



Immun-mediált vesebetegségek – klinikai laboratóriumi vonatkozások

Nagy Eszter

*Semmelweis Egyetem, Laboratóriumi Medicina Intézet,
Országos Reumatológiai és Fizioterápiás Intézet,
Központi Laboratórium*



Immun-mediált vesebetegségek

- A vese számos immunológiai kórkép gyakori célpontja a glomerulusok filtrációs tevékenysége miatt, mely kedvez az immun-komplexek (IC) lerakódásának
- Az immun-mediált folyamatok elsősorban a glomerulusokat érintik-*glomerulonephritis*, a gyulladás *tubulointerszticiális* irányba való terjedése visszafordíthatatlan vesekárosodáshoz vezethet
- A vesekárosodást kiváltó immunfolyamat lehet IC lerakódás, sejt- vagy komplement-aktiváció eredménye
- Jelentkezési formái:
 - a. **Primer** (idiopáthiás)
 - b. **Szekunder** (szisztémás autoimmun, vagy más reumatológiai kórképet kísérő)



Az immunreakciót kiváltó antigén (Ag)

1. **Vese -Ag** - a vese konstitutív fehérjéi (autoantigének):
 - **GBM:** IV. típusú kollagén $\alpha 3$ láncának NC1 doménje
 - **Mesangiális Ag:** annexin
 - **Endotél Ag:** LAMP2
 - **Podocita Ag:** PLA2R
2. **Nem-vese-Ag** - a vesében lokalizált valamilyen mechanizmus útján:
 - **Endogén Ag:** (autoantigén): DNS, neutrofil granulociták citoplazmatikus enzimjei (MPO, PR3), immunglobulinok (IgA), cryoglobulinok, tumor Ag
 - **Exogén Ag:** baktériumok (Streptococcus), vírusok, (HIV), gyógyszerek, toxikus anyagok (szilikát)



Immunmechanizmusok vesebetegségekben

Gell és Coombs felosztás szerint:

❖ *I. típusú immunreakció* (pl. antibiotikumok által kiváltott akut tubulointersticiális nephritis - szöveti IgE, eosinophil infiltráció, emelkedett szérum IgE)

❖ **Antitest (AT)** mediált (II. típusú túlérzékenységi reakció)

❖ **Immun – komplex (IC)** mediált (III. típusú túlérzékenységi reakció)

❖ **T-sejt mediált** (IV. késői típusú túlérzékenységi reakció - DTH)

▪ *Komplement aktiváció* (II., III. reakció részeként is)

▪ *Genetikai háttér* (HLA)



Antitest-mediált vesebetegségek

Az immunreakciót a sejtekhez kötődő AT váltja ki – komplement aktiváció, opszonizáció, ADCC – célsejt pusztulása, szövetkárosodás

1. **GBM AT: IV. típusú kollagén $\alpha 3$ láncának NC1 doménje elleni AT**

Anti-GBM glomerulonephritis (prototípus), tüdőérintettséggel - Goodpasture szindróma

- GBM AT patogén szerepe bizonyított
- szoros asszociáció a HLA-DRB1*1501-el (a betegek 80%-ban)
- HLA-DRB1*0701 és *0101 allélok: védő szerep!

3. **PLA2R AT: podociták szekretoros PLA-2R elleni AT**

Membranosus nephropathia

- a betegek 50-70 %-ban mutatható ki
- szoros asszociáció bizonyos HLA-DQA1 allélekkel
- PLA2-R1 polimorfizmus szerepe az idiopathiás formákra való fogékonyságban



Antitest-mediált vesebetegségek

3. **C3 Nephritis faktor (C3NF): C3-konvertáz elleni AT**

C3 glomerulopathia

- a C3-konvertáz enzim stabilizálásával a komplement aktiváció alternatív útja folyamatos – C3 lerakódása a vesében

4. **H faktor elleni AT (FH AT):**

Atípusos HUS (oka a H faktort kódoló gén mutációja is)

- komplement aktiváció alternatív útja folyamatos – C3 lerakódása a vesében

5. **ADAMTS13 elleni AT (ADAMTS13 AT):**

TTP (oka lehet az ADAMTS13-at kódoló gén mutációja is)

- a VWF multimerek méretét szabályozó metalloproteáz hiánya miatt ultra nagy VWF multimerek (ULVWF) jelennek meg a keringésben



Antitest-mediált vesebetegségek

2. ANCA AT: neutrofil granulociták citoplazma enzimjei elleni AT

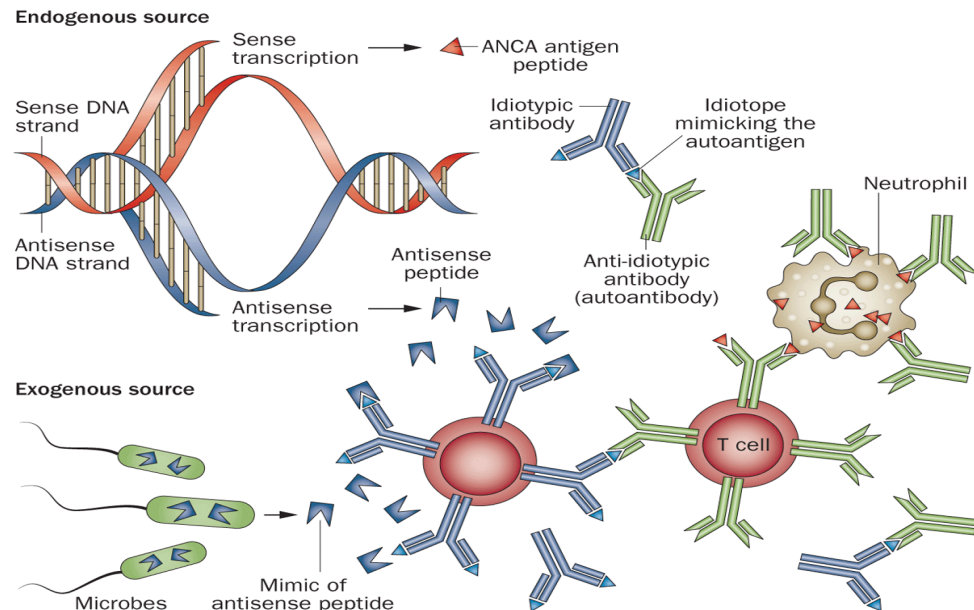
(MPO, PR3, elasztáz, katepszin-G, lactoferrin, BPI)

Glomerulonephritisek szisztémás (PAN, Wegener gr., Churg-Strauss sy.) vagy primer vasculitisek (pauci-immun) vesemanifesztációjaként

- MPO és PR3 AT patogén szerepe igazolt
- a kezdeti immunválasz az autoantigénnel szerkezetileg komplementer peptid ellen irányul:

- **Exogén (kórokozó)**
(*molekuláris mimikri*)
- **Endogén**
(*antiszenz transzkript*)

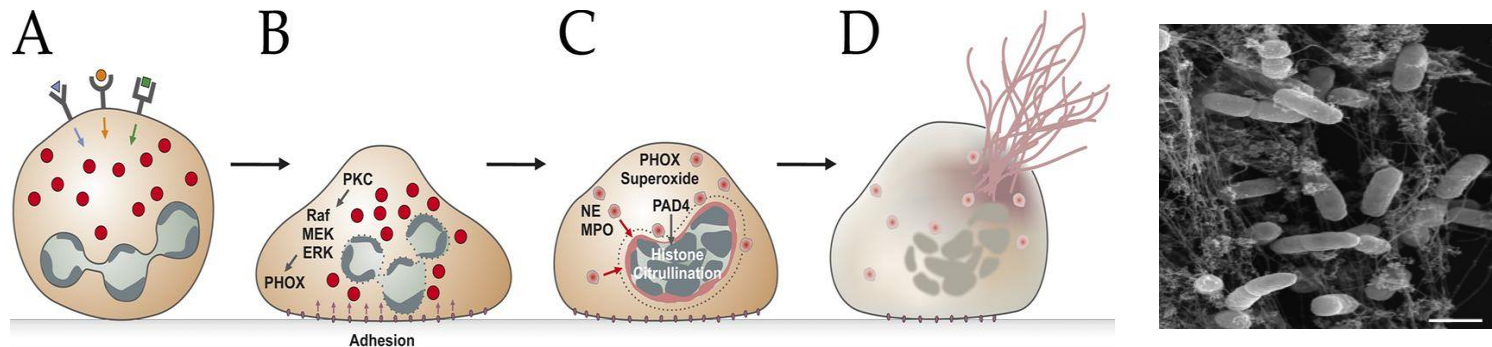
anti – idiotípus válasz



Antitest-mediált vesebetegségek

- patogén ANCA AT megjelenését segítő tényezők:
 - környezeti: toxikus anyagok (szilika), infekciók, (*Staphylococcus aureus*), gyógyszerek (propyltiouracil, minocycline, levamisollal szennyezett kokain)
 - genetikai
- neutrofil preaktiváció: ANCA target Ag-ek megjelennek a sejtek felszínén, teljes aktiváció az ANCA – ANCA AT komplexek (FcγR) és ANCA AT (Fab')₂ révén
- aktivált neutrofilek: ROS termelés, **NETosis** (kromatin dekonzenzáció, hiszton citrullináció, sejtmembrán feloldása, extracelluláris DNS szálak)

NETs: neutrophil extracellular traps





IC-mediált vesebetegségek

- Az IC-ek a keringésben, vagy „*in situ*” a vesében képződnek és lerakódnak
 - A lerakódást számos tényező befolyásolja: a komplex mérete, töltése, membrán affinitása, hemodinamikai faktorok
 - Komplement rendszer aktivációja, vazoaktív és kemotaktikus anyagok felszabadulása, neutrofil és makrofág infiltráció – gyulladás majd a glomerulus károsodása
 - Az IC ellenanyag molekulái, komplement-aktivációs termékek (pl. C3), és néha az Ag is kimutatható a glomerulusokban
1. **Streptococcalis Ag-tartalmú IC** **Streptococcus β -haemolyticus** fertőzés után, **IC Stapylococcus aureus** fertőzés során
Postinfectiós glomerulonephritis
 2. **Galaktóz deficiens IgA elleni AT- et tartalmazó IC**
IgA-nephropathia (a leggyakoribb glomeruláris betegség)



IC-mediált vesebetegségek

3. **dsDNS – dsDNS AT IC, nucleosoma – ds DNS AT IC**

Lupus Nephritis (SLE)

- **dsDNS AT** az SLE diagnosztikai markere, koncentrációja szoros összefüggést mutat a betegség aktivitásával
- az antitest lerakódását a a vesében a nucleosoma segíti (kationos hiszton tartalma miatt nagy affinitás a glomerulusok anionos részéhez)
- az **aktivált komplement** a vesekárosodás legfontosabb mediátora LN-ben (*csökkent C3, C4*)
- további felelős AT-ek a veseléziók kialakulásában: LA, CL, B2-GPI, C1q, cryoglobulin

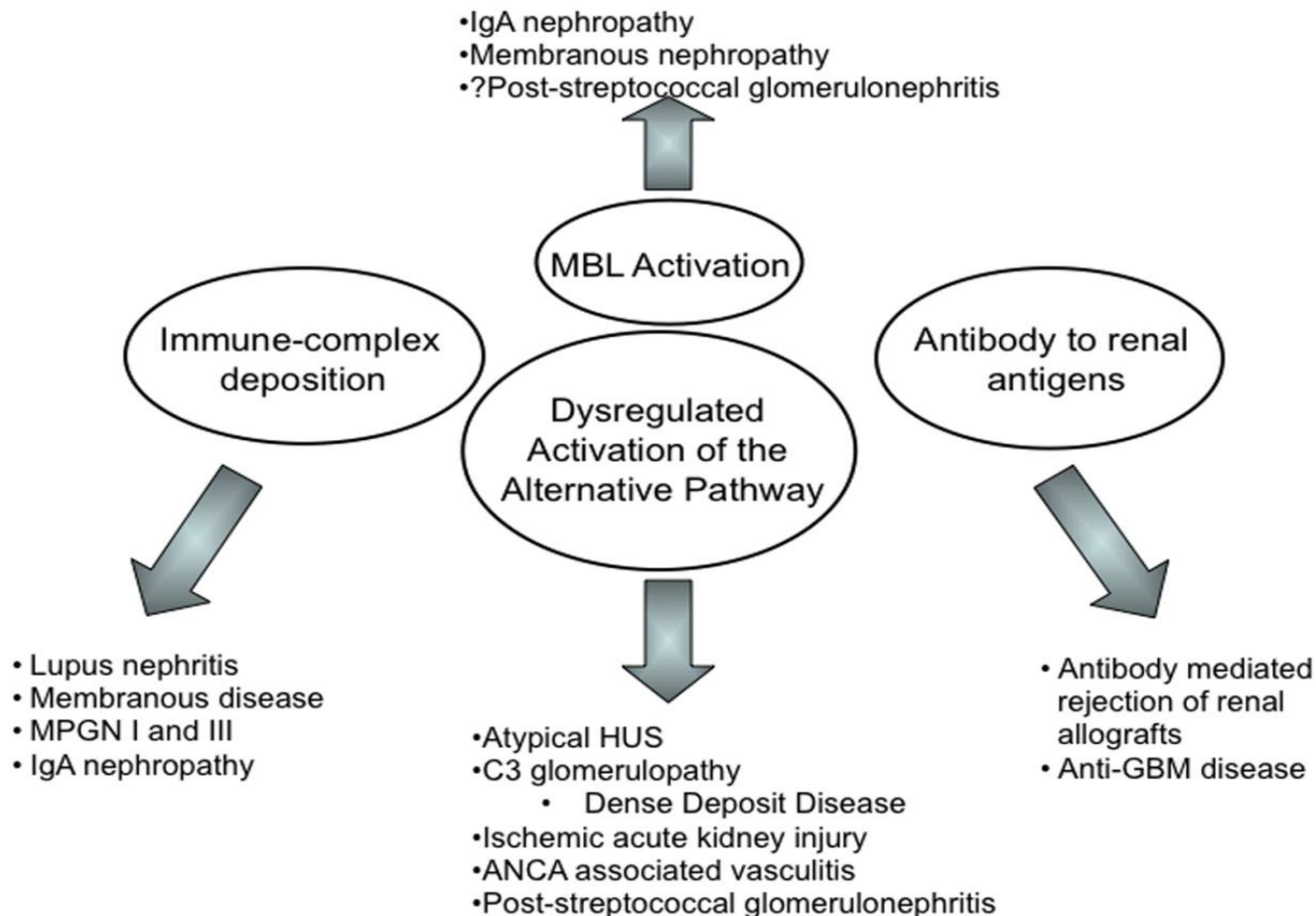
4. **Cryoglobulinok (II., III. típusú) - IgG elleni IgM vagy IgG**

Cryoglobulinémiás vasculitis

- II. Típus: monoklonális IgM (RF aktivitású) és poliklonális IgG - HCV infekció, Sjögren szindróma, RA, CLL
- III. Típus: poliklonális IgM és IgG – Sjögren szindróma, SLE, infekciók (HCV, HBV, CMV, EBV, HIV)

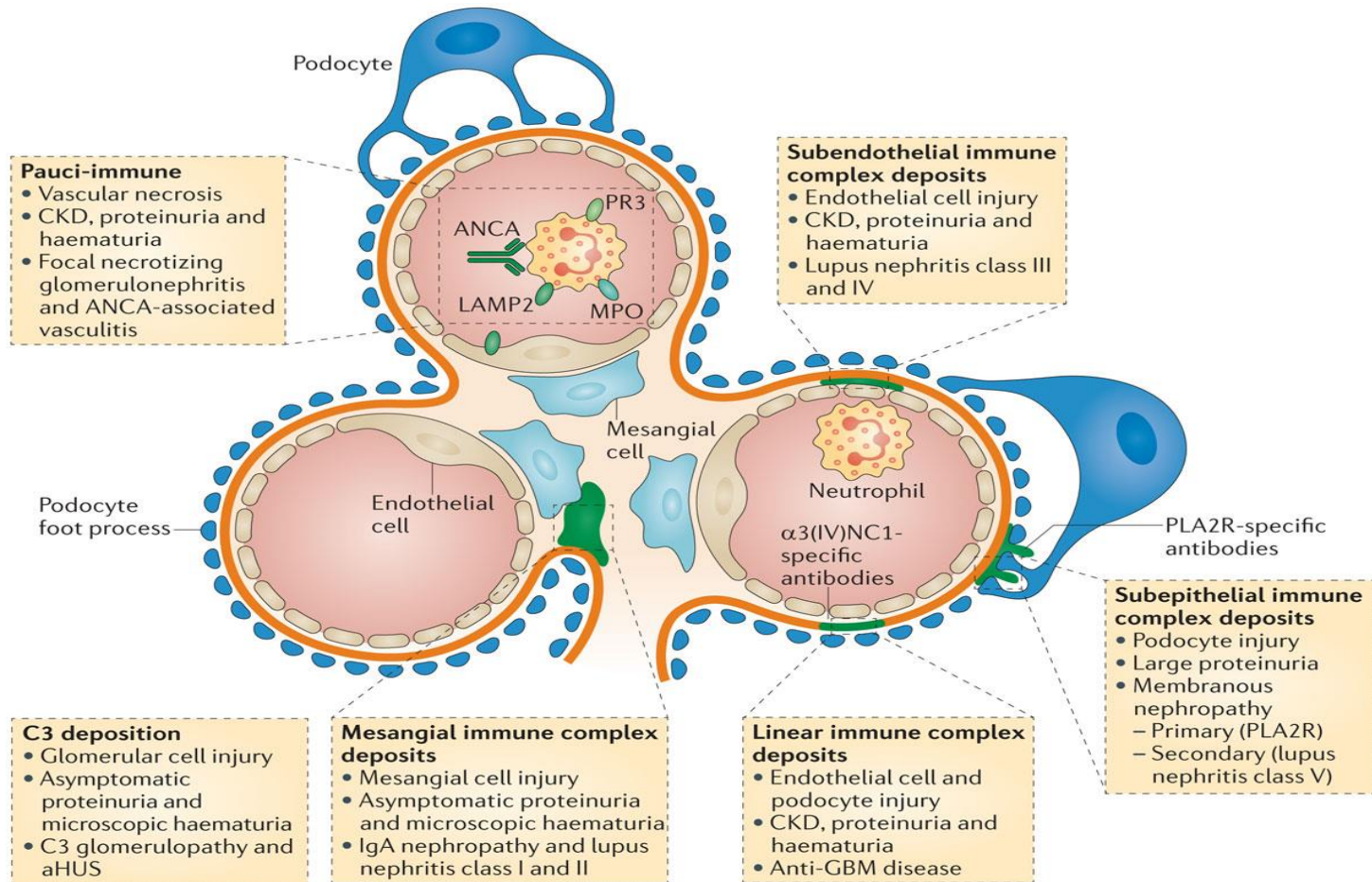


A komplement rendszer szerepe az immun-mediált vesebetegségekben



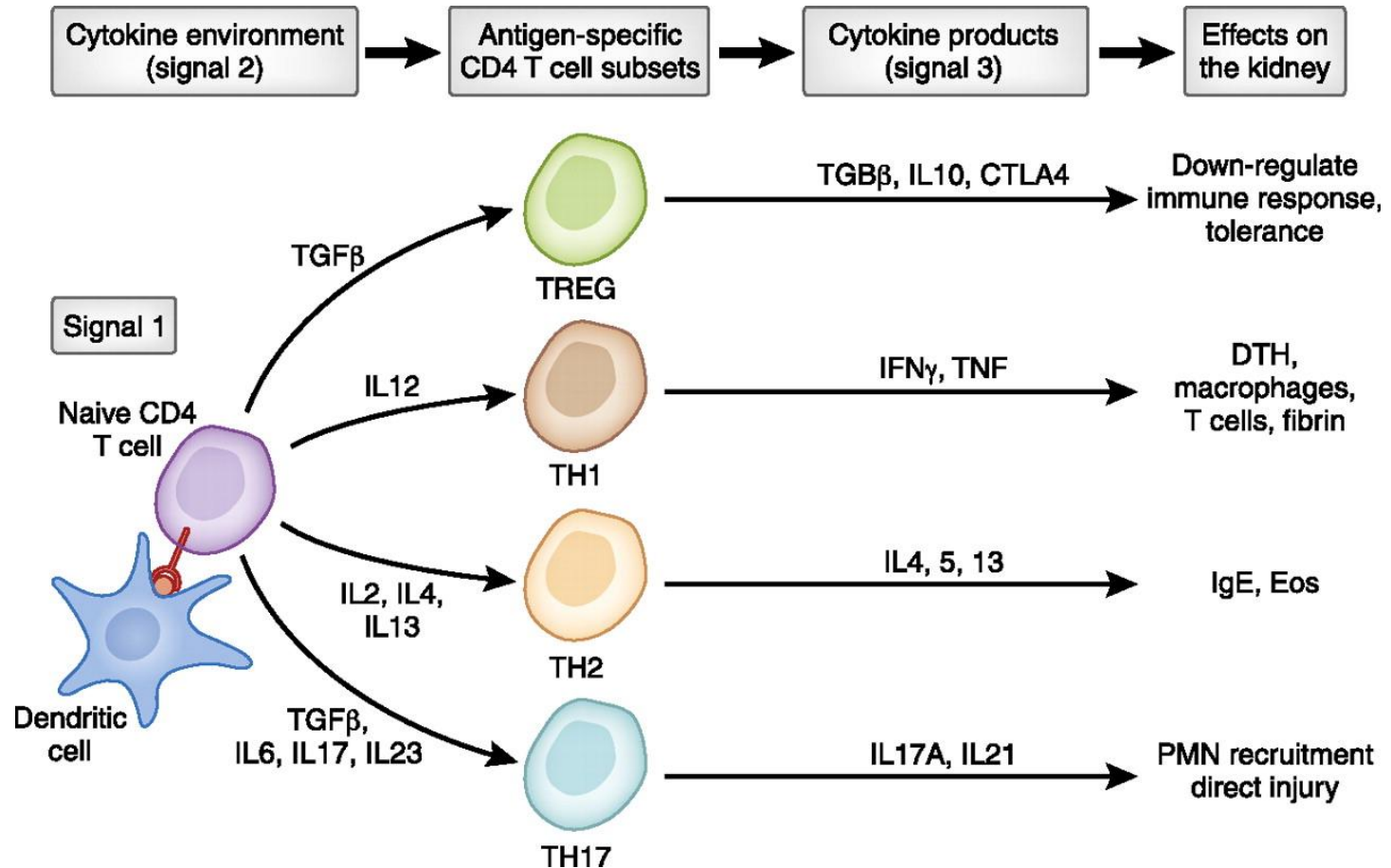


A glomerulus patológiai elváltozásai immun-mediált vesebetegségekben





T sejt-mediált immunreakciók GN-ben





Az immun-mediált vesebetegségek laboratóriumi diagnosztikája

❖ Hematológiai vizsgálatok:

- vérkép

❖ Kémiai vizsgálatok:

- szérum/vizelet kreatinin, urea, karbamid-nitrogén (*eGFR*, *Kreatinin-clearance*), Ca, P

❖ Vizelet vizsgálatok:

- vizelet fehérje meghatározás, vizelet albumin (*ACR-microalbuminuria*)
- vizelet üledék (*vvt cilinderek, acanthocyták*)

❖ Mikrobiológiai vizsgálatok: infekciók kizárása céljából

- vizelet tenyésztés
- szerológia

❖ Vesebiopszia:

- fénymikroszkópos vizsgálat (HE, PAS, PAS methenamine ezüst, Masson-féle trichrom festés)
- elektronmikroszkópos vizsgálat
- direkt immunfluoreszcencia: az IC, komplement fehérjék, fibrinogén depozitumok detektálása fluorokrómmal (Fluorescein, Rhodamine) jelölt AT-ek segítségével



Az immun-mediált vesebetegségek laboratóriumi diagnosztikája - Immunszerológia

❖ **Antitest vizsgálatok:**

- GBM AT
- ANCA (MPO, PR3) AT
- AI kórképek jellegzetes AT-i: dsDNS, Nucleosoma, C1q, Sm AT
- AST

❖ **Komplement vizsgálatok:**

- C3, C4 szint meghatározása
- Összkomplement (CH50)
- További komplement vizsgálatok (pl. FH AT, HF génmutáció)

❖ **ADAMTS13 aktivitás / AT meghatározás**

❖ **Cryoglobulin vizsgálat:**

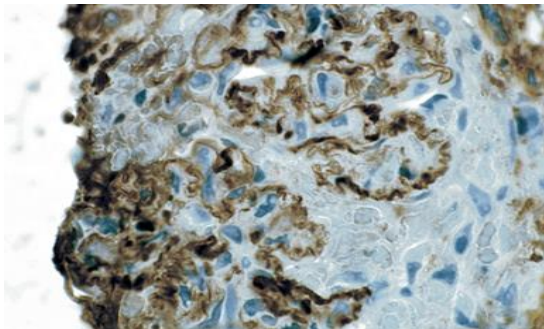
❖ **Fehérje elektroforézis, Immunelektroforézis / Immunfixáció - szérum / vizelet M komponens / Bence-Jones fehérje kimutatás**

❖ **Szérum fehérjék mennyiségi meghatározása: szérum IgG, IgA, IgM, IgE**

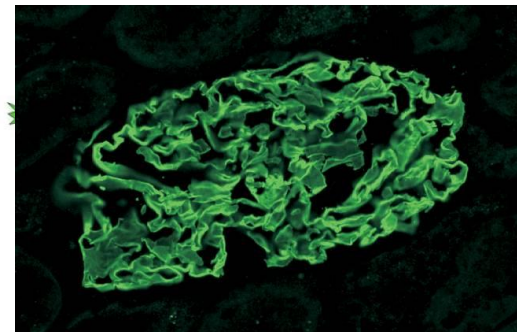


GBM AT laboratóriumi kimutatása

- Definíció szerint a GBM AT az anti-GBM / Goodpasture szindrómában mindig jelen van
- A betegek 20-35 %-ban ANCA AT is (MPO, PR3), mely a GBM előtt megjelenhet - *jobb prognózis?*
- **Diagnózis: GBM AT IgG kimutatása** (kiegészítés: ANCA AT meghatározás)
 - vesében: direkt IF
 - szérumban: IIF, direkt ELISA, WB
- **ELISA, WB tesztek szenzitivitása / specificitása az Ag tisztaságának függvénye**
*szenzitivitás: nem tisztított / tisztított Ag: 63-100 %, rekombináns Ag 95-100 % -
(álpozitivitás a IV kollagén más α -láncának NC1 epitópjával való keresztreakció miatt)*



Bazál membrán lineáris festődése
IgG-vel Goodpasture szindrómában

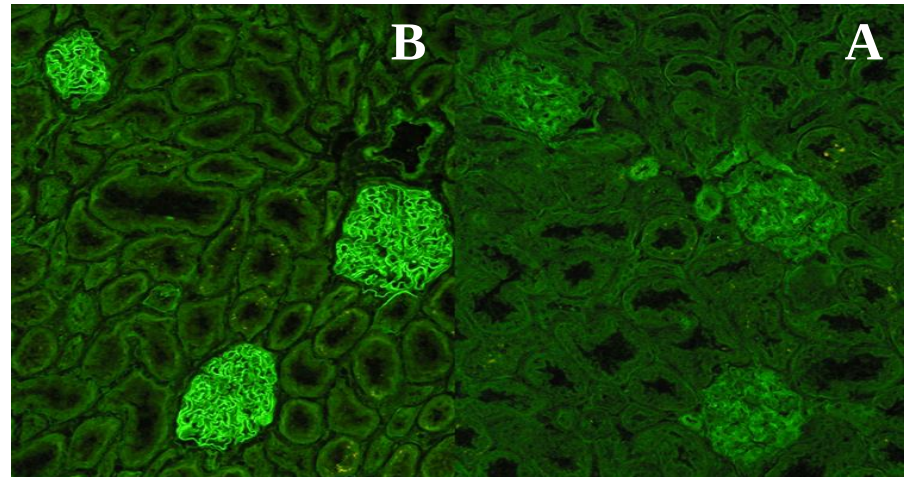
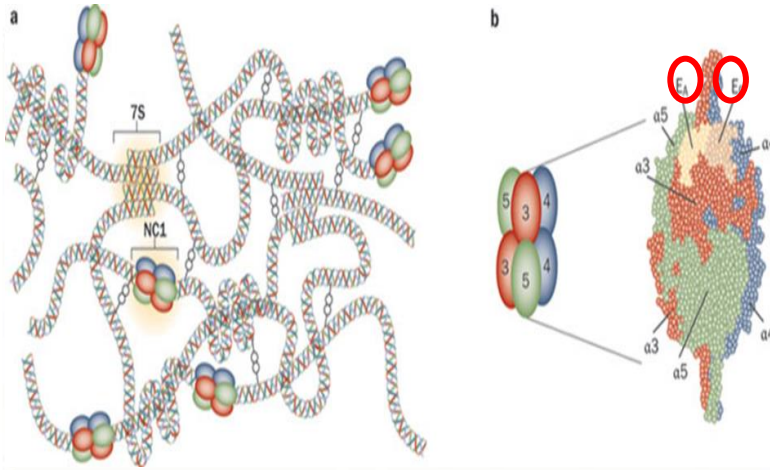


GBM AT kimutatása majom
vesemetszeten IIF módszerrel



GBM AT kimutatása Immunfluoreszcens módszerrel

- IIF teszt szenzitivitása a metszet előkezelésének függvénye (GBM szerkezete miatt)
- Normál állapotban az $\alpha 3$ NC1 két domináns epitópja nem hozzáférhető
- Az AT lerakódás az epitóhoz való hozzáférés függvénye – a kollagén hexamerek konformáció változása révén
- IIF teszt szenzitivitásának növelése a vesemetszet 6M-os ureával való előkezelésével (álnegativitás lehetőségének csökkentése)



Hudson, B. G. et al. *N. Engl. J. Med.*, 2013; **348**: 2543–2556

GBM AT kimutatása IIF módszerrel majom vesemetszeten:
A: urea kezelés nélkül
B: urea kezeléssel



ANCA AT laboratóriumi kimutatása

- **Ajánlás: 1999 International Consensus Statement on Testing and Reporting ANCA**
2003 Kiegészítés: minőségi kontroll követelmények, eredményközlés,
ANCA vizsgálata más autoimmun kórképben

ANCA ATkimutatás algoritmusa:

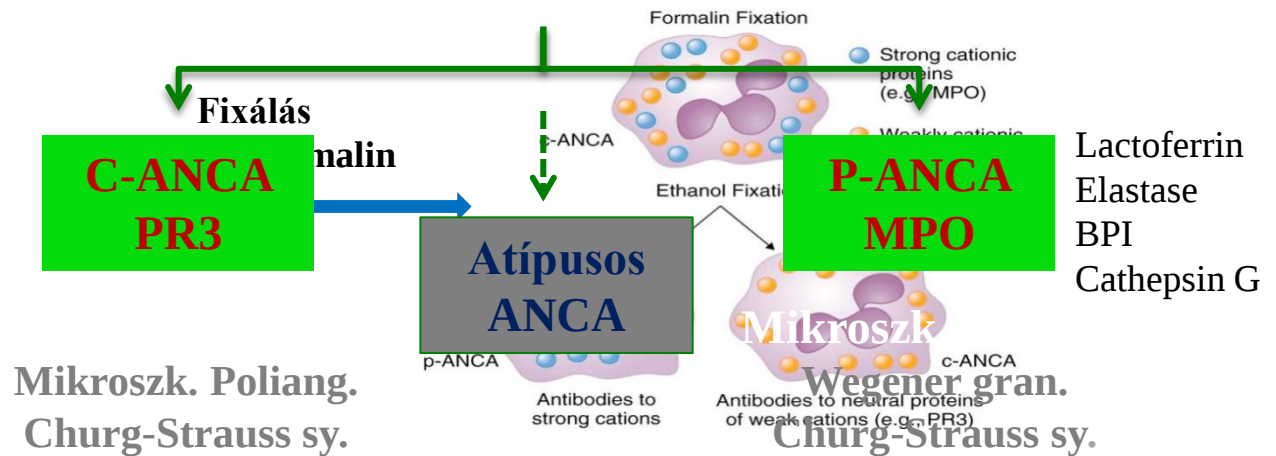
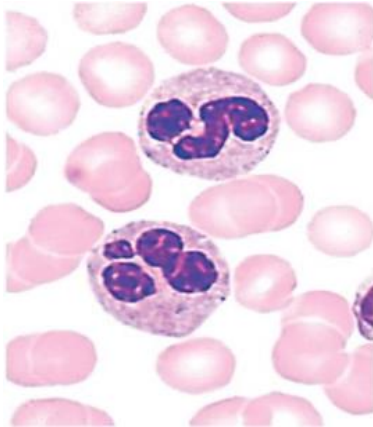
1. **SZŰRÉS IIF módszerrel** etanollal fixált humán granulocitákon
 2. **Megerősítés, mennyiségi meghatározás** immunoasay-el (ELISA, CLIA vagy multiplex assay)
- **Az egyes módszerek szenzitivitása eltérő:**
 - ANCA AT pozitívítások 10%-a csak IIF-el detektálható
 - I., II., III. generációs ELISA tesztek eltérő szenzitivitása az antigén rögzítésének módja miatt (releváns epitópok szerkezetének megőrzése, epitóphoz való hozzáférés)
 - *Humán natív és rekombináns ANCA Ag keverékének használata (pl. PR3) ?*
 - **ANCA IIF és MPO/PR3 ELISA kombinációja: 99%-os specificitás**
Etanol / Formalin fixált szubsztrát használata a keresztreagáló ANA kiszűrésére



ANCA AT kimutatása Immunfluoreszcens módszerrel

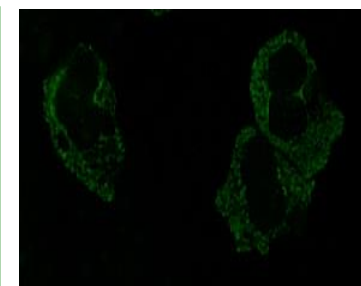
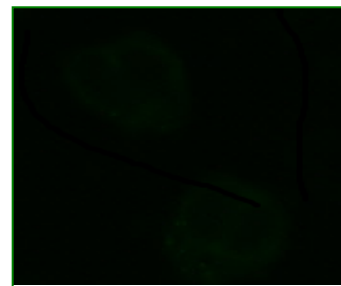
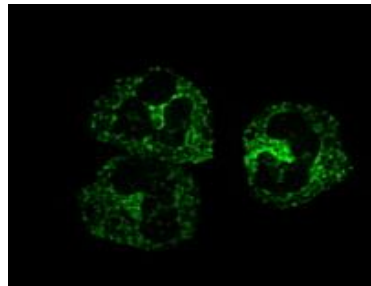
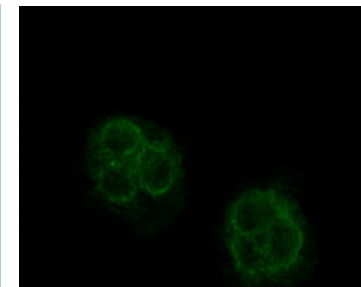
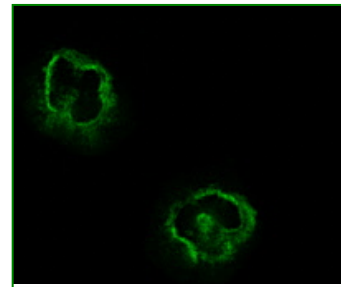
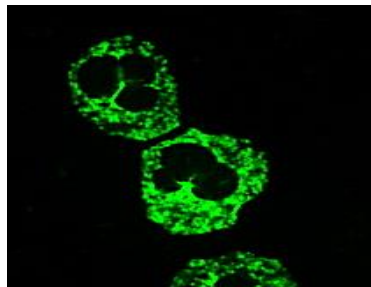
ANCA – IIF / ELISA

pozitív



Etanollal fixált
granulocitákon

Formalinnal fixált
granulocitákon

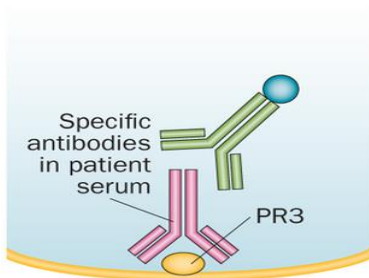




ANCA AT kimutatása immunoassay-el

- **ELISA I. generáció**

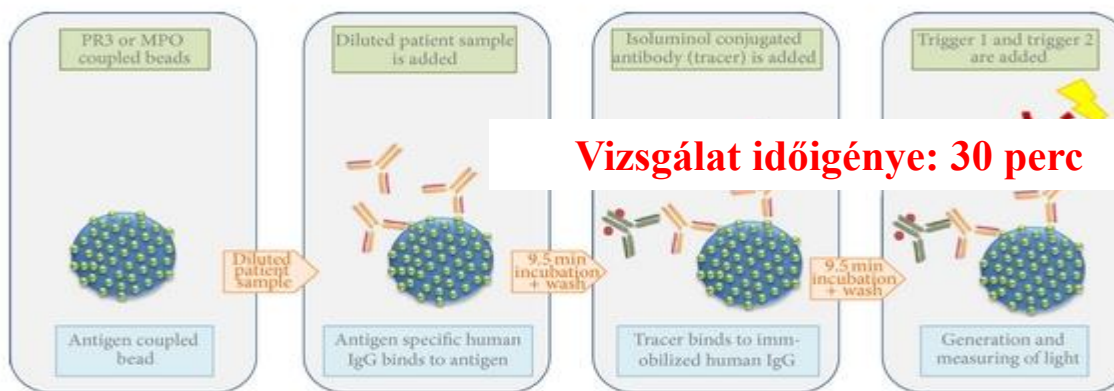
Direct ELISA



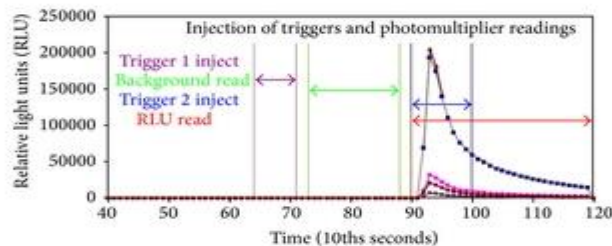
Vizsgálat időigénye: 2-2,5 óra

E Csernok et al, Nat Rev Rheumatol 10, 494-501 (2014)

- **CLIA**



Vizsgálat időigénye: 30 perc



Schulte-P J et al, J Immunol Res Volume 2014, Article ID 185416,)



ANCA AT előfordulása gyulladásos reumatológiai kórképekben

Kórkép	ANCA AT / Gyakoriság	Target Antigén
Wegener granulomatosis	c-ANCA 75-80 % p-ANCA 10-15 % negatív 5-15 %	PR3 MPO
Mikroszkópikus polyangiitis	c-ANCA 25-35 % p-ANCA 50-60 % negatív 5-10 %	PR3 MPO
Churg-Strauss szindróma	c-ANCA 10-15 % p-ANCA 55-60 % negatív 30 %	PR3 MPO
SLE	p-ANCA 20-30 %	BPI, CG, LF
RA	p-ANCA 30-70 %	LF, HMG1/2, BPI , PR3
Colitis ulcerosa	p-ANCA 50-70 %	CL, BPI, HMG1/2
Crohn-betegség	p-ANCA 20-40 %	CG, LF, EL, MPO, PR3
Sclerotizáló cholangitis	p-ANCA 60-70 %	BPI, LF
Autoimmun hepatitis	p-ANCA 33-90 %, c-ANCA 45%	Actin, HMG1/2, LF
PBC	p-ANCA 30-40 %	LF, BPI, HMG1/2
<i>Krónikus infekció</i>	<i>p-ANCA , c-ANCA</i>	BPI, LF, MPO, PR3



Cryoglobulin vizsgálat algoritmus

Mintavételi csövek előmelegítve (37°C)!!!

Mintavétel és szállítás $\geq 37^{\circ}\text{C}$ -on



Inkubálás 37°C -on minimum 1 óra

Szérum elválasztása 37°C -on !!!

**Ha a centrifugálás 37°C -on nem megoldott,
centrifugálás nélkül**



Inkubálás 4°C -on 3 – 7 nap

Precipitátum képződés ellenőrzése naponta !!!



Nincs precipitáció



NEGATÍV

Klinikai gyanú esetén ismételts



Van precipitáció



**nem oldható
vissza 37°C -on**

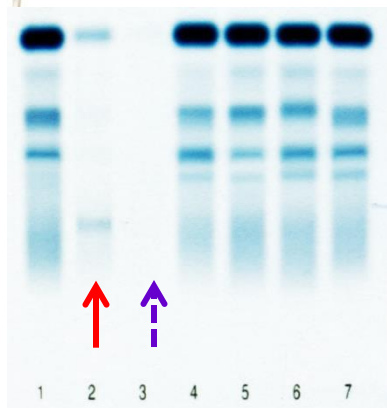


visszaoldható 37°C -on

POZITÍV



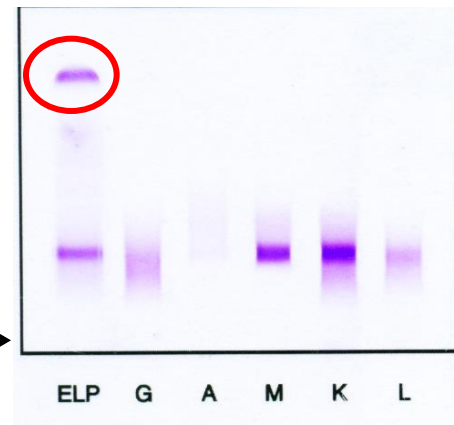
Cryoglobulin vizsgálat algoritmus



Cryo-csapadék ELFO képe

37°C-on visszaoldható
precipitátum

Pozitív teszt
kriokrit



Cryo-csapadék IF képe -
mosás!!!

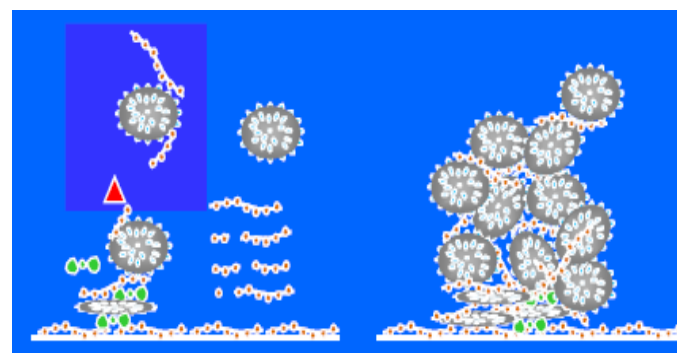
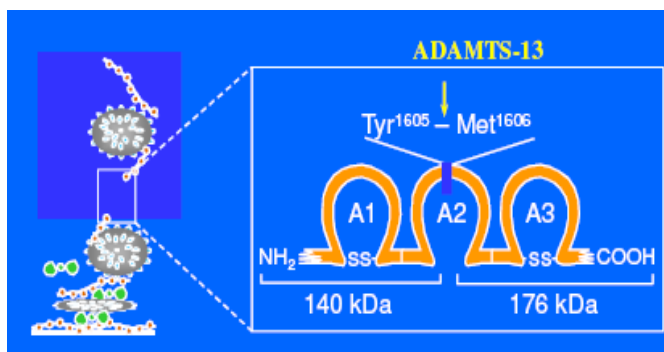
Precipitátum mosása 3x fiziológias sóoldatban (4°C)
centrifugálás 4°C-on (5-10 perc, 1800-7500 rcf) !!!
visszaoldás 37°C-on (overnight)

Qualitatív analízis
Se ELFO
Kapilláris ELFO
Immunfixáció

Quantitatív analízis
Összfehérje,
Se Ig-ok, C4,
RF meghatározás



ADAMTS-13 aktivitás meghatározása kollagén-kötési assay-el (ELISA)



Minta típusa		Minták száma	ADAMTS-13 aktivitás		
			< 10 %	10 - 30 %	> 30 %
TTP	Aktív	13	12		1
	Remisszió	23	6	3	14
Tumor asszociált TTP	Aktív	3	1		2
	Remisszió				
HUS	Aktív				
	Remisszió	4			4
ITP / Evans / HELLP szindróma	Aktív	1			5
	Remisszió	4			
Normál		10			10



Veseérintettségre utaló autoantitestek gyulladásos reumatológiai kórképekben

I. SLE

- Veseérintettség a betegek mintegy felében (tünetmentes minimális proteinuria/hematuria-tól a gyors progressziójú glomerulonephritisig)
- A korai veseeltérések lehetnek átmenetiek – egyszeri vizeletvizsgálat nem elég!
- **C1q AT** jelenléte aktív vesefolyamatot jelez (*proteinuriával szoros asszociáció?*)
dsDNS AT-el együtt LN-re utal (*91% specificitás, 90% specificitás*)
- **Nucleosoma AT** utalhat LN-re
- **Sm AT** vesemanifesztációval járó lupus-ra jellemző
- **P Ribosoma AT** aktív SLE-, LN-ben



Veseérintettségre utaló autoantitestek gyulladásos reumatológiai kórképekben

II. Sjögren szindróma

- Vasculitis a betegek 5-10%-ban, gyakori a II. típusú cryoglobulinaemia
- **RF** pozitivitás, **emelkedett Ig** szintek, **SSA, AT, SSB AT** kimutatható volt a biopsziával igazolt veseérintettségben egy tanulmány szerint
- Egy másik tanulmány szerint disztális tubuláris acidózisban a betegek 85%-ban **ANA** és **SSA** vagy **SSB** pozitivitás detektálható

III. Progresszív szisztémás sclerosis

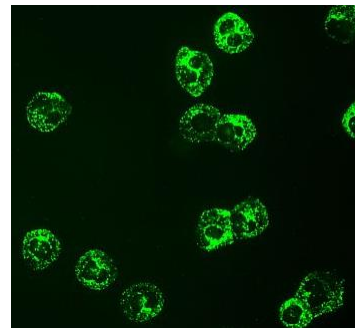
- Sclerodermás veseváls (SRC) a betegek 5%-ban
- **RNS polimeráz III AT** az SRC rizikófaktor
- Scl-70 és centromer AT (ACA) jelenlétében ritkább a veseérintettség

Esetismertetések

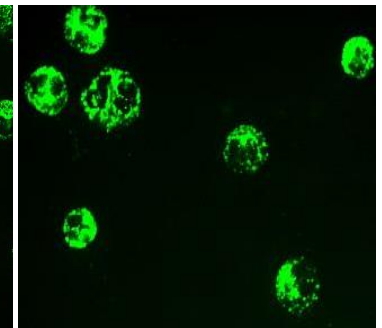
I. Eset: 59 éves férfi

- Anamnézisében ismert hypertonia, reflux betegség, COPD, krónikus prostatitis
- 2015 áprilisában collaptiform rosszullét, fül-orr-gégészeti panaszok miatt hospitalizáció - sensoros polyneuropathia igazolódott
- Mellkasi röntgen felvételen **emphysema, bullosus elváltozások**,
Labor vizsgálat: beszűkült vesefunkció, Immunszerológia: c-ANCA erősen pozitív, PR3 AT erősen pozitív, Wegener granulomatosis?
- Immunológiai konzílium - magas PR3 AT titer miatt 3x plazmaferezis, majd AVV protokoll alapján ciklofoszfamid (CYC) terápia indult
- 2015 július – CYC kezelés ellenére a sinusitisek és polyneuropathiás tünetek progrediáltak – Rituximab kezelés indult
- 2015 október – romló vesefunkciós értékek, de **c-ANCA / PR3 AT negatív!**, mellkas röntgen progressziót nem jelzett
- 2015 december - hirtelen fellépő láz miatt hospitalizáció, liquorból *Listeria monocytogenes* tenyésztett ki, majd HK-ból is - AB kezelés
- 2016 január – IVIG, szteroid lökés kezelés indítása

ANCA-E



ANCA-F



II. Eset: 34 éves férfi

- Anamnézisében recidív tonsillitisek - 2005-ben tonsillectomia
- 2000 óta sicca tünetek
- 2002 pneumonia, 2006 nehézlégzés miatt kivizsgálás: **p-ANCA pozitivitás** - *Wegener granulamatosus?*, bronchofiberoscopia - *szöveten aspecifikus gyulladást jelzett*
- 2006 hyposialia, KCS - *kisnyálmirigy biopszián Sjögren sy-ra jellemző hisztológiai kép*, **SSA AT, SSB AT pozitivitás**, **Dg: Sjögren szindróma**
- 2011 tünetfokozódás miatt hospitalizáció
Imunszerológia: korábbi pozitivitások mellett dsDNS AT, hypocomplementaemia - SLE?
- 2015 nyarán lábszáron több alkalommal spontán gyógyuló purpura-szerű bőrtünet
- 2016 januárjában hőemelkedés
- 2016 márciusi laborvizsgálat: proteinuria, magasabb gyulladáshoz kapcsolódó markerek, vizelettenyésztés negatív

Imunszerológia: C3, C4 enyhén csökkent

Hisztion-AT, C1-q AT pozitív

dsDNS AT >1000 IU/mL

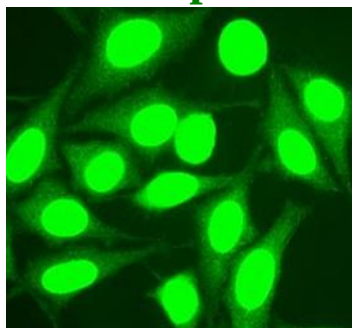
atípusos ANCA (c/p?) pozitív

MPO>100 U/mL, EL, LF AT poz.,

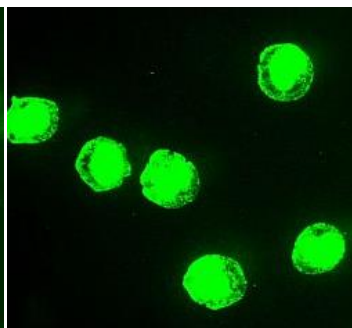
CG AT gy. poz.

**Dg: Szekunder Sjögren sy,
aktív SLE (SLEDAI 18), LN**

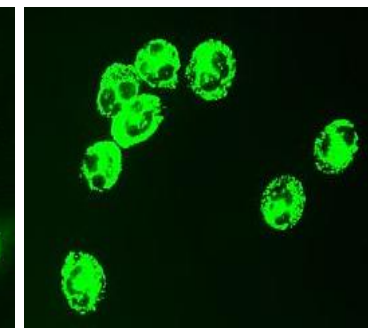
ANA-Hep-2



ANCA-E



ANCA-F



III. Eset: 71 éves nő

- Anamnézisében hypertonia, 2. típusú diabetes, hyperthyreosis (thyreostaticus kezelést kapott), 2011-ben bal középső agyi artéria ischaemiás stroke
- 2014 áprilisában effort dyspnoe miatt vizsgálták – asthma diagnózis
- 2015-ben dyspnoe háttérében pangás - pneumonia véleményezése
- Pulmonológia klinikán mellkas röntgenen fibrózis

Immunszerológia: *RF, ANA, dsDNS, TG, TPO, p-ANCA pozitivitás, MPO CLIA: 647 CU*

Vizelet vizsgálat: *minimálisan beszűkült vesefunkció*

- 2016 februárjában felvétel ORFI Immunológiai osztályára

Immunszerológia: *RF, ANA (+++homogén), dsDNS pozitív/Crithidia teszt negatív, C3/C4 norm, p-ANCA pozitív (atípusos), MPO ELISA negatív*

Kiegészítő ELISA vizsgálat: *Lactoferrin, BPI, EL, LF AT pozitivitás*

MPO CLIA ismételtes: 70 CU

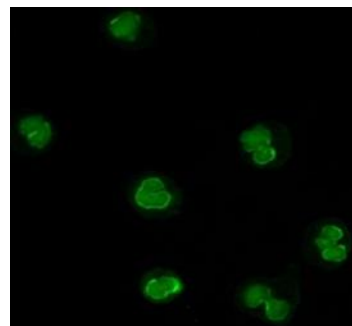
Vizelet vizsgálat: *Karbamid-Nitrogén emelkedett,*

Kreatinin norm

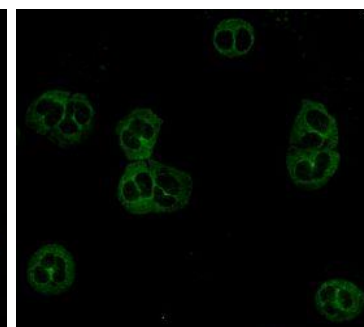
Dg: NDC szisztémás vasculitis / SLE kifutással

(AAV protokoll alapján ciklofoszfamid kezelés indult)

ANCA-E



ANCA-F



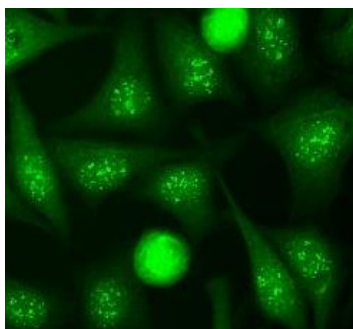


IV. Eset: 79 éves nő

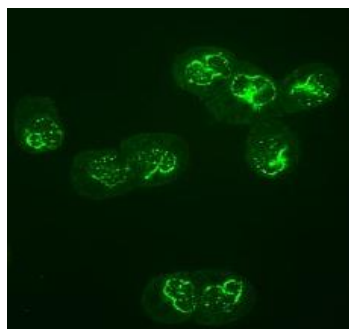
- Több éve diagnosztizált RA
Immunszerológia: RF, CCP, ANA, ACA, SSA, RNP AT pozitivitás
- TNF- α gátló (Humira) kezelés indítása 2010-ben
- 2013-ban *átmeneti dsDNS AT pozitivitás* / *Crithidia teszt negatív* (kis affinitású AT)
- 2016 márciusában jobb lábszár erythemás duzzanata, előlábbon sebek, láz nem volt
Labor vizsgálatok: ESR: 70 mm/h, CRP: 32 mg/L, magasabb RF, C3: 1,34 g/L, C4: 0,03 g/L, cryoglobulin: gyengén pozitív
ANCA AT kimutatás: gyengén pozitív p-ANCA (atípusos?), MPO, PR3: negatív
- TNF- α terápia felfüggesztése

Dg: TNF- α gátló asszociált vasculitis? – immunológiai konzílium

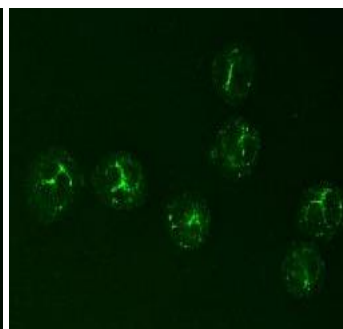
ANA-Hep-2



ANCA-E



ANCA-F



Köszönöm a figyelmet!

