

Autoimmun vizsgálatok

Kristóf Katalin

Semmelweis Egyetem, Laboratóriumi Medicina Intézet,

Mikrobiológiai Laboratórium

Autoimmun betegségek

1. Szisztémás formák:

Szisztémás lupus erythematosus

Rheumatoid arthritis és rokon arthritisek

Sjögren szindróma

Antifoszfolipid szindróma

Scleroderma csoport

Kevert kötőszöveti betegség és UCTD

Gyulladásos myopathiák (myositisek)

Szisztémás vasculitisek egy része

2. Szervspecifikus autoimmun betegségek

- Hashimoto
- Idült gyulladásos bélbetegségek,
- autoimmun hepatitisek,
- demyelinizációs kórképek,
- ITP,
- Graves
- PBC,
- 1 típusú diabetes,
- uveitisek egy része
- AIHA, ...

Immunológiai betegségek vizsgálata

- Anamnézis, fizikális vizsgálat
- Rutin laboratóriumi vizsgálatok:
 - vérkép, gyulladásos aktivitás (süllyedés, CRP)
 - kémiai és vizeletvizsgálat, stb.
- Képalkotó eljárások
 - röntgen, ultrahang, MR, CT, EKG stb.
- Szövetteni vizsgálatok
- Immunológiai laboratóriumi vizsgálatok

Nincs autoimmun diagnosztikus teszt panel!

Az immunológiai tesztek kb. 20%-ban járulnak hozzá a diagnózishoz.

Immunológiai vizsgálatok indikációi

- Milyen mennyiségben képződnek
 - Immunglobulinok
 - Komplementfaktorok
 - Akutfázis-fehérjék
 - Ellenanyagok
 - Immunkomplexek
- Jelen vannak-e patológiás autoantitestek

Autoantitestek

- Autoantitestek szisztémás autoimmun betegségekben
- 1. ANA
- 2. ANCA
- 3. Antifoszfolipid antitestek
- 4. Rheumatoid faktor
- 5. ACPA
- 6. Anti-C1q antitest

- Antinukleáris antitestek (ANA), antinukleáris faktor (ANF), extraháló nukleáris antigének elleni antitestek (ENA)
 - Sejtmag alkotói ellen termelődött autoantitestek
 - Sejtmagból kivonható ribonukleoprotein komplexek

ANA (antinukleáris antitestek)

(gyűjtőfogalom, sokféle antitestet jelent)

• Módszerek:

– DIF

– EIA

– Blot

– CLIA

– Microarray

– Fehérje chip

– (RIA)

– (immundiffúzió)

– (counter IF)

– (LE sejtek kimutatása 1948)

- Szenzitivitás/specifitás!

Az ANA vizsgálat jó a betegség kizárására, kevésbé az igazolására

- Szűrés



- Megerősítés



- autoantitest specifitás

ANA (antinukleáris antitestek)

(gyűjtőfogalom, sokféle antitestet jelent)

ANA gyakorisága különböző betegségekben

SLE	80-100 %
Gyógyszer-indukálta LE	70 %
MCTD	100 %
Sjögren szindróma	70 %
Felty szindróma	70-100 %
PSS	75-85 %
PM/DM	30 %
RA	15-30 %
CAH	40-60 %
Tüdőfibrosis	20 %
Tuberculosis	50 %
Tumorok	10 %
Egészes kontroll	< 5 %

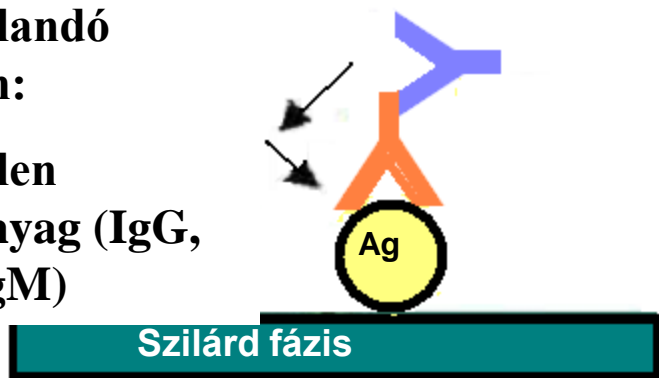
Módszerek: Gold standard:

Indirekt immunfluoreszcencia - ellenanyag meghatározására

Fluoreszcens festékkel (pl. FITZ) jelölt antihumán immunoglobulin

Vizsgálandó szérum:

Jelöletlen ellenanyag (IgG, IgA, IgM)



Tárgylemezre rögzített antigént tartalmazó szervmetszet vagy sejtpreparátum:

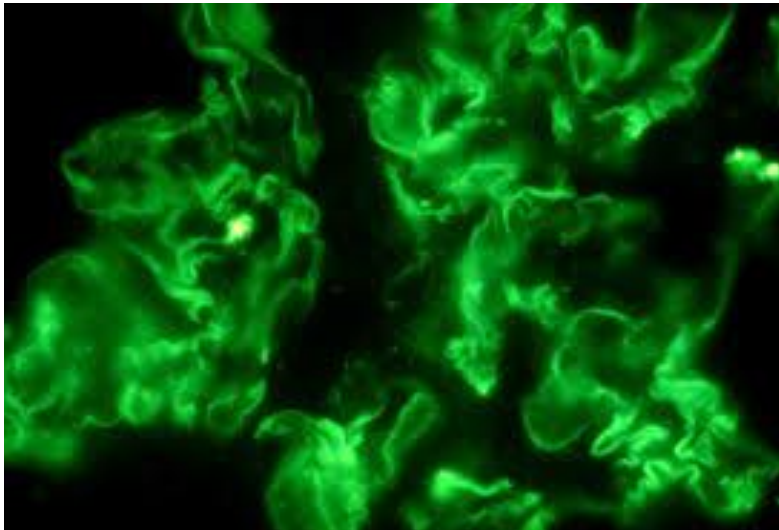
- Rágcsáló máj, vese
- Hep-2 sejtek

Savó hígítása!

- 1:160 titer fölötti pozitivitás esetén további diagnosztikai vizsgálatok
- az álnegatív eredmény valószínűsége nagyon kicsi
- (ami az ELISA és más szilárd fázisú szűrőmódszerekkel lehetséges)

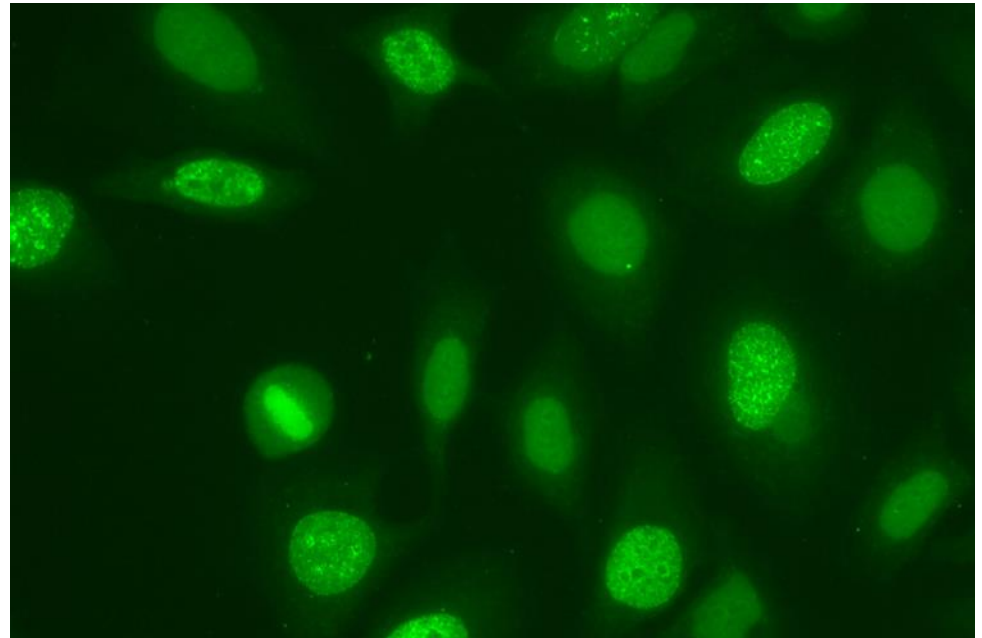
Rágcsáló szervmetszet

- nem humán antigén
- a metszés következtében a sejtmagok roncsolódhatnak
- kisebb sejtmagok
- osztódó sejtek nincsenek
- kevesebb mintázat azonosítható



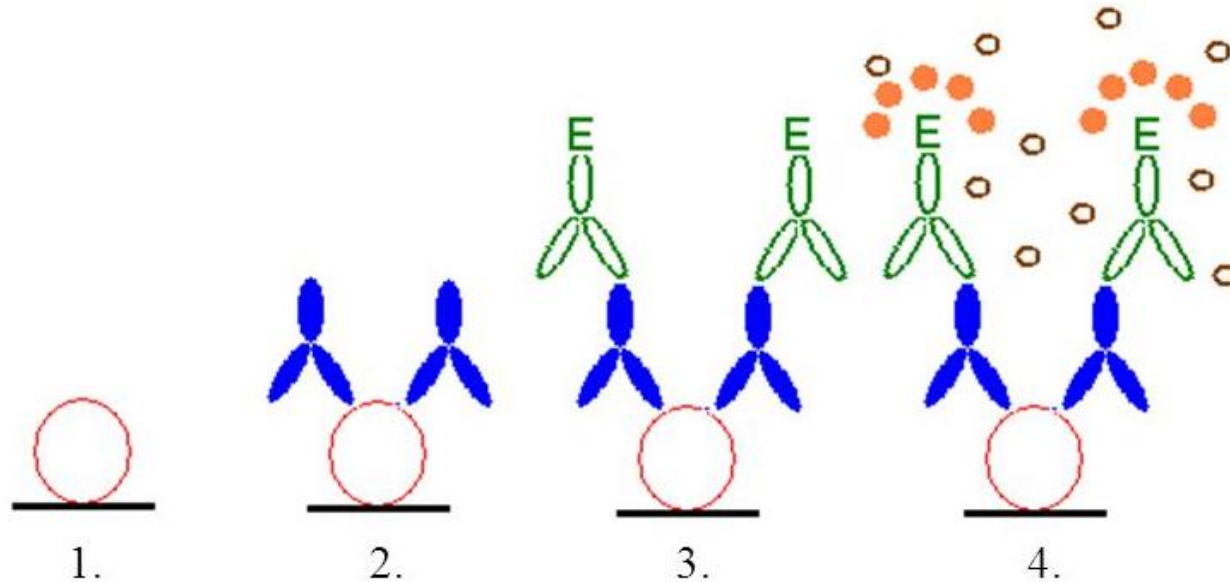
HEp-2 sejtek (human epithelioma sejtvonala)

- humán antigén
- ép sejtmagok, monolayerben
- nagy sejtmagok
- nagyszámú osztódó sejt
- több mintázat azonosítható



Jelentős információ a festődési mintázatból is!

EIA, ELISA



- Antigén
- Antigén – antitestkomplex
- Antigén – antitestkomplex + konjugátum (2. antitest)
- Antigén – antitestkomplex + konjugátum + szubsztrát = színes termék

A színreakció intenzitása arányos a mintában levő autoantitest mennyiségével

Eredmény: negatív / pozitív / titer

Az ANA titere egészséges embereknél $< 1:40$

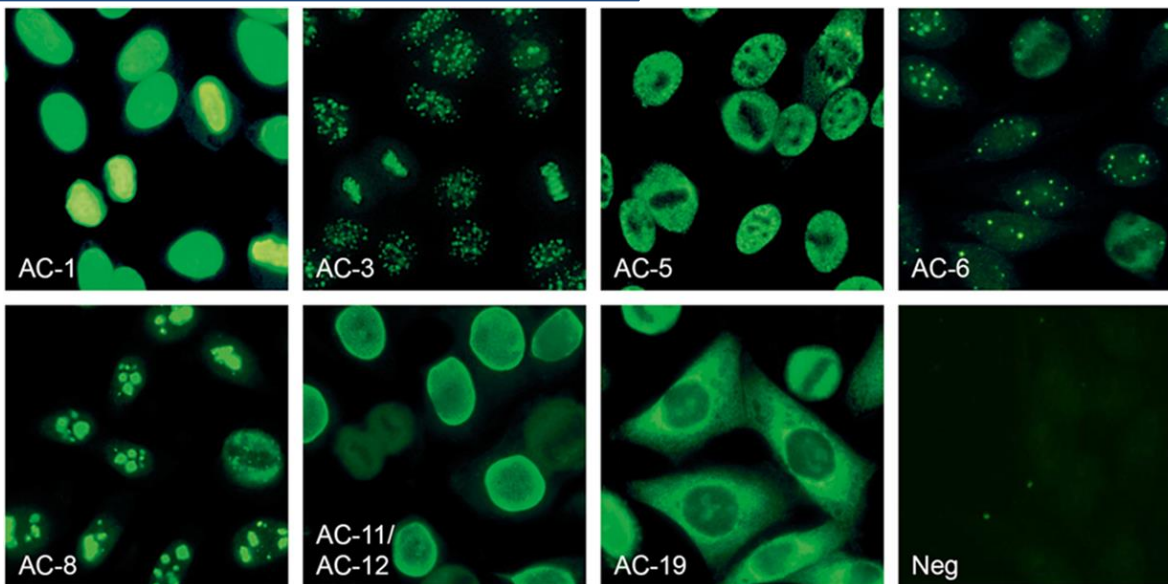
Mikor végezzünk ANA vizsgálatot?

Szisztémás autoimmun betegségekben diagnosztikai és prognosztikai céllal:

- SLE és rokon kórképek
- Gyógyszer indukálta lupusz
- Sjögren szindróma
- Autoimmun hepatitis gyanúja
- Juvenilis idiopátiás artritisz

Mintázat:

- homogén
(a DNS/hisztin elleni antitesteket jelzi és gyakori SLE-ben),
- pettyes/granuláris
(ez a leggyakoribb és ENA-ra: pl. Sm, RNP, SS-A/B-re, stb. utal),
- nucleolaris (elsősorban sclerodermában fordul elő).



Pozitív ANA, ENA teszt esetén szelektíven van lehetőség különböző antitestek vizsgálatára

A legfontosabb antinukleáris antitestek szisztémás autoimmun betegségekben

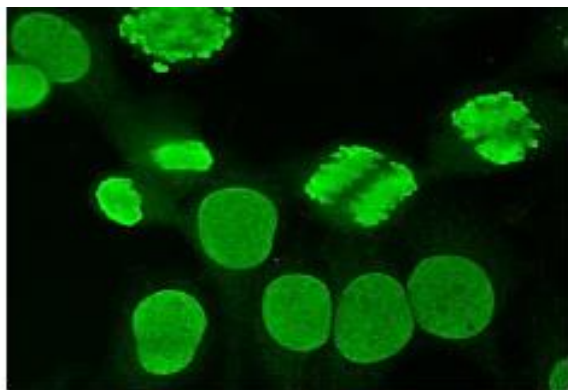
	SLE	MCTD	RA	Sjögren	PM/DM	SSc
dsDNA	60-80%	-	+/-	-	+/-	+/-
nukleoszóma	80-90%	30-40%	-	-	-	30-40%
Hiszton	30-50%	-	-	-	+/-	+/-
Sm (Smith)	10-20%	-	-	-	-	-
(U1)RNP	30-40%	100%	-	+/-	-	+/-
SS-A	40-50%	-	+/-	80-90%	+/-	+/-
SS-B	20-25%	-	-	70-75%	-	-
centromer	-	-	-	-	-	20-30%
Scl-70	-	-	-	-	-	20-30%
Jo-1	-	-	-	-	20-30%	-

Egyéb antinukleáris (és egyéb, nem sejtmag ellen irányuló) antitestek is előfordulnak szisztémás autoimmun betegségekben!

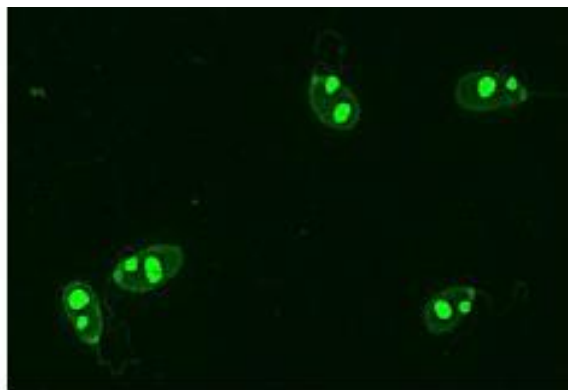
ANA tesztek

Anti-(natív) DNS antitest (Anti-ds-DNS) = anti-kettősszálú DNS= duplaspirálú DNS elleni antitest:

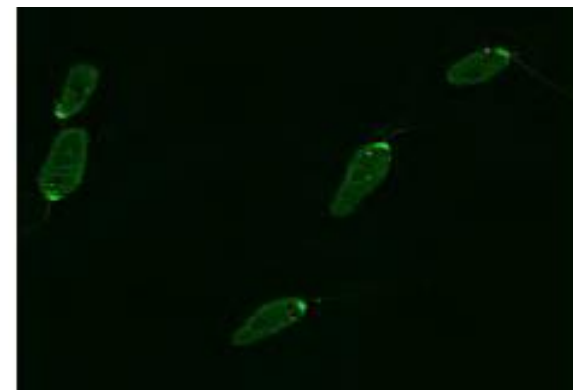
- az **SLE** diagnózisához szükséges, de a betegség monitorozására is alkalmas.
- Negativitása gyakorlatilag kizárja az aktív SLE-t.
- A jelentősen magasabb érték nagyon nagy valószínűséggel SLE-t jelez.
- A 100-at meghaladó érték általában betegség aktivitás mellett szól.



Pozitív dsDNS antitest képe HEp-2 sejteken



Pozitív dsDNS antitest képe *Crithidia luciliae*-n



Negatív dsDNS antitest képe *Crithidia luciliae*-n

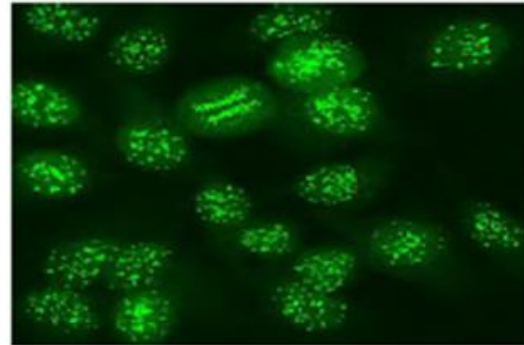
Hiszton antitest:

- nagyon sok szisztémás autoimmun betegségben (SLE, gyógyszer-indukálta lupus, RA, JIA , PSS , stb), előfordul.
- diagnosztikai jelentősége a **gyógyszer-indukálta lupus diagnózisa**.
 - Pl. Prokainamid, penicilamin, karbamazepin, isoniazid

Centromer antitest:

- sclerodermában , ritkábban primer biliáris cirrhosisban

Pozitív Centromer antitest
képe HEp-2 sejteken
(jellegzetes mintázat)



ENA (extrahálható nukleáris antigének elleni antitestek):

SS-A (soluble substance A nuclear antigén, más néven Robert Ag (Ro)) és SS-B (La) antitestek:

- diagnosztikai jelentősége: primer vagy szekunder Sjögren szindróma (SS), SLE, SCLE (subacut cutan lupus erythematosus), neonatalis lupus gyanúja ill. diagnózisa esetén
- Az SS-A és B nagyon gyakran együtt fordul elő.

Jo-1 (aminoacil tRNS szintetáz) antitest:

- myositis (anti-szintetáz szindróma) diagnózisa/differenciáldiagnózisa, ismeretlen eredetű fibrotizáló alveolitis differenciáldiagnosztikája.
- Olyan egyéneknél mutatható ki, akiknél tisztán polymyositis, dermatomyositis vagy más reumás betegségekkel asszociált izomgyulladás áll fenn

Sm-antitest (Smith-antigén, small nuclear ribonucleoprotein particles)

- az SLE diagnózisához szükséges, de a betegség monitorozására is alkalmas
- Központi idegrendszeri, vese-, bőrérzettség előfordulását is jelzi

PCNA („proliferating cell nuclear antigen”) antitest:

SLE-re specifikus (pl. anti-DNS és Sm negativitás esetén)

- A PCNA+ betegeknek vese és központi ir. érintettsége is van

Ku antitest:

- az antigének: különféle DNS-kötő/dependens nonhiszton proteinek (valójában nem ANA).
- polymyositis/scleroderma overlap szindrómáiban fordulnak elő

További ENA-k: MI-2, PMScl, PM-1, stb

Anti-neutrofil citoplazma antitestek (ANCA)

- Neutrofilek és monociták citoplazmájában lévő antigének elleni antitestek gyűjtőneve
- fontosabb formái:
 - proteináz 3 (PR3),
 - myeloperoxidáz (MPO),
 - elasztáz,
 - laktoferrin,
 - baktericid permeabilitást fokozó protein (BPI).

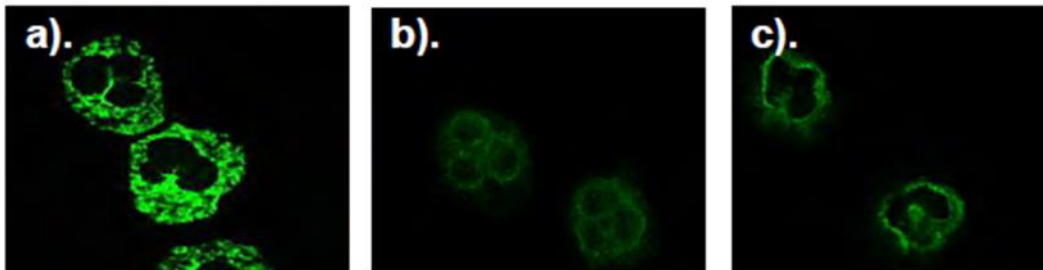
A festődés mintázata háromféle:

- citoplazma (c),
- perinuclearis (p)
- És atípusos lehet.

=>A **c-ANCA** mintázat leggyakrabban a **PR3** és BPI,

=> **p-ANCA** mintázat pedig leggyakrabban a **MPO** jelenlétére utal, de lehet elasztáz és laktoferrin is.

=> A BPI gyakran atípusos festődést ad.



ANCA IIF képe etanollal fixált humán granulocitákon:
a) c-ANCA, b) p-ANCA,
c) atípusos-ANCA

Az ANCA screen indikációi:

- ANCA pozitív vasculitisek (Wegener granulomatosis, mikroszkopikus polyangiitis)
- nephritisek differenciáldiagnosztikája,
- krónikus gyulladáshoz vezető bélbetegség (IBD) gyanúja,
- primer sclerotizáló cholangitis gyanúja,
- vérzéses alveolitis differenciáldiagnosztikája.

Proteináz 3 (PR3) antitest:

- nagyon specifikus Wegener granulomatosisra (>95%), még az atípusos formákra (pl. izolált perifériás neuritis, idiopathiás necrotizáló nephritis, stb) is
- előfordul még egyéb vasculitisekben is.

Myeloperoxidáz (MPO) antitest:

- Mikroszkopikus polyangiitisben (60-80%),
- egyéb eredetű focalis necrotizáló glomerulonephritisben,
- gyorsprogressziójú glomerulonephritisekben,
- ritkán Wegener granulomatosisban, Churg-Strauss szindrómában.
- Goodpasture szindrómában (30-40%),
- idült gyulladáshoz vezető bélbetegségekben,
- illetve a szisztémás autoimmun betegségek (RA, SLE, stb) bizonyos százalékában.

POZITÍV ANCA KÜLÖNFÉLE BETEGSÉGEKBEN

- Wegener granulomatosis (c) >90%
- mikroszkopikus PAN (p) 70%
- Churg-Strauss szindróma 70%
- Graves kór 30%
- colitis ulcerosa (p) 70%
- Crohn betegség (p) 30%
- pr. scl. cholangitis (p) 90%
- autoimmun hepatitis 30%
- Felty szindróma 90%
- krónikus infekciók (BPI) 30%

Antifoszfolipid antitestek:

Szintén gyűjtőfogalom, különféle anionos és neutrális foszfolipidek, illetve az ezeket kötő különféle glikoproteinek elleni antitestek.

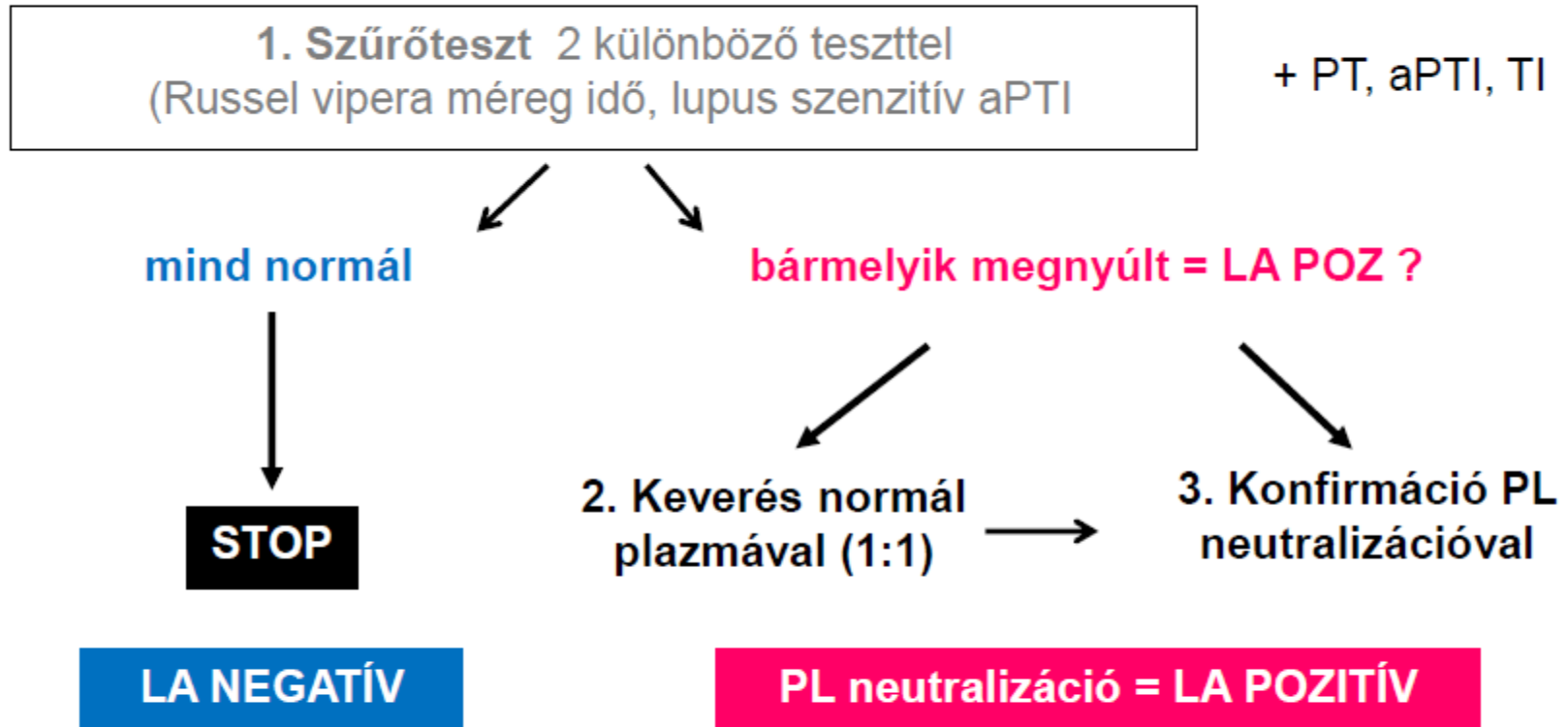
A legfontosabb formái:

- a cardiolipin, ill. a foszfatidilszerin elleni antitestek, valamint a béta-2-glikoprotein I és a prothrombin elleni antitestek – (EIA)
- **lupus antikoaguláns (LA)**, és hexagonális foszfolipid teszt, (funkcionális tesztek)

Diagnosztikai jelentőség:

- a primer és szekunder antifoszfolipid szindrómában (APS), kezelés monitorozása is (vénas, artériás trombózis, trombocitopénia, spontán abortusz, koraszülés, magzati károsodás veszélye)
- SLE-ben a thrombosisveszély rizikójának felmérésére,
- ismeretlen thrombopeniában, SLE gyanúja esetén (diagnosztikai kritérium),

LA vizsgálat algoritmusa (funkcionális teszt)



LA: 2 vagy több alkalom (12 hét különbség)

CL (G/M) AT: mérsékelt/magas titer, 2 vagy több alkalom (12 hét különbség)

Béta-2-GPI (G/M) AT: 2 vagy több alkalom (12 hét különbség)

A rheumatoid faktor (RF)

- pozitív rheumatoid arthritisben (RA-ban)
- Pozitív Sjögren szindrómában és esszenciális kevert kryoglobulinaemiában, (negativitása azonban nem kizáró)

Az RF nagyon sok betegségben (autoimmun betegségeken, infekciókban, stb.) lehet pozitív, specificitása nagyon alacsony!

(lényegében immunglobulinok elleni antitestek, mérésnél leggyakrabban az IgM elleni –t határozzák meg)

POZITIVITÁSA KÜLÖNBÖZŐ BETEGSÉGEKBEN

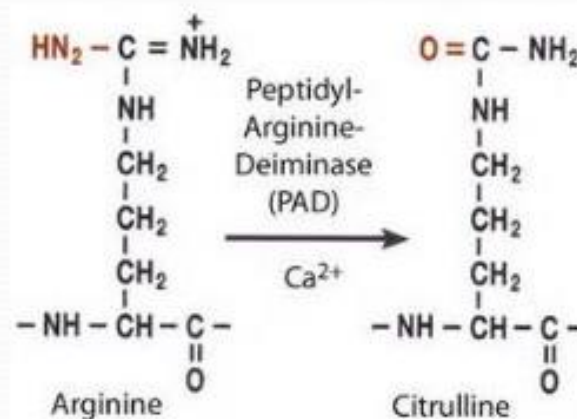
RA	50-90%
SLE	15-35%
SS	75-95%
PSS	20-30%
Kryoglobulinaemia	40-100%
MCTD	50-60%
Vírus infekciók	15-65%
Endocarditis	25-50 %
Májcirrhosis	15-40%
Sarcoidosis	3-33%
Tüdőfibrosis	10-50%
Silicosis	30-50%
Neoplasia	5-25%
Kontroll	<5%

Anti-citrullinált protein antitest (ACPA)

CCP (ciklikus citrullinált peptid) antitest

- **RA**-ra jellemző antitest, mely specifikusabb, mint az RF
- A RA korai (nemspecifikus) stádiumában gyakran pozitív.
- Az új RA klasszifikációs kritérium része.
- A pozitivitás rossz prognosztikai tényező.

Citrullination results from the post-translational modification (ie. not encoded in the original protein) of the amino acid **arginine** to **citrulline** by the enzyme **peptidyl arginine deiminase**



Szervspecifikus autoantitestek

Az antimitokondriális antitest (AMA)

– piruvát dehidrogenáz komplex elleni antitest (M2) pozitivitása primer biliáris cirrhosisban diagnosztikus értékű, de ritkán a teszt pozitív lehet egyéb autoimmun hepatitisben is.

A simaizom (F-aktin) elleni antitest (SMA)

- PBC-ben, autoimmun hepatitisben szinte mindig pozitív, de számos (vírusos, alkoholos) májbetegségben is lehet pozitív, ezért diagnosztikus értéke csekély. (Az ANA-val együtt az autoimmun hepatitis osztályozására használható: az 1. típusban pozitív.)

A májspecifikus proteinek (LSP) elleni antitestek

- A máj- vese mikroszóma elleni antitest (LKM-1; a citokróm P450 2D6 protein elleni) C vírus fertőzést követő krónikus hepatitisekben fordul elő
- a 2. típusú autoimmun hepatitisre jellemzők.

A pajzsmirigy elleni antitestek:

- az anti-thyreoglobulin és anti-microsomális antitestek (más néven anti-peroxidáz, TPO antitestek) autoimmun pajzsmirigy betegségekben (Hashimoto thyreoiditisben és idiopathiás myxoedemában) diagnosztikus értékűek.
- gyakran pozitívak, habár mennyiségük kisebb Graves kórban és néha pajzsmirigy adenocarcinomában is.

A mellékvesekéreg (21-hidroxiláz) elleni antitestek:

- autoimmun (idiopathiás) Addison kórban mutathatók ki.
- A diagnózishoz nem szükségesek, csak a betegség kóreredetére utalnak.

Az anti-glomeruláris bazálismembrán (GBM) antitest

- A IV. típusú kollagén ellen irányul
 - Goodpasture szindrómában (illetve anti GBM nephritisekben) pozitív és egyben diagnosztikus értékű.
- ANCA-val együtt célszerű végezni és általában vesebiopsziás vizsgálat is szükséges

Acetilcolin receptor elleni antitestek:

- Myasthenia gravisban a betegség kialakulásáért felelős antitestek.
- Ennek ellenére nem mindig sikerül az antitesteket kimutatni, kimutathatóságuk a betegség súlyosságától is függ.

Hámantigének elleni antitestek:

- A desmosoma (desmoglein 1 és 3) elleni antitestek pemphigus vulgarisban és foliaceusban fordulnak elő.
- Az epidermalis basalmembrán elleni antitestek bullosus pemphigoidban és a vele rokon betegségekben (pl. dermatitis herpetiformisban) észlelhetők.

Saccharomyces cerevisiae antitestek (ASCA):

- Idült gyulladáshoz társuló bélbetegségekben, elsősorban Crohn betegségben fordulnak elő.

C1q antitest

- A hypocomplementaemiás urticaria-vasculitisben (HUV) 100%-ban pozitív.
- SLE-ben különböző %-ban fordul elő (elsősorban veseérintettségben),
- Membranoproliferatív glomerulonephritisben is.

1.típusú diabetesre jellemző antitestek:

Glutamát dehidrogenáz (GAD) antitest: - inkább felnőttkorban

Inzulin, szigetsejt és IA-2 antitestek: inkább gyermekkori formákban fordulnak elő
(prognosztikai értéke van kialakulására)

Gangliozid/aszialogangliozid antitestek:

GM1 – Guillain-Barré szindrómában,

GQ1b - Miller-Fisher szindrómában,

MAG (myelin-asszociált glikoprotein) – szenzomotoros neuropathiában

Endomízium elleni antitest (EMA)

Cöliákia specifikus autoantitestje

(a retikulin antitestek és a gliadin IgA-típusú antitestek inkább csak szűrővizsgálatra)

Komplement

1. Összkomplement (CH50) és
2. A komplement komponensek (C3, C4) meghatározása:

Indikációja:

- a komplement defektusok kiszűrése,
- az immunkomplex (IC) betegségek (pl SLE, glomerulonephritisek bizonyos fajtái stb.) monitorozása
 - aktív stádiumban az értéke csökken, inaktívban normalizálódik, de a betegségaktivitást érzékenyebben jelzik

3. Komplement aktivációs termékek vizsgálata

4. A keringő immunkomplex (IC) meghatározás diagnosztikus értéke csekély.

- IC betegségekben, pl. SLE-ben a teszt gyakran pozitív, de specificitása alacsony. (Infekciókban általában pozitív).

CRP:

Gyulladásos betegségekben nagyon sokféle akut fázis protein képződik.

- A mindennapi gyakorlatban az akut fázis reakció mértékét a C-reaktív protein (CRP) szintjével jellemezzük.
- A legtöbb autoimmun betegségben (talán az SLE kivételével) a betegség aktivitása és a CRP szintje között elég szoros kapcsolat van, a CRP szintet elsősorban a RA aktivitásának megítélésére használjuk.
- A CRP vizsgálat – az SLE kivételével – gyakorlatilag bármely gyulladás (pl. vasculitisek) monitorozására alkalmas.

Javasolt tesztek szisztémás autoimmun betegségekben:

- SLE** ANA, anti-dsDNA, anti-nucleosoma, ENA (=anti-Sm, Scl-70, RNP, SS-A/B), hiszton, RF, CRP, anti-CL/β2GPI/LA, CH50, C3, C4
- APS** anti-CL/β2GPI/LA, (*thrombin, foszfatidil-szerin, stb*), ill. szekunder esetén továbbiak
- RA** RF, ACPA (=CCP), CRP, ANA, (C3, C4)
- JIA** RF, ANA, CRP
- SS** SS-A, SS-B, (*alfa-fodrin*), ANA, RF, ill. a társult betegség szerint
Scleroderma: Scl-70, anti-centromer, ANA, RNP, (*fibrillarin/U3-RNP, PM-Scl, Th/To*)
- MCTD:** ANA, ENA (=RNP, Scl-70)
- PM/DM:** ANA (HEp-2-n!), ENA (=Jo-1, Scl-70, RNP), (*egyéb myositis-specifikus antitestek*), ill. a társult betegség szerint
- Vasculitisek:** ANCA, CRP, ANA, RF, kryoglobulin (C3, C4...)

Javasolt tesztek szervspecifikus autoimmun betegségekben:

Anaemia perniciosa: parietális sejt antitest (PCA)

Autoimmun hepatitisek: immunglobulinok, ANA, AMA, LKM-1, SMA, máj-specifikus autoantitestek (LSP), kryoglobulin

Primer biliaris cirrhosis: AMA, anti-centromer

Hashimoto thyreoiditis: anti-TPO, anti-TG, (PCA, RF...)

Coeliakia: reticulin, gliadin, endomysium/tTG (IgA)

Crohn/colitis ulcerosa: ANCA, ASCA

Myasthenia gravis: AchR

Guillain-Barré szindróma: gangliozid (GM1) antitest

Sclerosis multiplex: liquor fehérje analízis, (*MBP, MOG*)

1T diabetes: GAD, inzulin-elleni AT, IA-2 antitest, szigetsejt antitest (ICA)

Goodpasture: **GBM**, ANCA

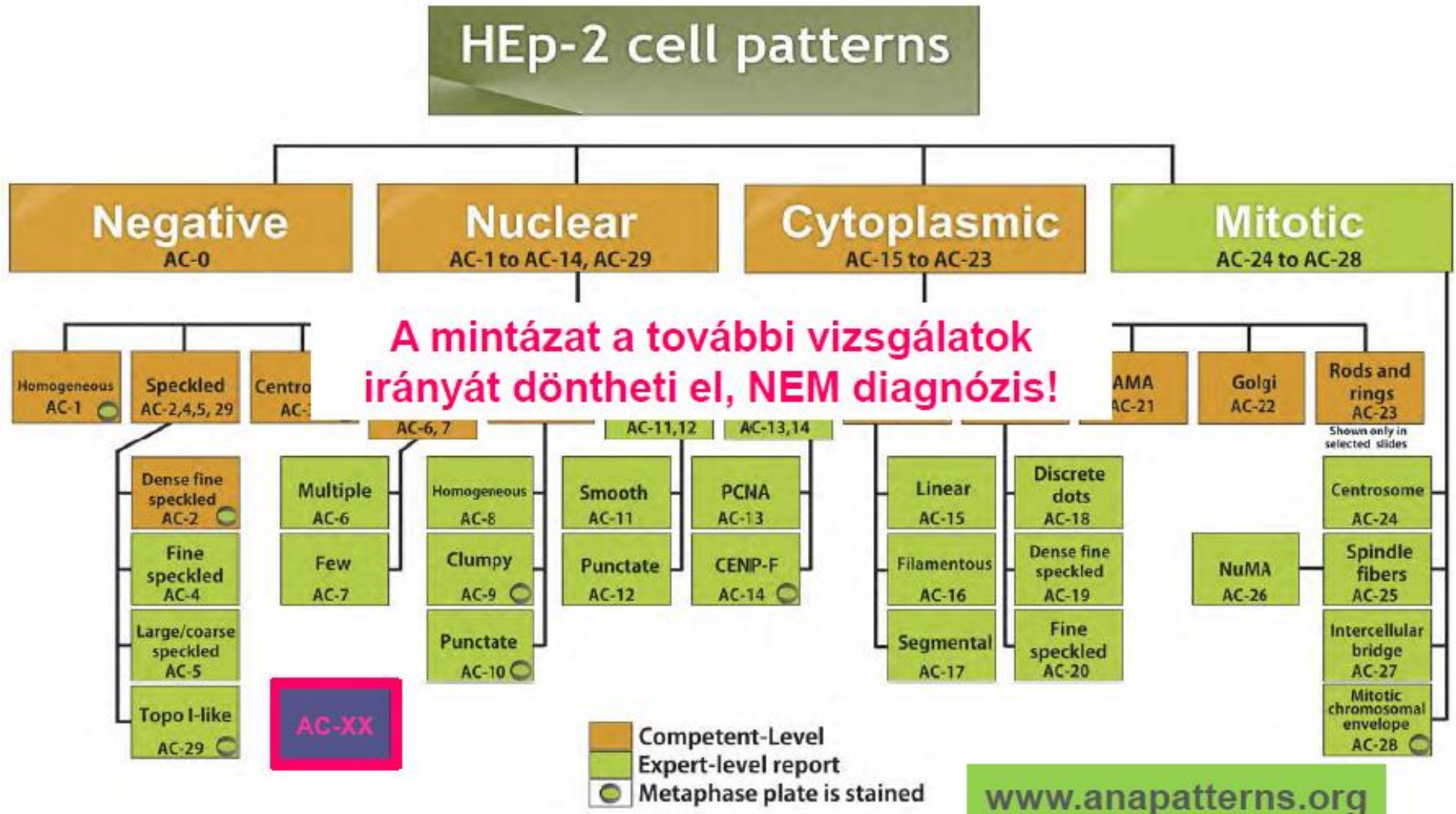
Glomerulonephritis: ANCA, C3, C4, C1q, (ANA...)

AIHA: **Coombs**, (ANA, ENA, anti-DNS)

ITP: (ANA, ENA, anti-DNS)

Pemphigus/pemphigoid: **desmoglein 1, 3; epidermalis basalmembrán**

ANA mintázatok Nemzetközi Konszenzusa - 2017 (International Consensus on ANA pattern (ICAP))



Bélflóra

- a normál bélflóra szükséges az egészséges élethez - immunológia

- mucosalis immunitás indukálása
- orális tolerancia indukálása (GALT)
- változatos B-ly repertoár kialakítása

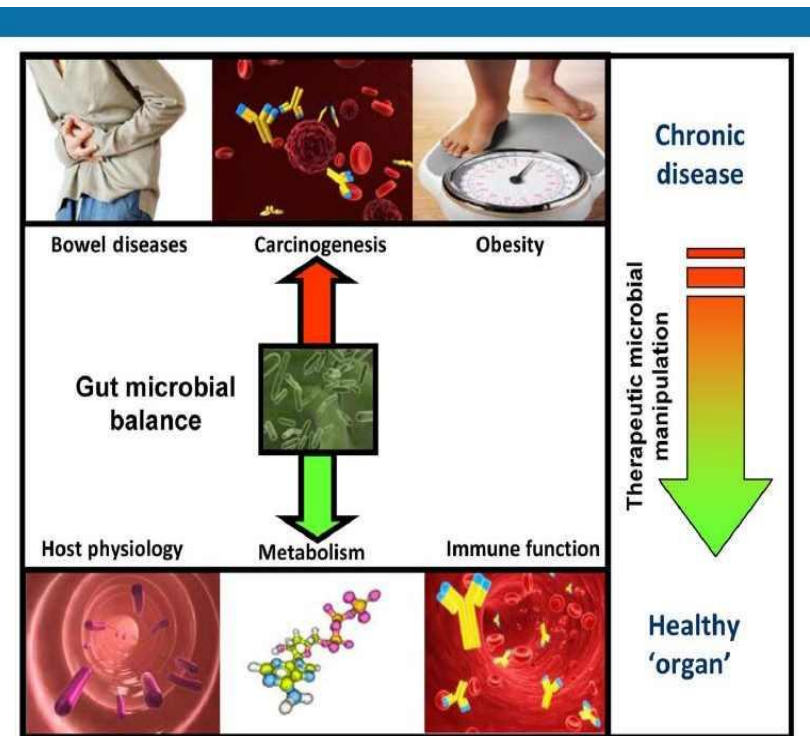
- Egyensúly felbomlása

- allergiás betegségek
- gyulladásos bélbetegségek
- autoimmun betegségek?

- Szimbiózis – fiziológias homeosztázis

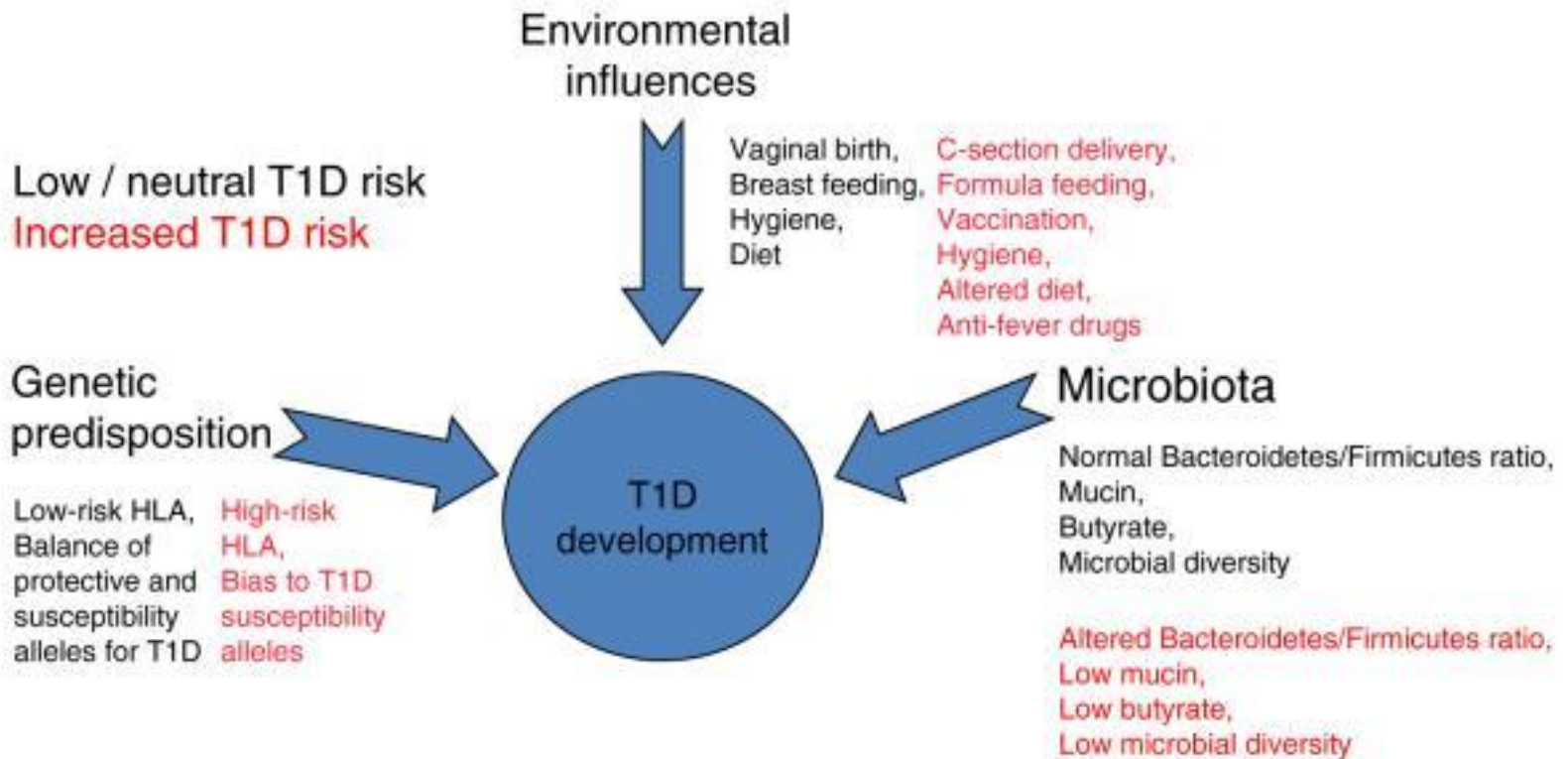
- vitaminok termelése
- összetett poliszaccharidok emésztése
- immunológiai környezet befolyásolása
- normál nyálkahártya immunitás kialakítása
- IgA termelés indukálása, epitheliális barrier kialakítása
- epitheliális sejtek proliferációjára és differenciálódására hatás

- gastrointestinális patogén kórokozók elleni védelem



Diabetes mellitus

- IDDM
 - Bacteroidetes >> Firmicutes
 - Kisebb faji diverzitás



Diabetes mellitus

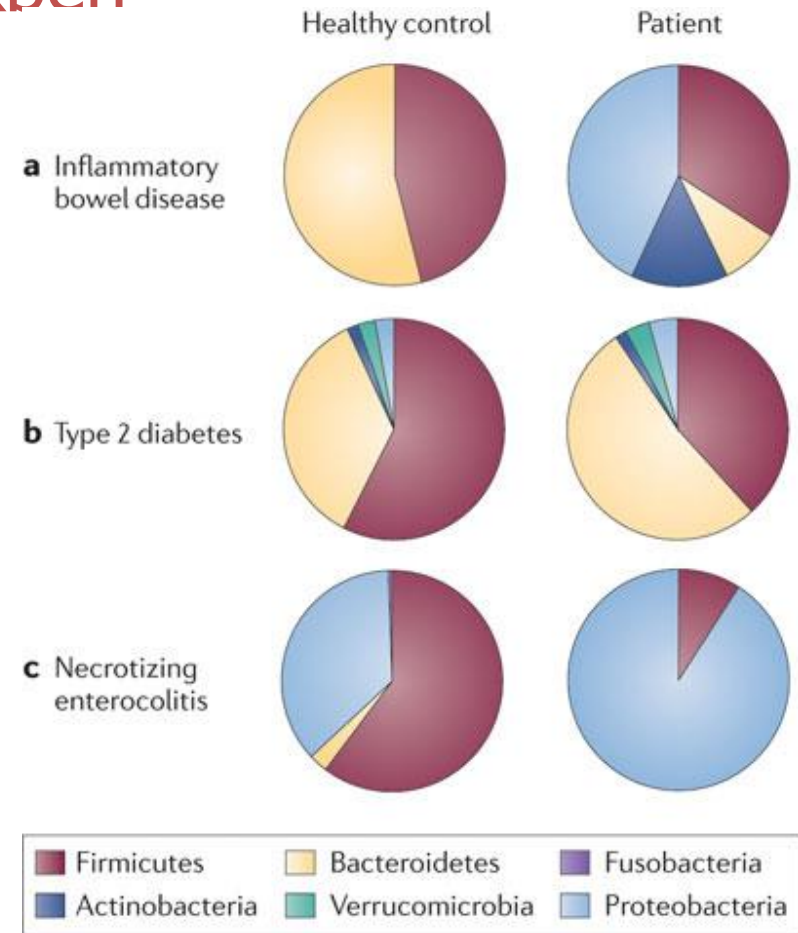
- NIDDM

- Baktériumok LPS-nek proinflammatorikus hatása + magas zsírtartalmú diéta => inzulin-rezisztencia (egér modell)
- Betegek székletflórájában az opportunistá patogének nagyobb számban
- Butyrát termelő baktériumok kisebb számban

- Baktériumok „elvesztése” talán nem olyan fontos, mint ha a funkciójukat nem töltik be

Megváltozott bélflóra igazolható az alábbi betegségeinkben

- IBL
- Irritabilis Bél Syndroma
- Coeliacia
- I és II típusú Diabetes
- Autizmus?
- Daganatok



Nature Reviews | Microbiology

Dysbiosis okozza a betegséget?

metabolikus körképek