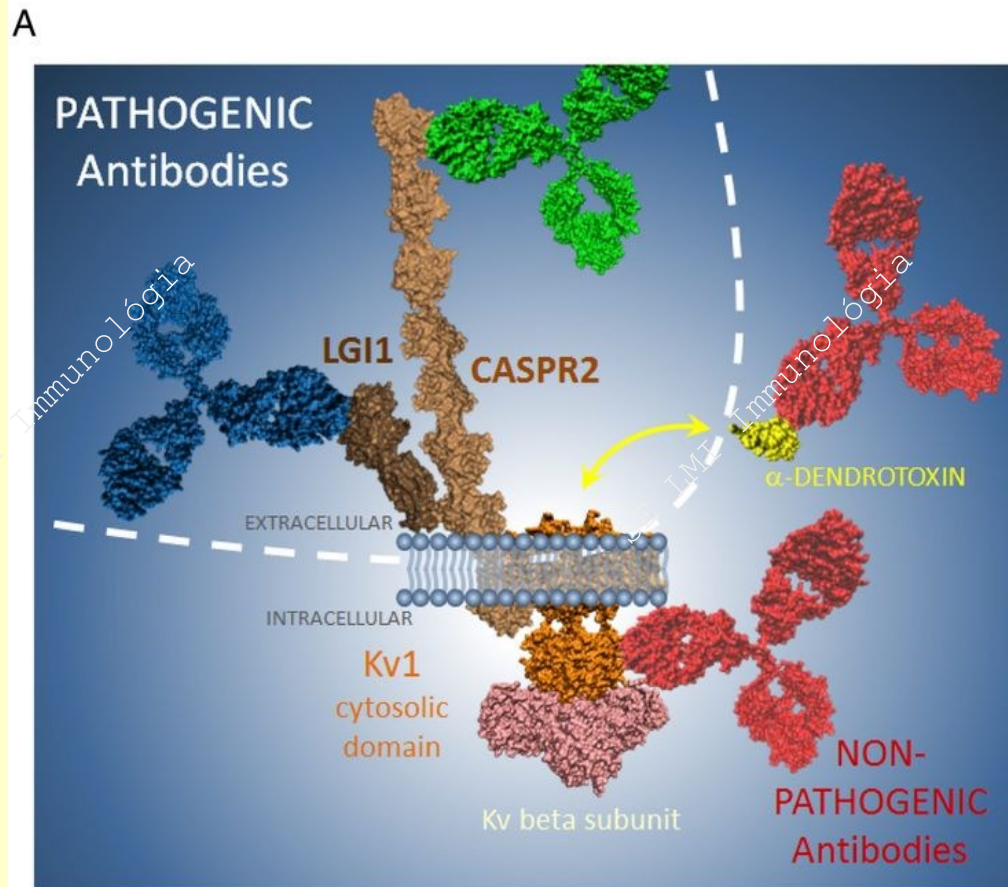
Feszültség-függő kálium csatorna (VGKC) komplex sematikus rajza



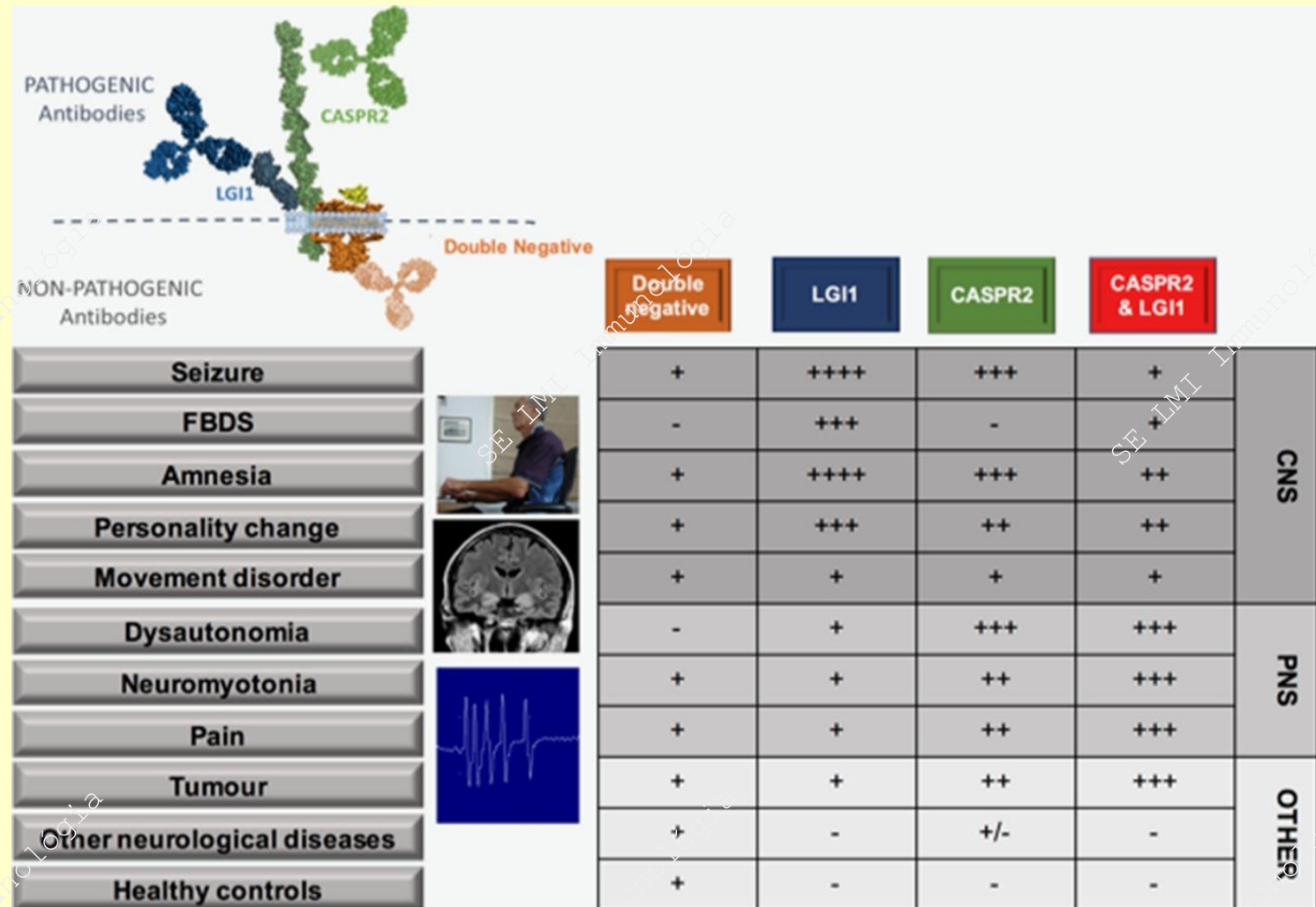
Immunprecipitációs
RIPA módszert
használtak a VGKC
ellen termelődő
autoantitest
pozitivitás
kimutatására.

A csatornához mely
alkotója(i) a
patogén antitest
targetek?

Molecular and clinical features associated with VGKC complex antibodies.



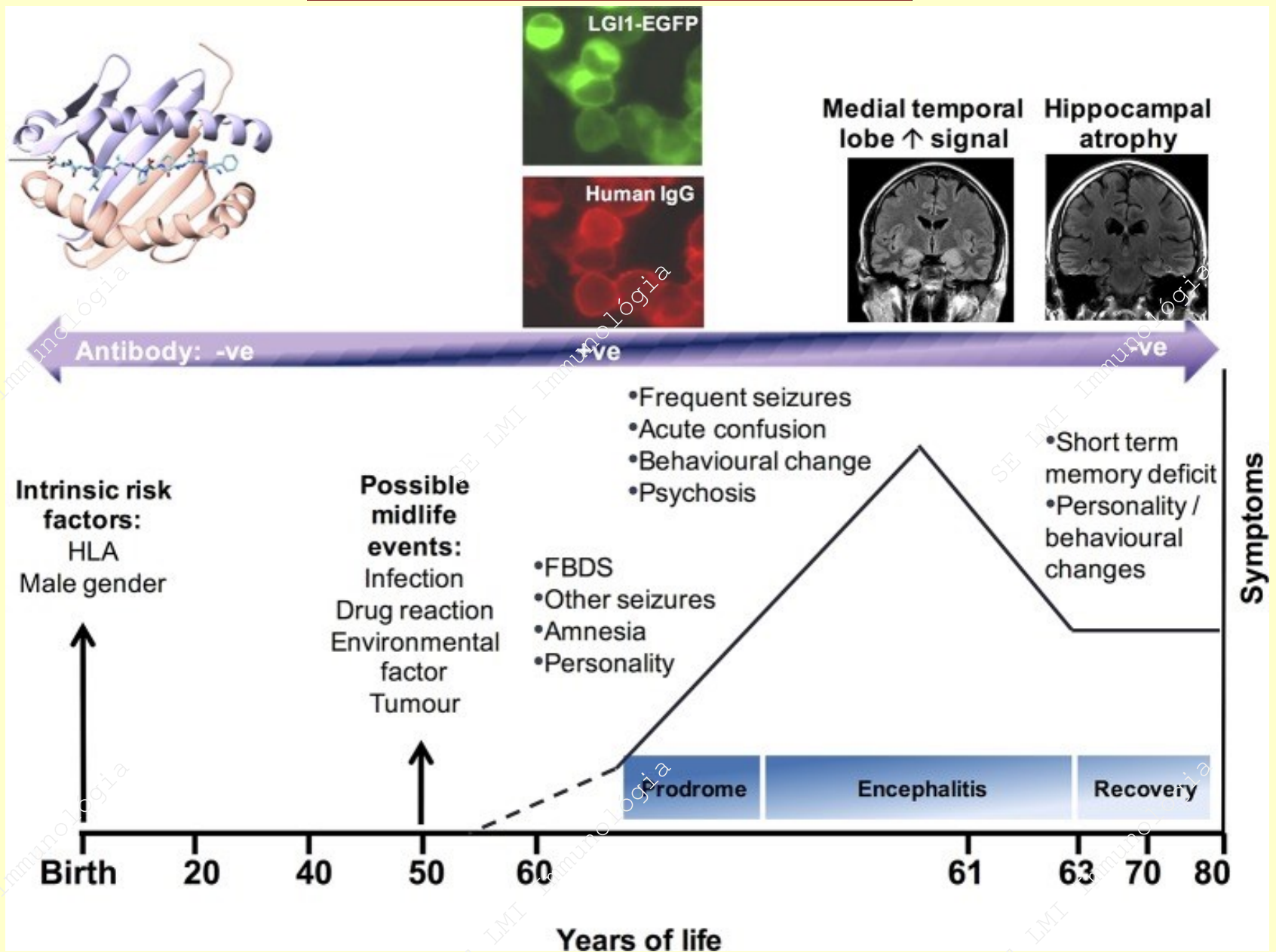
Clinical features of patients with antibodies to LGI1, CASPR2, both LGI1 and CASPR2 and double-negatives.



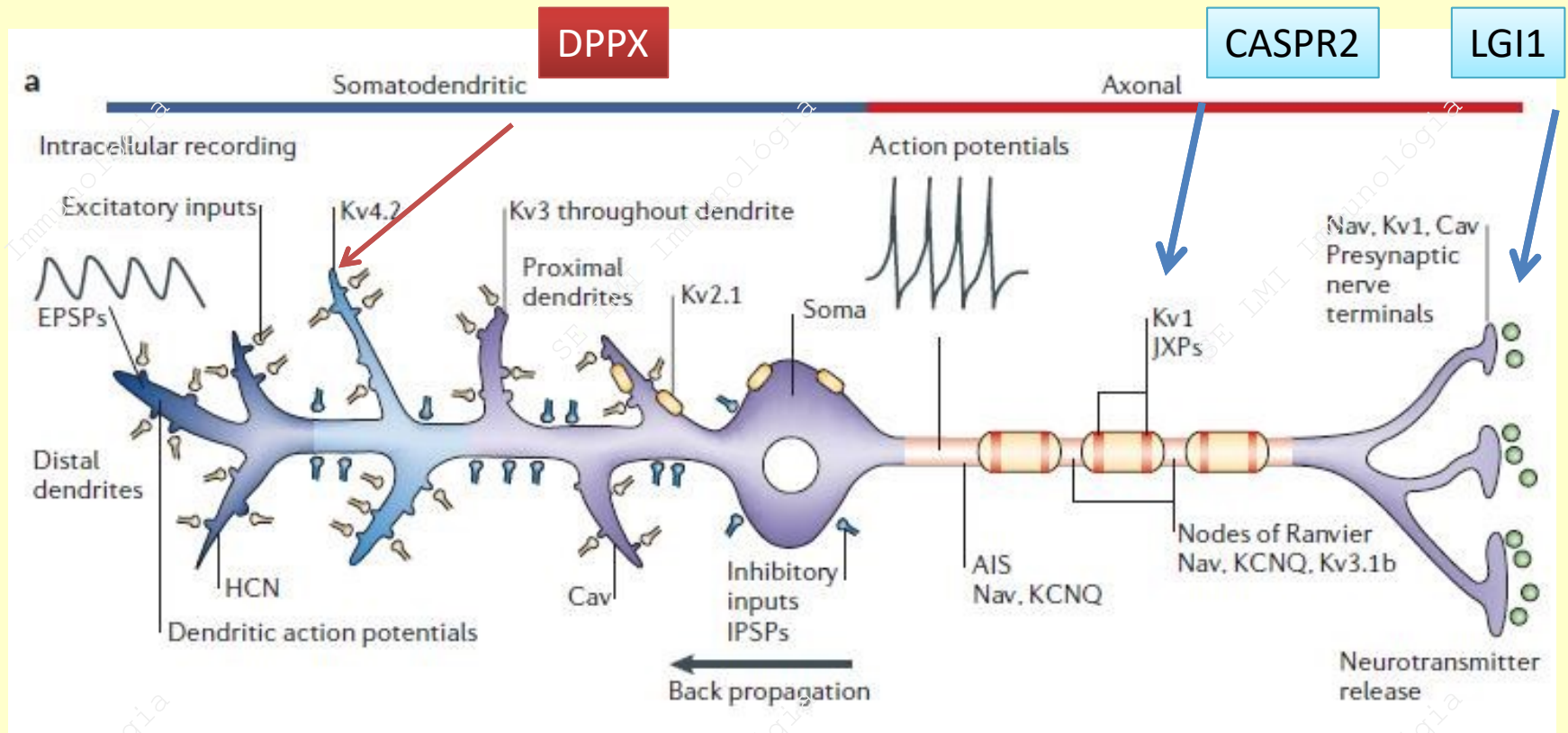
Sophie N M Binks et al. J Neurol Neurosurg Psychiatry
2018;89:526-534

FBDS: faciobrachial dystonic seizures

The evolution of LGI1 antibody disease



General localization of voltage-gated ion channels in a model neuron



HC Lai & LY Jan *Nature Reviews Neuroscience* **volume 7**, pages 548--562 (2006)

a
b
c **a**
b

ége