

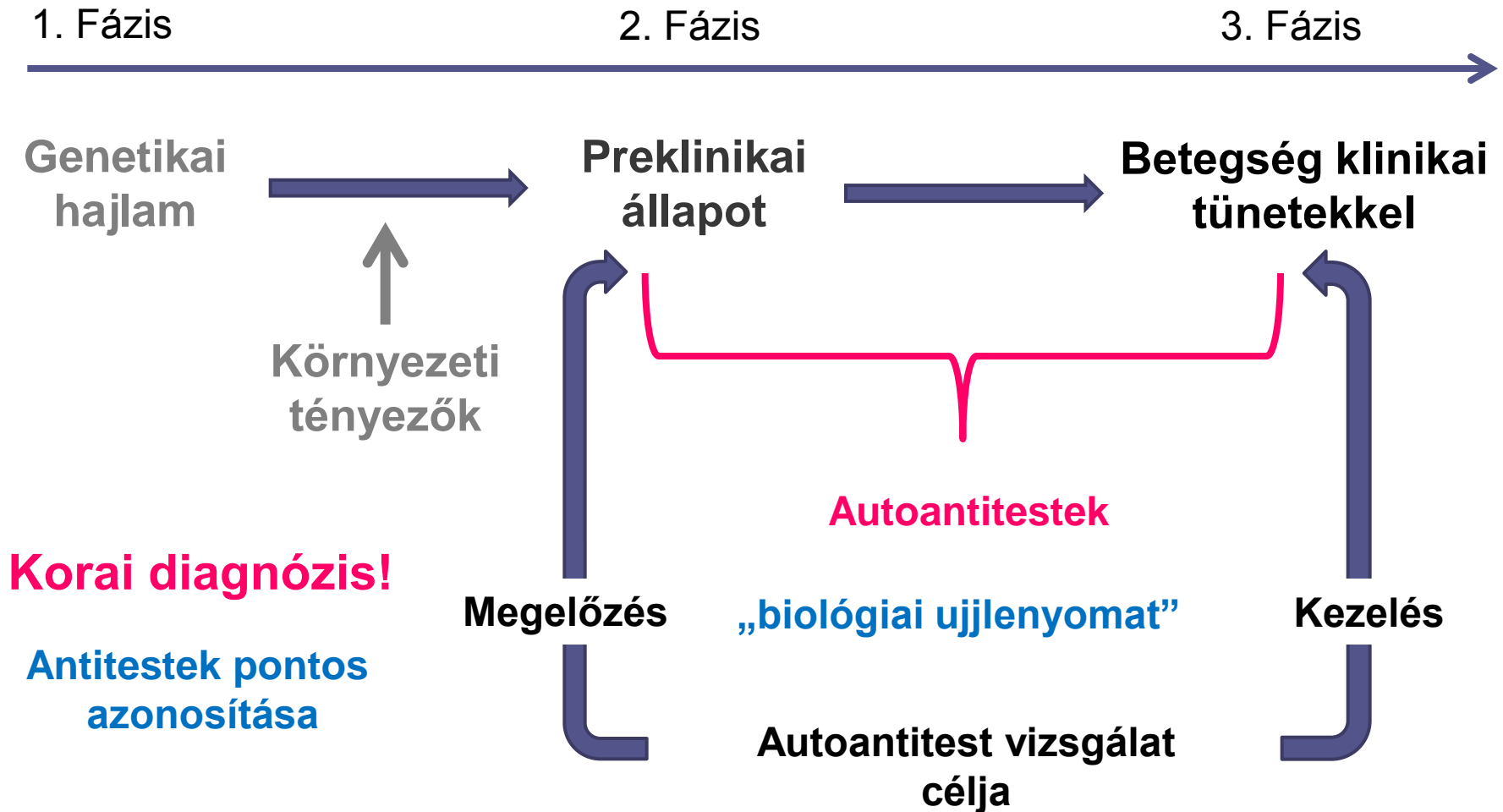
AUTOANTITEST VIZSGÁLATOK KRITIKUS ÉRTÉKELÉSE

Nagy Eszter

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

Budapesti Immunológiai Fórum, 2017 (BIF5)

Autoantitest vizsgálatok fontossága



Autoantitest vizsgálatok autoimmun kórképekben régen és ma

- Kevesebb módszer
- Kevesebb vizsgálat
- Laboratóriumok a klinikákon, klinikusok felügyeletével:
Reumatológus
- Gyakori információ csere



- Napjainkban a laboratóriumok többsége önállóan működik
- Sok az új vizsgálati módszer
- Nagy vizsgálatszám
- Az információ csere jóval ritkább

Rheumatológus

Dermatológus

Belgyógyász

Nefrológus

Gasztroenterológus

Hematológus

Nőgyógyász

Antinukleáris antitest (ANA)

- Az egyik leggyakrabban kért antitest vizsgálat
- Szűrőteszt: sejtmag antigének elleni antitestek (definíció és elnevezés alapján)
- Az ANA vizsgálat célja (mit vár a klinikus?):
 1. Klinikai tünetek megléte esetén a **diagnózis megerősítése**
 2. Nem specifikus klinikai tünetek fennállása esetén a feltételezett **diagnózis alátámasztása**
 3. Egyes **alcsoportok elkülönítése**

ANA vizsgálati módszerek

- a. Indirekt immunfluoreszcencia (IIF)
- b. ELISA
- c. Kemilumineszcencia
- d. Immunoblot

Rutin diagnosztikában ma már mindegyik elérhető (a finanszírozás nincs minden módszernél megoldva!)

A módszer kiválasztása a laboratórium döntése a lehetőségek függvényében

FONTOS:

- **Tájékoztatás a módszer teljesítményeiről (a laboratórium feladata!)**
- **A leleten szerepelnie kell a módszernek**
 - **IIF** esetén a **mintázat és a titer**
 - **ELISA** esetén: **milyen antitestek** szűrésére alkalmas?
(csak néhány antigént tartalmazó ELISA teszt nem fedi le a teljes ANA-t!)

Vizsgálati algoritmus az EASI ajánlása alapján néhány szisztémás autoimmun betegség esetén

Tentative diagnosis	ANA-IIF	a-dsDNA	a-Sm	a-U1RNP	a-SSA/SSB	a-Scl-70	a-Jo-1	a-riboRNP	ANCA-IIF	MPO-ANCA	PR3-ANCA	a-Cardiolipin	a-β ₂ GPI	IgM RF
SLE	■	▲	▲	●	▲			▲				▲	●	●
1° SS	■	●			▲			●				●		●
SSc	■			▲		▲						●		
MCTD	■	▲	▲	▲				▲				●		●
PM/DM	■			▲			▲					●		
APS	■											■	▲	
1° SVV									■	▲	▲			
CDT?	■	●	●	●	▲	●	▲		■	●		■	▲	■

■ Primary screen test
 ▲ Secondary test
 ● Additional test (optional)

a)

a). Scleroderma specifikus antitesteket: RNS-Polimeráz I-III , U3-RNP, Th/To

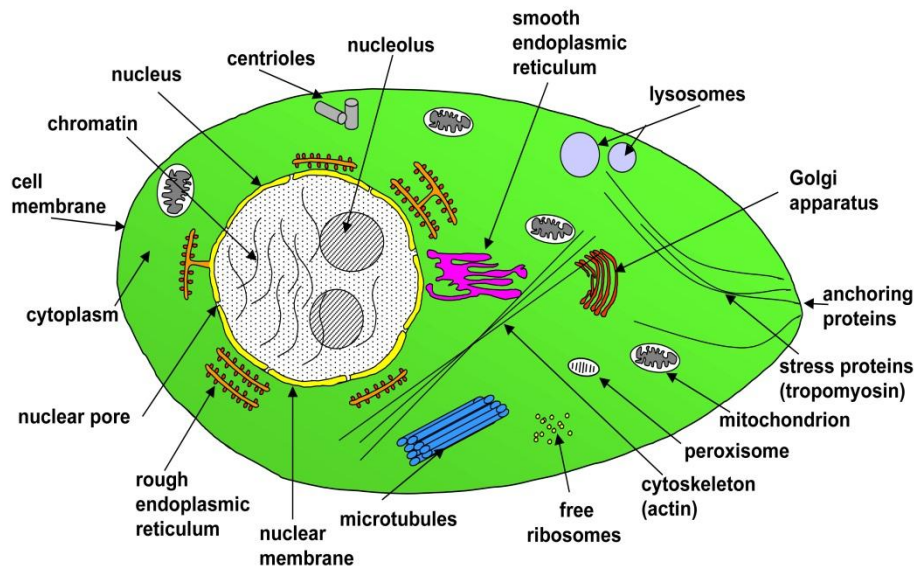
b)

b). PM/DM specifikus antitesteket: tRNS szintetáz, SRP, Mi-2, PM-Scl, Ku

c)

c). Lupus anticoagulans (LA)

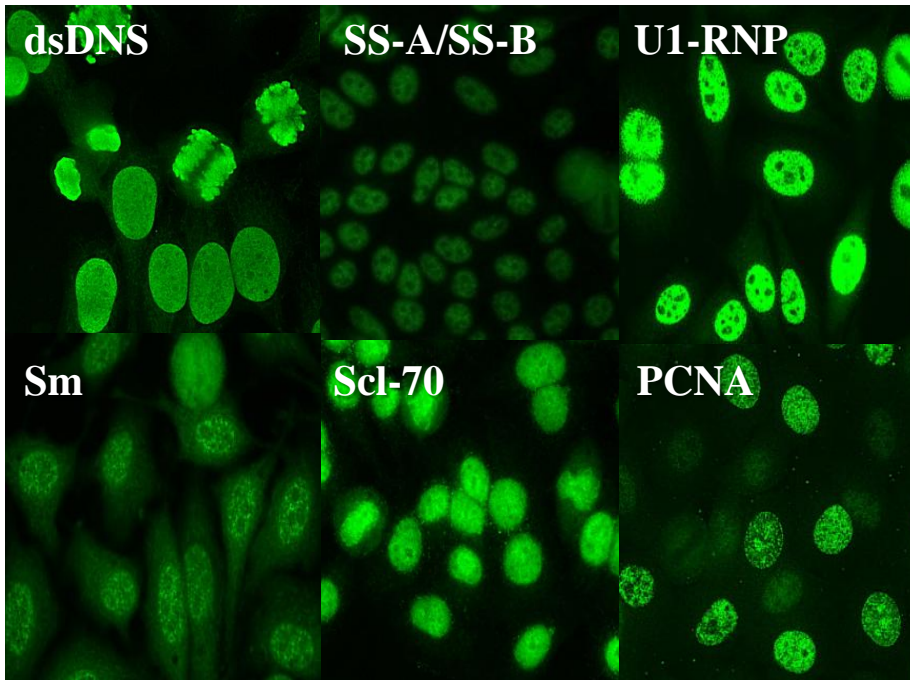
Antinukleáris antitestek (ANA) kimutatása immunfluoreszcens módszerrel - „gold standard”



Bradwell A.E. & Hughes R.G. Atlas of Hep-2 patterns

- A sejt különböző alkotórészei elleni antitestek, nem csak sejtmag elleni antitestek:
„mini-array” (több mint 100 Ag)

Antinukleáris antitestek (ANA) kimutatása immunfluoreszcens módszerrel - „gold standard”

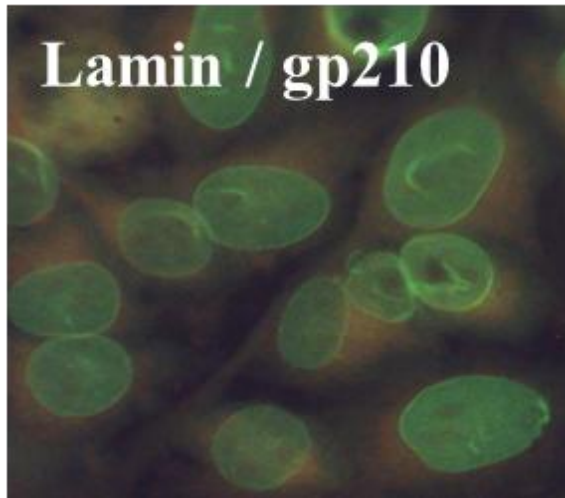


- A sejt különböző alkotórészei elleni antitestek , nem csak sejtmag elleni antitestek:

„mini-array” (több mint 100 Ag)

1. Sejtmag (Nukleoplazma)

Antinukleáris antitestek (ANA) kimutatása immunfluoreszcens módszerrel - „gold standard”

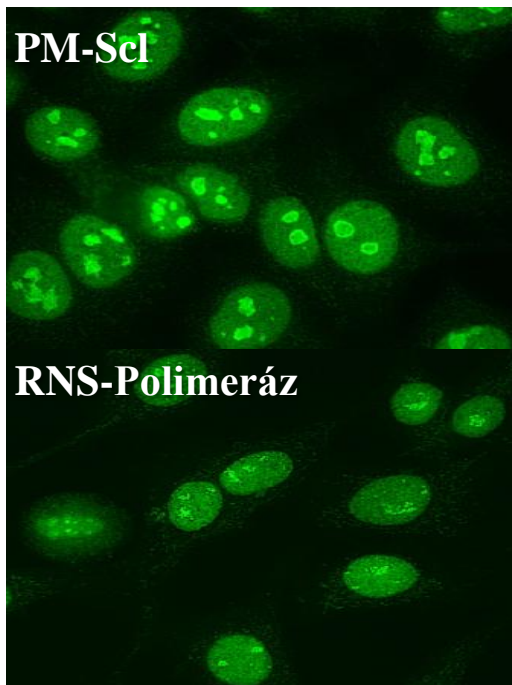


- A sejt különböző alkotórészei elleni antitestek , nem csak sejtmag elleni antitestek:

„mini-array” (több mint 100 Ag)

1. Sejtmag (Nukleoplazma)
2. Sejtmag membrán

Antinukleáris antitestek (ANA) kimutatása immunfluoreszcens módszerrel - „gold standard”

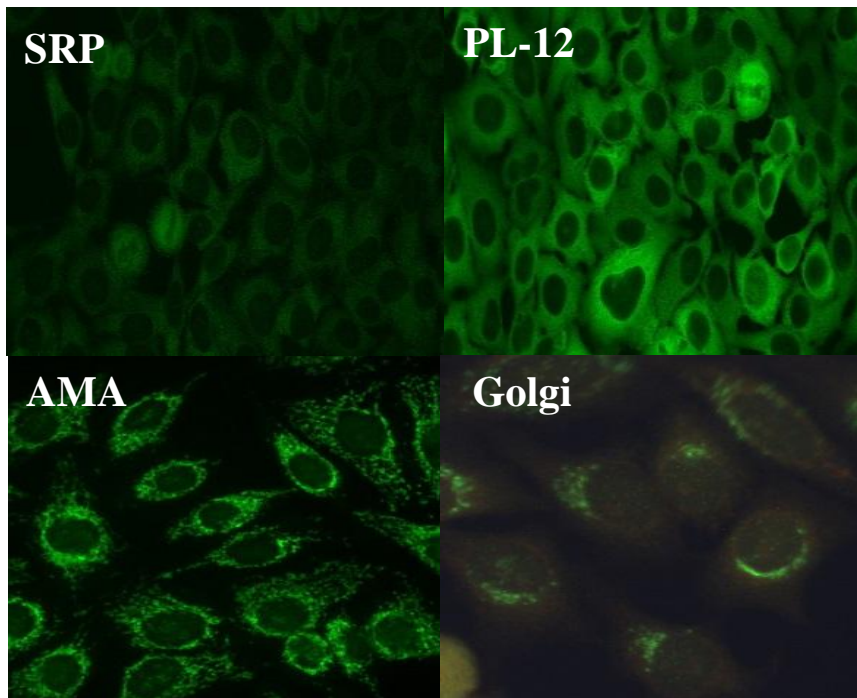


➤ A sejt különböző alkotórészei elleni antitestek , nem csak sejtmag elleni antitestek:

„mini-array” (több mint 100 Ag)

1. Sejtmag (Nukleoplazma)
2. Sejtmag membrán
3. Sejtmagvacska (Nukleolusz)

Antinukleáris antitestek (ANA) kimutatása immunfluoreszcens módszerrel - „gold standard”

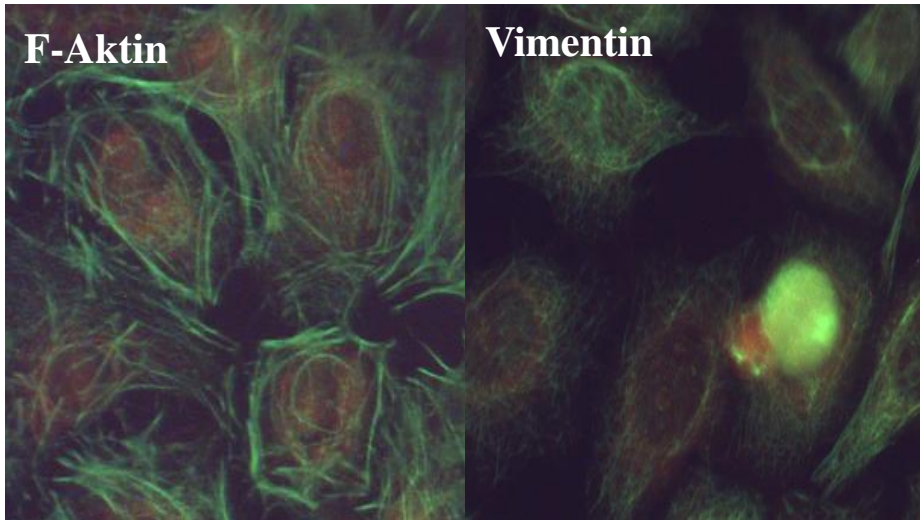


➤ A sejt különböző alkotórészei elleni antitestek , nem csak sejtmag elleni antitestek:

„mini-array” (több mint 100 Ag)

1. Sejtmag (Nukleoplazma)
2. Sejtmag membrán
3. Sejtmagvacska (Nukleolusz)
4. Citoplazma

Antinukleáris antitestek (ANA) kimutatása immunfluoreszcens módszerrel - „gold standard”



- A sejt különböző alkotórészei elleni antitestek , nem csak sejtmag elleni antitestek:

„mini-array” (több mint 100 Ag)

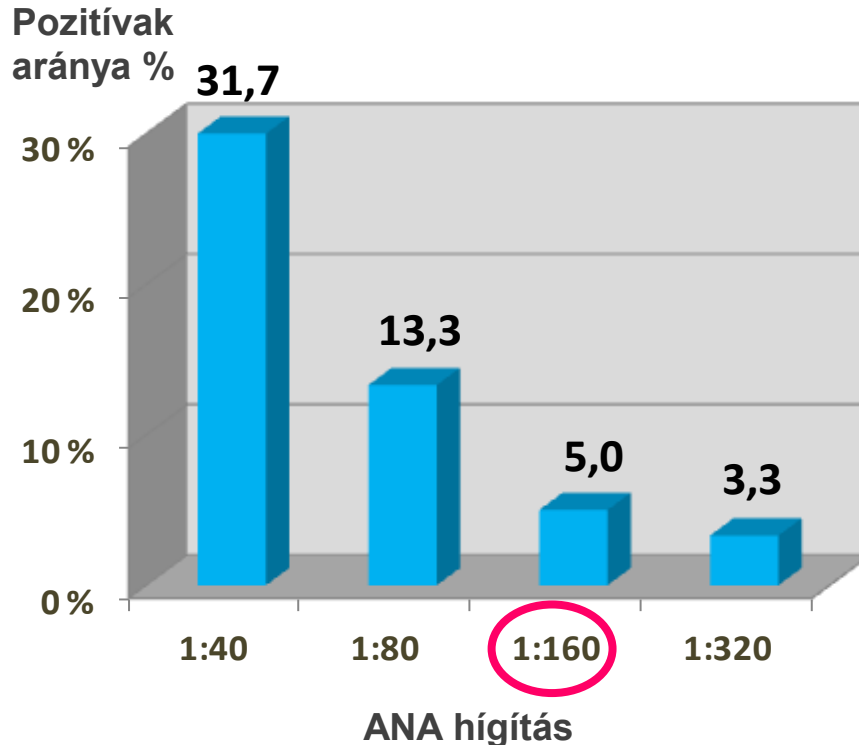
1. Sejtmag (Nukleoplazma)
2. Sejtmag membrán
3. Sejtmagvacska (Nukleolusz)
4. Citoplazma
5. Citoszkeleton

Fontos az interpretáció a klasszifikációs kritériumok miatt!

Pl. citoplazma antitest esetén ANA pozitív vagy negatív?

Mégis mi a baj az ANA IIF teszttel?

az állandó dilemma: magas szenzitivitás, alacsony specificitás



Az ANA pozitív arányának változása a hígítás függvényében, egészséges populációban *Tan EM et al. Arthr Rheum. 1997, 40 (9): 1601-1611*

DE: IIF esetében az álnegatív eredmény valószínűsége nagyon kicsi, szemben az ELISA és más szilárd fázisú szűrőmódszerekkel (Kivétel **SSA, Jo-1, P-Ribosoma – IIF-el nem mindig detektálható!)**

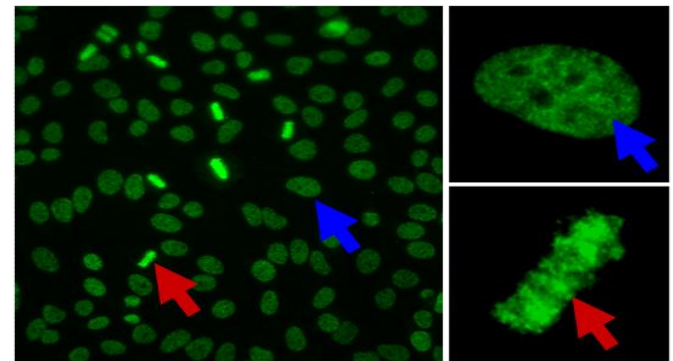
- ✓ Felnőtt populációra igaz
- ✓ Gyerekeknél a hígítás tekintetében nincs konszenzus!
- ✓ JIA esetében fontos lehet az uveitis rizikója miatt

NEM Szisztémás Autoimmun Kórképben az ANA IIF pozitivitás egyik oka a DFS70 antitest

- 597 kórházi dolgozó ANA IIF vizsgálata: a minták 20%-a pozitív
- Az ANA pozitív minták fele jellegzetes foltos mintázatot mutat („dense fine speckled” - DFS)
- A DFS70 antitest pozitivitás ellenére szisztémás autoimmun kórkép nem volt igazolható
- Az ANA **álpozitivitások 12 %-nak oka a DFS70 antitest**

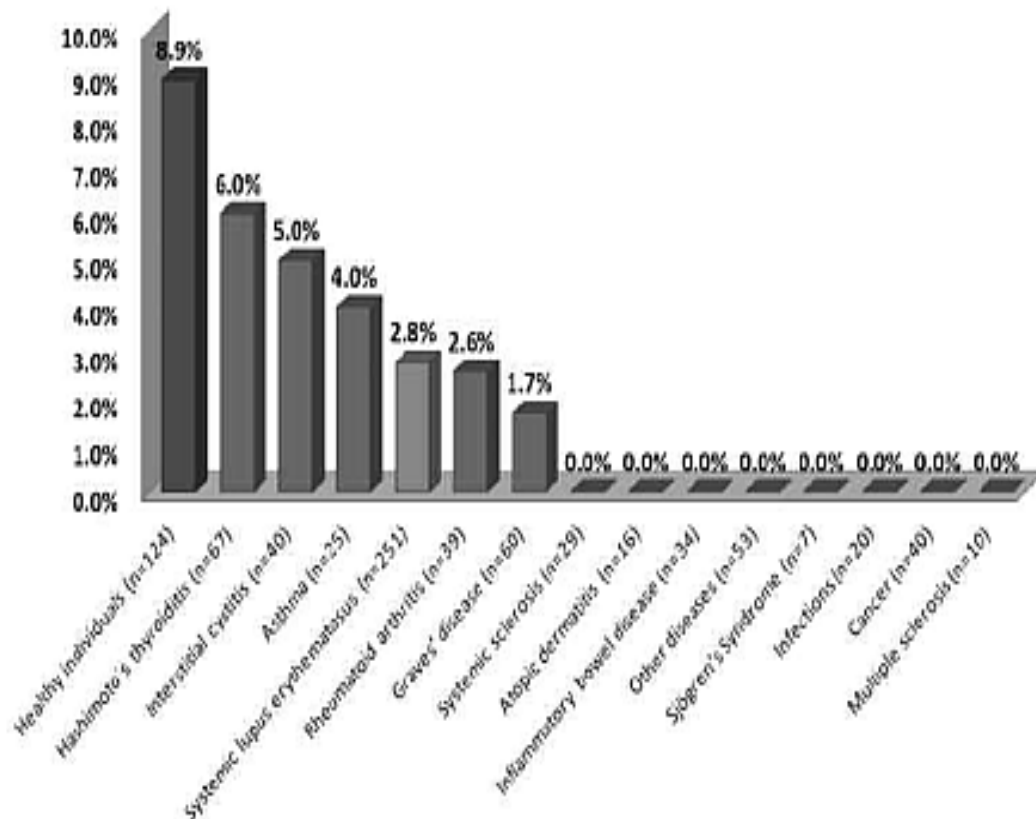
Watanabe A. et al., Arthritis Rheum 2004; 50: 892-900

DFS70 antitest első leírás 1994, intersticiális cisztitiszben, majd atópiás dermatitisben



Mahler M., Fritzler MJ. Clin Dev Immunol 2012; doi: 10.1155/2012/494356

DFS70 antitest izolált előfordulása esetén a szisztémás autoimmun kórkép valószínűsége alacsony



SLE csoportban:

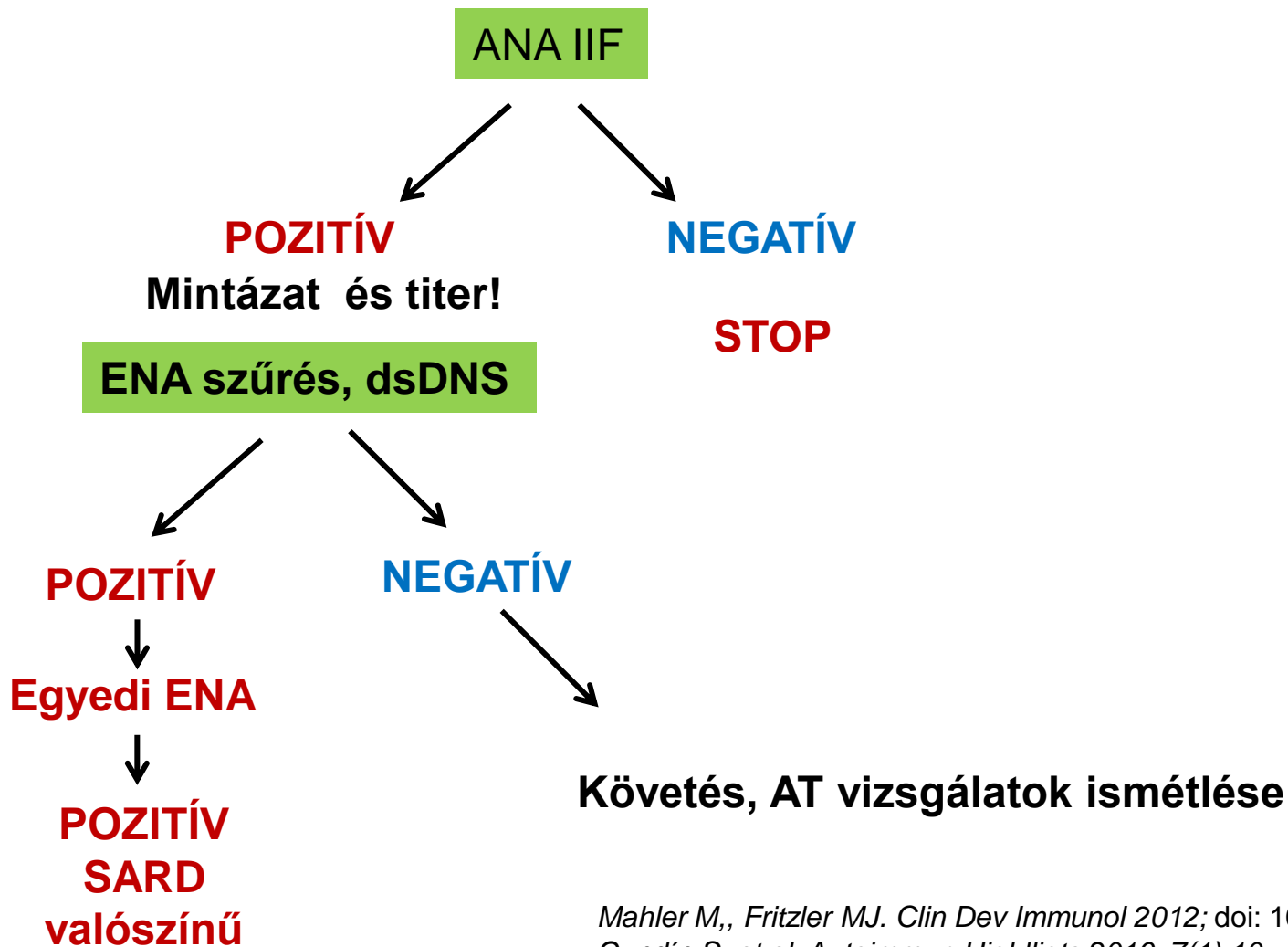
DFS70 antitest gyakorisága 2,8%

A DFS70 antitest mellett **más antitest is előfordult** (c1q, Sm, U1RNP, Kromatin, dsDNS, SSA, SSB)

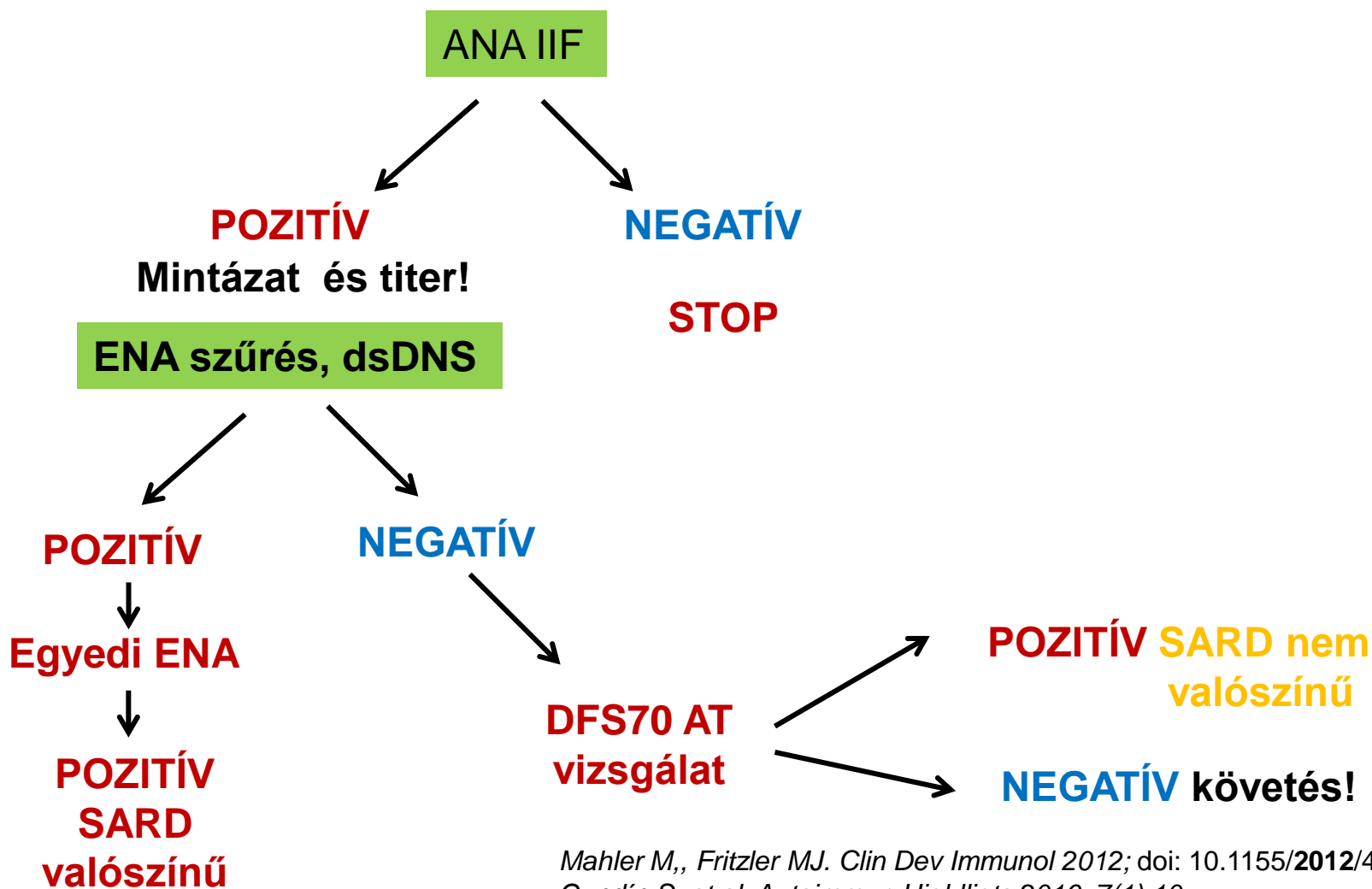
Izolált DFS70 antitest pozitivitás csak egy esetben (de 5 kritérium teljesült az ANA pozitivitástól függetlenül)

A DFS70 antitest gyakorisága (%) magasabb egészségesebben mint a többi betegcsoportban ($p < 0,001$, Fischer teszt)

Vizsgálati algoritmus ANA-asszociált reumatológiai betegségekben (AARD)

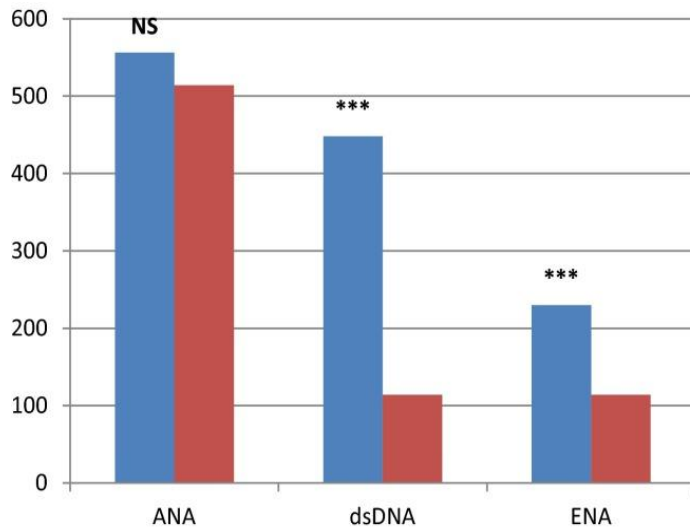


Új vizsgálati algoritmus ANA-asszociált reumatológiai betegségekben (AARD) az anti-DFS70 antitest függvényében

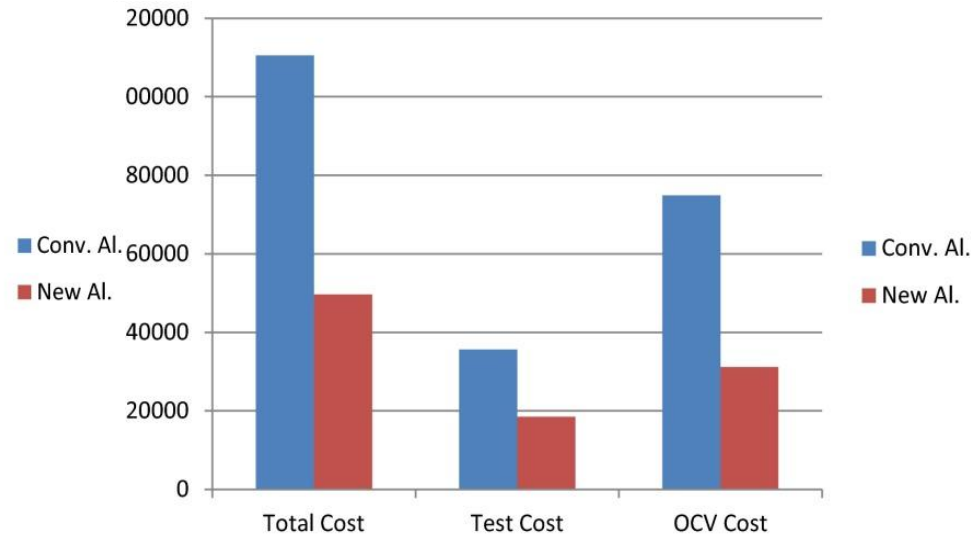


Az anti-DFS70 antitest pontos azonosítása csökkenti az autoantitest vizsgálatok összköltségét

Vizsgált betegek száma: 181, 10 éves követés alatt elvégzett vizsgálatok ANA pozitivitás miatt (SLE, SjS, nem-ANA asszociált gyulladásos betegségek)



ANA IIF, dsDNA és ENA antitest vizsgálatok számának változása az algoritmus függvényében (**p<0,001; **p<0,01; *p<0,05; NS: nem szignifikáns)



A költségek alakulása az algoritmus függvényében (test Cost : vizsgálatok költsége, OCV Cost: ambuláns betegellátás költsége, Total Cost : teljes költség)

ANA vizsgálat Magyarország centrumaiban

LABOR	MÓDSZER 1 ANA szűrés IIF					MÓDSZER 2	MÓDSZER 3	1, 2, 3
	1. HÍG	2. HÍG	Értékelés	Mintázat	DFS70 AT	ELISA	BLOT	
1	1:80	-	titer becslés	igen**	-	sejtextr. + ag	nem	változó
2	1:40	1:160	neg/gy+/+/e+	igen**	igen (konf Ø)	10- 20 ag	nem***	1&2, ***3
3	1:80	1:320	más	igen**	-	sejtextraktum	igen	változó
4	-	-	-	-	-	sejtextraktum	-	2
5	1:80	pontos titer*	más	igen**	Bh	-	nem***	1,***3
6	1:80	1:160	+//+//+//+/ ++++	igen**	Bh	-	nem***	1, ***3

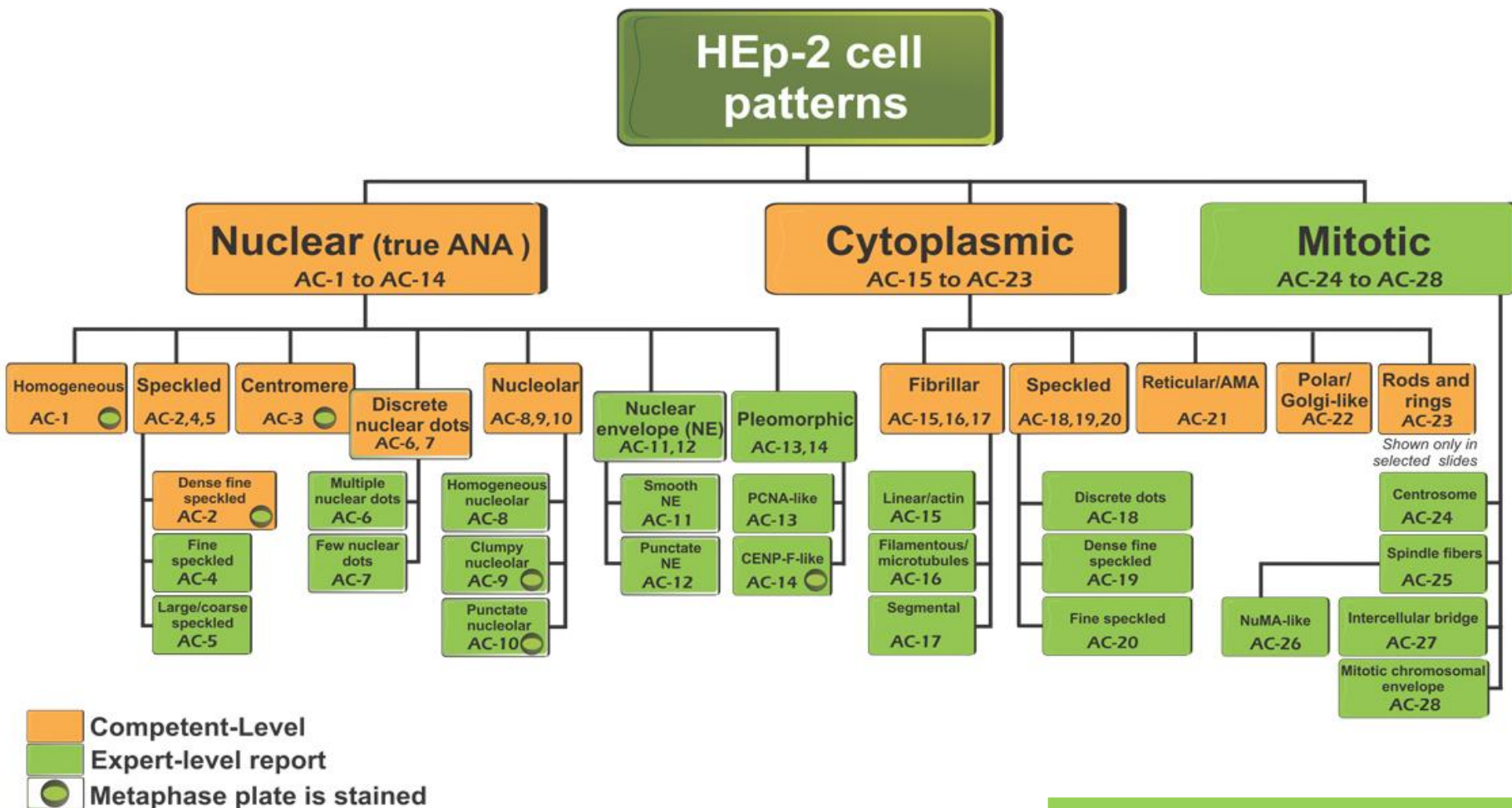
* Titer 1:5120-ig

** szükség esetén magyarázattal

Bh: belső használat

*** szükség esetén konfirmáció

ANA mintázatok - Nemzetközi Konszenzus (International Consensus on ANA pattern (ICAP))



ANA vizsgálat Magyarország centrumaiban (de nagyon sok laboratórium végez ANA szűrést)

LABOR	MÓDSZER 1 ANA szűrés IIF					MÓDSZER 2	MÓDSZER 3	1, 2, 3
	1. HÍG	2. HÍG	Értékelés	Mintázat	DFS70 AT	ELISA	sejtextraktum	
1	1:80	-	titer becslés	igen**	-	-	-	változó
2	1:40	1:160	neg/gy+/+/e+	igen**	-	-	igen**	1&2, ***3
3	1:80	1:160	gy+/+/e+	igen**	-	sejtextraktum	igen	változó
4	-	-	-	-	-	sejtextraktum	-	2
5	1:80	-	más	igen**	Bh	-	nem***	1,***3
6	1:80	1:160	+ / + + / + + + + / + + + +	igen**	Bh	-	nem***	1, ***3

VAN MÉG TENNIVALÓNK!

* Titer 1:5120-ig

** szükség esetén magyarázattal

Bh: belső használat

*** szükség esetén konfirmáció

ANA vizsgálat fontossága 3 eset kapcsán

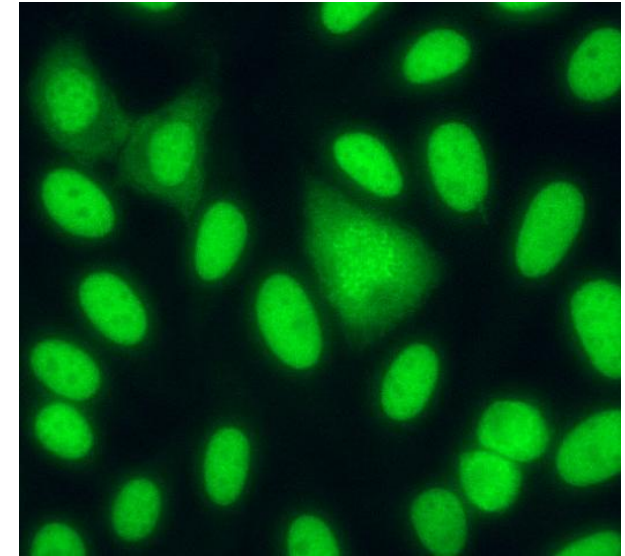
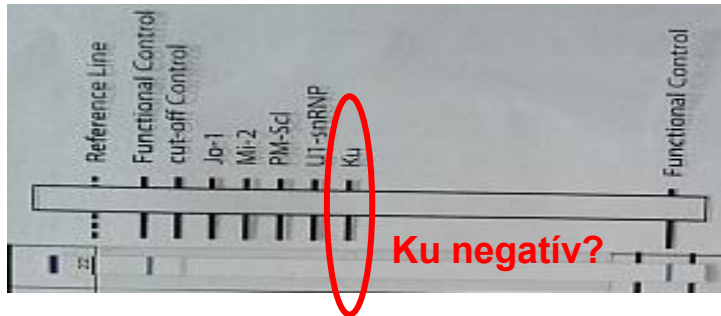
1. Eset: 73 éves nőbeteg

- 10-20 éve tenyereken, talpakon hólyagos kiütések, Psoriasis lehetősége felmerült
- 2016 tavasz: nyak, váll, kéz kisízületek, térdeket érintő polyarthrititis
- 2016 október: az ujjakon 2 fázisú Raynaud
- 2016 december szerológia: We, CRP, vérkép, vesefunkció normális, mérsékelten emelkedett májenzimek, RF, ACPA negatív **ANA: pozitív (ELISA?)**, de kiegészítő vizsgálatok (ENA, dsDNS at.) negatívak

1. Eset (folytatás)

- 2017 február ORFI: Raynaud-ra való tekintettel ANA ismétlés IIF módszerrel: **erősen pozitív, Ku antitest?**

1. gyártó



Ku at. IIF képe Hep-2 sejteken, 40x hígítás 1:80

2. gyártó

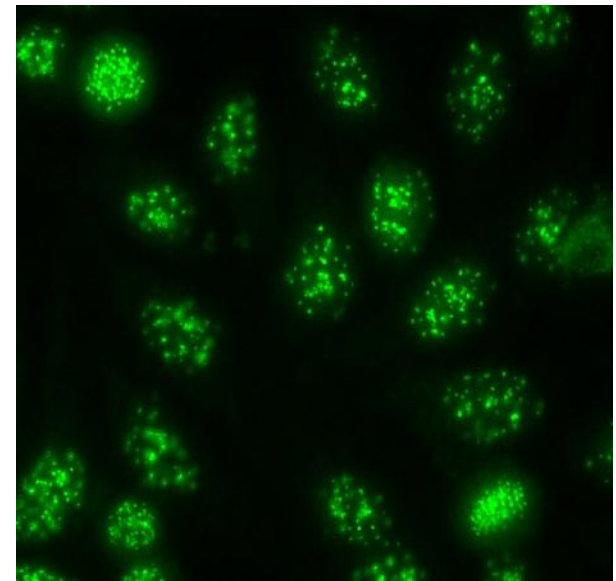


Ko Ro-52 OJ EJ PL-12 PL-7 SRP Jo-1 PM75 PM100 Ku SAE1 NXP2 MDAS TIF-g Mi-2b Mi-2a

- Kapillármikroszkópia: autoimmun háttér lehetőségét megerősíti
- Diagnózis: NDC**

2. Eset: 61 éves nőbeteg

- Kezelt hypertonia
- 6 éve 3 fázisú Raynaud, más szisztémás immunológiai tünet nélkül
- 4 éve ismert hypothyreozis, degeneratív jellegű reumatológiai panaszok
- Kapillármikroszkópia: nem specifikus mikrocirkulációs zavar
- 2016 immunszerológia: **ANA pozitív**, de kiegészítő vizsgálatok (ENA, Scl70, Jo-1) negatívak
- 2017 február ORFI immunszerológia
ANA ismétlés IIF-el: ANA erősen pozitív, Centromer antitest



Centromer at. IIF képe Hep-2 sejteken, 40x, hígítás 1:80

Diagnózis: NDC (limitált cutan Scleroderma?)

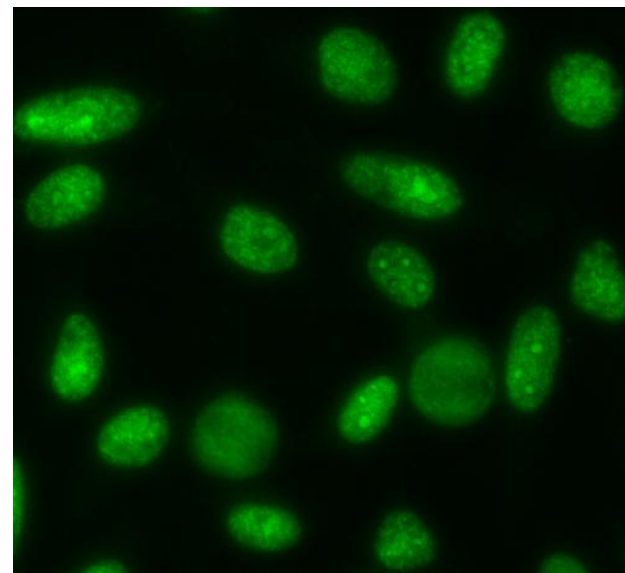
3. Eset: 52 éves nőbeteg

- 2014 csuklófájdalom, kézháti duzzanat, diagnózis: szeronegatív RA
- 2015 immunszerológia: ANA negatív, dsDNA at., ACPA negatív
- **CK, LDH fokozatosan emelkedik** (CK 750 körül)
- 2016 fizioterápia polyarthralgia miatt
- 2017 február ORFI: kézizületi, könyök, váll, derékfájdalom, izomláz szerű fájdalom, Raynaud és Gottron tünet

Immunszerológia: **ANA IIF erősen pozitív foltos nukleoláris mintázattal**, ENA negatív

Immunoblot vizsgálat az ANA mintázat miatt: **gyenge Ku antitest pozitivitás**

Diagnózis: PM/DM?



ANA IIF képe Hep-2 sejteken, 40x hígítás 1:80 hígítás

Köszönetnyilvánítás:

Prof. Dr. Berki Tímea

Dr. Miklós Katalin

Dr. Németh Julianna

Dr. Beleznay Zsuzsanna

Dr. Szabó Zsófia

Dr. Nagy Gábor

Dr. Korda Judit

Dr. Hodinka László

Dr. Niedermayer Dóra



Köszönöm a megtisztelő figyelmet!