Immunológiai laboratóriumi vizsgálatok

NAGY ESZTER

SEMMELWEIS EGYETEM

LABORATÓRIUMI MEDICINA INTÉZET

Immunológiai betegségek diagnózisa

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

Immunológiai laboratóriumi vizsgálatok:

- **Autoantitest vizsgálatok**
- Komplementrendszer vizsgálata
- Immunglobulinok vizsgálata
- Kryoglobulinok vizsgálata
- Quantiferon teszt
- **Allergia vizsgálatok**

Autoantitest vizsgálatok fontossága

- **Diagnózis** felállítása, megerősítése **– marker autoantitestek** (ACPA, anti-dsDNS , anti-CL , anti-TPO)
- **Prognózis** felállítása – **prognosztikus autoantitestek** (pl. ACPA, anti-dsDNS, anti-Ribosoma)
- **Alcsoportok, rizikócsoportok** elkülönítése
- Betegség súlyosságának megítélése
- **Terápia eredményességének** megítélése **– terápiás hatást mérő autoantitestek** (pl. anti-dsDNS at., ANCA, anti-GBM)
- **Átfedő (overlap)** kórképek fennállásának megállapítása

A betegség egy adott időpontjában jelen lévő autoantitestek a betegség folyamatának „biológiai ujjlenyomata”

Autoantitest vizsgálatok

1950-1960

- Kevesebb módszer (némelyik még mindig „arany standard”)
- Kevesebb vizsgálat
- Laboratóriumok a klinikákon, klinikusok felügyeletével:

  Reumatológus

  Klinikai Immunológus
- Gyakori Információ csere

Napjainkban

- A laboratóriumok többsége önállóan működik
- Sok az új vizsgálati módszer
- Nagy vizsgálatszám

  Reumatológus

  Klinikai Immunológus

  Dermatológus

  Belgyógyász

  Nefrológus

  Gasztroenterológus

  Hematológus

  Nőgyógyász
- Az információcsere jóval ritkább

Autoantitestek kimutatásának laboratóriumi módszerei

I. **Klasszikus módszerek:**
- **Immunfluoreszcencia (IFA)**
- **Enzim immunassay (EIA)**
- Immundiffúzió (ID)
- Counterimmunelektroforézis (CIE)
- Radioimmunassay (RIA)

II. **Új módszerek:**
- **FEIA**
- **CLIA**
- **Immunoblot (Line/Dot Blot)**
- Antigén Mikroarray-k
- Fehérje chipek

Szűrés

Megerősítés (Konfirmáció) / Autoantitest specificitás

Fontos: az egyes módszerek szenzitivitása és specificitása eltérő! – a tájékoztatás a laboratórium feladata

Antinukleáris antitest (ANA)

- **Az egyik leggyakrabban kért antitest vizsgálat**
- **Szűrőteszt: ANA - sejtmag antigének elleni antitestek**
- **Valójában sejt elleni antitesteket vizsgálunk (*anti-Cell antibody)***
- **Az ANA vizsgálat célja:**
  - **Klinikai tünetek megléte esetén a diagnózis megerősítése**
  - **Nem specifikus klinikai tünetek fennállása esetén a feltételezett diagnózis alátámasztása**
  - **Egyes alcsoportok elkülönítése (pl. JIA esetében)**

ANA gyakorisága különböző betegségekben

	%
SLE	80-100
Gyógyszer-indukált 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
Egészséges kontroll	< 5

Nem célzott vizsgálat esetén az ANA PPV értéke alacsony!

Mikor kérjünk ANA vizsgálatot?

- **Szisztémás autoimmun betegségek** (SLE és rokon kórképek) gyanúja
- **Autoimmun hepatitis** gyanúja
- **PBC** gyanúja
- **JIA** (prognosztikai célból)

DE monitorozásra nem alkalmas

Antinukleáris antitestek (ANA) kimutatása IFA módszerrel

IFA előnye:

- **Nem csak sejtmag elleni antitestek „mini-array” (több mint 100 Ag):**
  - Sejtmag (Nukleoplazma)
  - Sejtmag membrán
  - Sejtmagvacska (Nukleolusz)
  - Citoplazma
  - Citoszkeleton
- **Bizonyos antitestek további megerősítő teszt nélkül is azonosíthatók** *(pl. anti-centromer)*
- **Álnegatív eredmény valószínűsége nagyon kicsi**

IFA hátrányai:

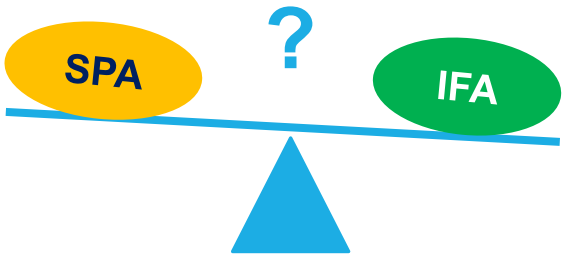
- **Szubjektív**
- **Kiértékelés gyakorlatot igényel**

  (digitális mikroszkópok)
- **Nem standardizált**
- **Alacsony specificitás**
- **Bizonyos antitestek esetén alacsony szenzitivitás** *(SSA, Jo-1, P-Ribosoma – IFA-val nem mindig detektálható!)*

Melyik módszer alkalmasabb az ANA szűrésére?

Az Immunfluoreszcens (IFA) és Szilárd fázisú tesztek (SPA) diagnosztikai pontosságát és összteljesítményét összehasonlító tanulmányok (7)

- **Az ANA asszociált reumatológiai kórképeket (AARD) együtt vizsgálva**



Az SPA módszer teljesítménye az IFA-val egyenértékű, vagy jobb annál

- **DE kórképenként a 2 módszer teljesítménye kórképenként változó:**

Kórkép	Jobb teljesítmény
SLE	IFA
Szisztémás Sclerosis	IFA
Sjögren szindróma	SPA
Myositis	SPA

Külön - külön egyik módszer sem alkalmas az összes AARD diagnosztizálására!

Bizzaro N et al, Ann Rheum Dis, doi:10.1136/annrheumdis-2018-214805

Kereskedelmi forgalomban elérhető ANA tesztek – jelentős különbség az antigének összetételében

Antigen	Automated screening assays					Multiplex assays			Line immunoassays/dot blots					
	EliA CTD	EliA Symphony	QUANTA Flash ENA7	QUANTA Flash CTD Screen Plus	Alegria ANA Detect	Bio-Plex 2200 ANA ALBIA	AtheNA Multi-Lyte Anti-Nuclear Antibodies (ANA)	FIDIS Connective 10	ANA Profile	ImmcoStripe ANA Advanced	ANA12 IgG BlueDot	ANA-12 Pro (BLOT)	recomLine ANA/ENA IgG	ANA Lia MAX
	Thermo Scientific	Thermo Scientific	INOVA Diagnostics	INOVA Diagnostics	Orgentec	Bio-Rad	Zeus	Theradiag	Euroimmun	IMMCO Diagnostics	D-Tek	AESKU Diagnostics	MIKROGEN Diagnostics	HUMAN Diagnostics
U1-RNP	X	X	X	X		X	X		X		X	X	X	
U1-RNP/Sm		X	X	X	X			X			X			
U1-RNP 68 kDa					X					X				X
U1-RNP A														
U1-RNP C														
SS-A/Ro60														
Ro52/TRIM21														
SS-B/La														
Centromere														
Scl-70/topo I														
Jo-1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Fibrillarin/U3RNP	X													
RNA-Pol III	X			X										
Ribosomal P	X			X		X		X	X	X	X	X	X	X
PM/Scl	X			X					X					X
PM/Scl-75										X				
PM/Scl-100					X					X				
PCNA	X			X					X	X	X		X	X
Mi-2	X			X					X	X				X
Sm	X			X	X	X	X		X	X	X	X	X	X
dsDNA	X			X	X	X		X	X	X		X	X	X
Nucleosome					X				X	X		X		X
Histone					X		X		X	X		X	X	X
Ku				X					X	X	X			X
SRP54										X				
AMA-M2									X	X				X

FONTOS!!!

NÉHÁNY (10-15) antigént tartalmazó teszt NEM FEDI LE a teljes ANA-t

Eredményközlés, Lelet interpretáció!

Mahler M et al. J Immunol Res, 2014;2014:315179. doi: 10.1155/2014/315179.

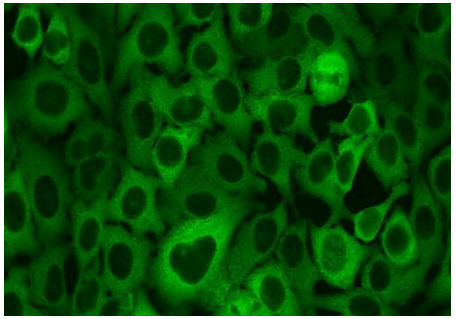
Esetismertetés:

- 49 éves nőbeteg
- 2016 januárjában kezdődő panaszok felső légúti infekciót követően
- Mellkas CT-n nem friss jellegű pneumoniás elváltozás, bronchoscopiával hörgőrendszer hámján mérsékelt, idült gyulladás
- Emelkedett Chlamydia IgM titer miatt AB kezelés
- Továbbra is szubfebrilis, köhögés
- Visszatérő lázas állapotok miatt szteroid kezelés indult
- QF teszt negatív
- 2016 augusztus újabb vizsgálat, pulmonális fibrózis, szteriod kezelés folyatása
- 2016 november gyógyintézeti kezelés, mellkas RTG mindkét alsó lebenyben kötegezettség, halvány homály, szteroid dózis emelése láz, fulladás miatt – állapot javulás
- 2017 fogyás (30 kg), visszatérő lázas állapotok – góckutatás
- Mellkas RTG, CT progressziót mutatott
- Immunszerológia: dsDNS +, SSA +++ és Mi-2 + antitest (immunoblot)

- **2018 október első vizsgálat intézetünkben**
- **Kért immunszerológia: ANA-IFA, ENA-, dsDNS-, CL-, B2-GPI-AT**

ANA VIZSGÁLATI ALGORITMUS!

ANA szűrés, IFA:



ANA képe Hep-2 sejteken, Hígítás 1:80, nagyítás 400x

- **ANA (IFA): pozitív, citoplazma antitest!!! (mintázat)**
- **ENA ELISA: pozitív, SSA AT (87 U/mL, CO: 20 U/mL)**
- Anti-dsDNS (ELISA): negatív
- Anti-CL, anti-B2GPI (ELISA): negatív
- **Myositis panel, immunoblot: SSA/Ro-52 és PL-12 AT**

2017 - ANA panel, immunoblot: dsDNA, Nucleosoma, Histon, SmD1, PCNA, P0, SS-A/Ro 60, SS-A/Ro 52, SS-B/La, CENP-B, Scl70, U1-snRNP, AMA M2, Jo-1, PM-Scl100, Mi-2, Ku 70/80

2018 - ANA IFA szűrőteszt alapján célzott myositis panel, immunoblot: SSA/Ro-52, OJ, EJ, PL-12, PL-7, SRP, Jo-1, PM75, PM100, Ku, SAE1, NXP2, MDA5, TIF-γ, Mi-2β, Mi-2α

Nemzetközi ajánlások, harmonizáció

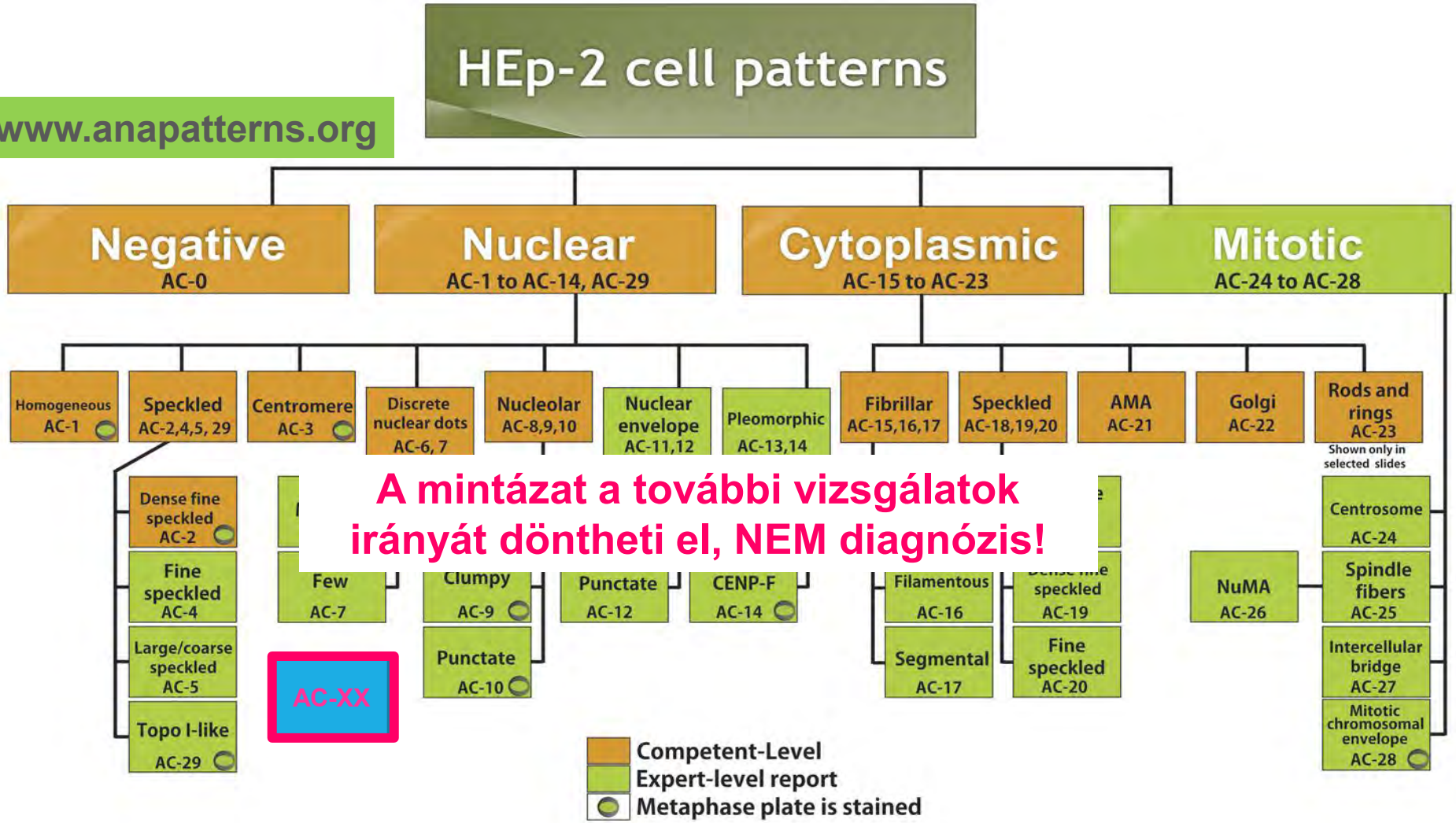
- **EASI – European Autoimmunity Standardisation Initiative (2002):** szisztémás autoimmun reumatológiai betegségek (SARD) diagnózisának javítása céljából:
  - Vizsgálati módszerek, tesztek standardizálása
  - Vizsgálati algoritmusok felállítása
  - Vizsgálatok értékelésének harmonizálása

  Helyi EASI csoport több országban (Magyarország, 2018)
- **Az ANA mintázatok nemzetközi konszenzusa (ICAP): több nyelven** *online* **hozzáférhető (www.anapatterns.org)**
- **Nemzetközi ajánlások az ANA vizsgálatára (2014):** 25 ajánlás (EASI / IUIS / WHO / Arthritis Foundation / CDC autoantibody standardising committee):
  - ANA vizsgálat : 13 ajánlás
  - dsDNS antitest vizsgálat: 5 ajánlás
  - Anti-ENA antitestek: 5 ajánlás
  - Az egyes módszerek helyi szinten történő validálása: 2 ajánlás

Agmon-Levin N et al. Ann Rheum Dis. 2014 Jan;73(1):17-23. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-203863. Epub 2013 Oct 14. PMID: 24126457.

International Consensus on ANA patterns (ICAP) – egységes nevezéktan

www.anapatterns.org

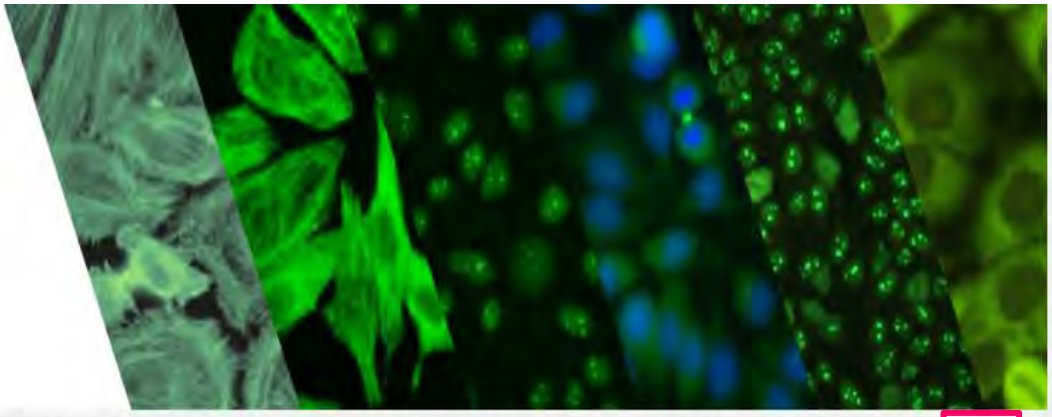


A mintázat a további vizsgálatok irányát döntheti el, NEM diagnózis!

ICAP – mintázatok, klinikai asszociáció

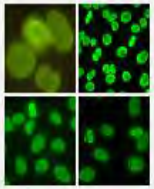
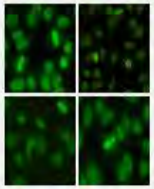
www.anapatterns.org

ICAP
INTERNATIONAL CONSENSUS ON
ANA PATTERNS



English Português Español Italiano Dutch Deutsch 简体中文 繁體中文 Français Türkçe Русский Bosanki Magyar

ANA Patterns - Nuclear Patterns

Code	Pattern	Previous Nomenclature	Description	
AC-1	Nuclear homogeneous	Diffuse	Homogeneous and regular fluorescence across all nucleoplasm. The nucleoli maybe stained or not stained depending on cell substrate. Mitotic cells (metaphase, anaphase, and telophase) have the chromatin mass intensely stained in a homogeneous hyaline fashion.	
AC-2	Nuclear dense fine speckled	none	Speckled pattern distributed throughout the interphase nucleus with characteristic heterogeneity in the size, brightness and distribution of the speckles. Throughout the interphase nucleus, there are some denser and looser areas of speckles (very characteristic feature). The metaphase plate depicts strong speckled pattern with some coarse speckles standing out.	

Szisztémás autoimmun kórképek laboratóriumi vizsgálata

SLE DIAGNÓZIS, klasszifikációs kritériumok:

	Classification Criteria			
Autoantibody	**1982 ACR**	**1997 ACR**	**2012 SLICC**	**2019 EULAR/ACR**
anti-dsDNA	antibody to native DNA at abnormal titer	antibody to native DNA at abnormal titer	anti-dsDNA above laboratory reference range *(except ELISA: twice above laboratory reference range)*	anti-dsDNA antibodies (highly specific antibodies) *(in an immunoassay with demonstrated ≥90% specificity for SLE against relevant disease controls)*
ANA	abnormal titer of ANA by immunofluorescence or an equivalent assay at any point in time	abnormal titer of ANA by immunofluorescence or an equivalent assay at any point in time	ANA above laboratory reference range	**entry criterion** ANA at a titer ≥1:80 on Hep-2 cells or an equivalent positive test at least once
anti-phospholipid (aPL)		abnormal serum level of IgG or IgM anti-CL antibody lupus anticoagulant (LA)	anti-CL (IgG, IgA or IgM) at medium or high titer *OR* anti-β2-GPI antibody (IgG, IgA or IgM) *OR* lupus anticoagulant (LA)	anti-CL (IgG, IgA or IgM) at medium or high titer *OR* *(>40 APL, GPL or MPL units, or >the 99th percentile)* positive anti-β2-GPI antibody (IgG, IgA or IgM) *OR* positive lupus anticoagulant (LA)
anti-Sm	antibody to Sm nuclear antigen	antibody to Sm nuclear antigen	presence of anti-Sm antibodies	presence of anti-Sm antibodies (highly specific antibodies)
Relative weight	**2/11**	**2/11**	**4/17***	**8/51**

*at least 1 immunological criterion required

SLE DIAGNÓZIS:

Immunológiai vizsgálatok

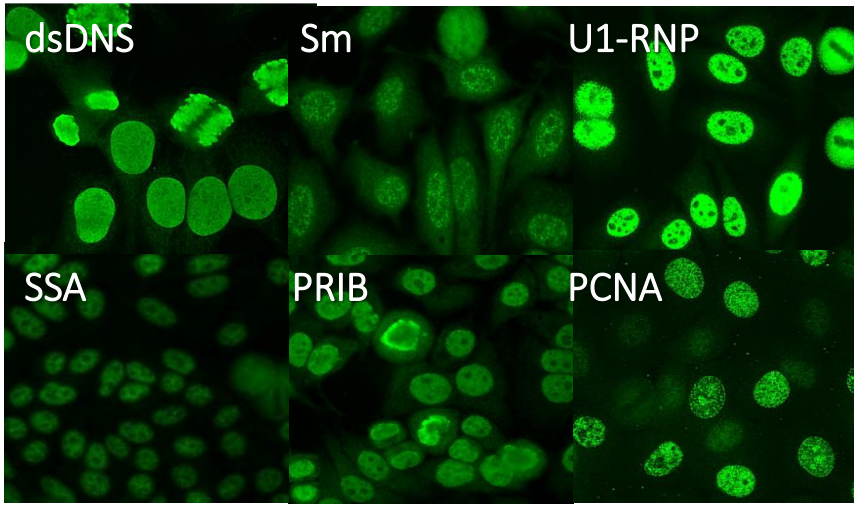
- **Antinukleáris antitest (ANA)**
- **Anti-dsDNS, anti-Nucleosoma (anti-Kromatin) antitest**
- **ENA antitest (anti-SSA, anti-SSB, Sm, RNP)**
- **aPL antitest (anti-CL, anti-beta2-GPI (G/A/M), LA**
- **komplement (C3, C4, CH50)**
- **Direkt Coombs**
- **RF, Immunglobulinok**

Kémiai, hematológiai vizsgálatok

- **CRP, ESR**
- **Vérkép**
- **Vizelet**

Kiegészítő vizsgálatok

- **P Ribosoma antitest**
  (negatív anti-dsDNS és anti-Sm)
- **PCNA antitest** *(vese és közonti idegrendszeri érintettség)*



ANA mintázatok SLE-ben Hep-2 sejteken

SLE KÖVETÉS:

Immunológiai vizsgálatok

- **anti-C1q antitest** *(elsősorban veseérintettség esetén)*
- **anti-dsDNA antitest, Nucleosoma**
  (szintje az aktivitás, lupus nephritis jelzője)
- **komplement (C3, C4)**

Kémiai, hematológiai vizsgálatok

- **CRP / ESR**
- **Vérkép**
- **Vizelet**

Aktív SLE-ben 3 - 6 havonta

NEONATÁLIS LUPUS (NLE):

- **ANA, anti-SSA (Ro-52, Ro-60), anti-SS-B, anti-U1sn-RNP**

GYÓGYSZER INDUKÁLT LUPUS (DLE):

- **anti-Histon antitest – DLE diagnosztikai markere**

(de sok szisztémás autoimmun betegségben előfordul (SLE, DLE, RA, JIA, SSc)

Laboratóriumi vizsgálatok Sjögren szindrómában (SjS)

Immunológiai vizsgálatok

- **ANA**
- **ENA antitestek: anti-SSA, anti-SSB, anti-Sm, anti-RNP**
- **RF**

További kiegészítő vizsgálatok:

- **Pajzsmirigy antitestek (anti-TPO, anti-TG)**
- **Szervpescifikus antitestek (anti-PCA, AMA, anti-SMA)**
- **Komplement (C3, C4, CH50), Kryoglobulin** *(vasculitis miatt)*
- **Szérum immunglobulin szintek (Ig G, IgA, IgM) / immunfixáció** (monoklonális gammopátia miatt)

Kémiai, hematológiai vizsgálatok:

- **TSH**
- **Szérum elektroforézis** *(monoklonális gammopátia miatt)*
- **Vérkép** *(esetleges leukopénia miatt)*

2010 ACR/EULAR RA Klasszifikációs kritérium

Joint involvement (0-5)	Score
1 large joint	0
2-10 large joints	1
1-3 small joints	2
4-10 small joints	3
> 10 joints	5
Serology (0-3)	
Negative RF AND negative ACPA	0
Low positive RF OR low positive ACPA	2
High positive RF OR high positive ACPA	3
Acute-phase reactants (0-1)	
Normal CRP and normal ESR	0
Abnormal CRP OR abnormal ESR	1
Duration of symptoms (0-1)	
< 6 weeks	0
≥ 6 weeks	1

Patients with **≥ 6 points** are classified as **RA (3/6)**

RF/ACPA:

Negative ≤ ULN (upper limit of normal)
Low positive: 1 – 3 x ULN
High positive: ≥ 3x ULN

Classification of symptoms as RA <u>in EARLY PHASE</u> of the disease

Laboratóriumi vizsgálatok RA-ban:

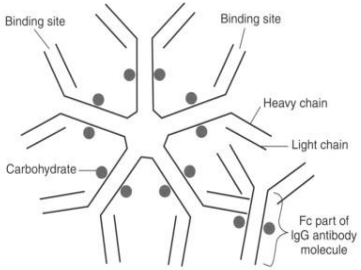
- **Gyulladásos paraméterek: CRP, We** (diagnózis, betegség aktivitás – monitorozás)
- **Autoantitestek:**
  - RF (IgM izotípus)
  - ACPA (IgG)

  !!! RF és ACPA meghatározás szinoviális folyadékból is (korai RA-ban)

  !!! Szeronegatív RA (RF, ACPA negatív)
- ***Differenciál diagnosztikai vizsgálatok (különösen a korai stádiumban)***

Rheumatoid Faktor (RF):

- IgG immunglobulin Fc része ellen termelt autoantitest (*elsősorban **IgM**, de lehet IgG és IgA, ritkábban IgE és IgD is*)
- Rutin diagnosztikában elsősorban RF IgM meghatározását végezzük
- **RA**-s betegek 70-90 %-ban pozitív, de **korai stádiumban gyakran negatív**!
- Szintje nem korrelál a betegség aktivitásával, de a magas titer agresszívebb betegségre utal
- RF igen gyakori **esszenciális kevert kriglobulinémiában** (II. típusban 100 %)
- Pozitív lehet sok más autoimmun betegségben, infekciót követően, de akár egészségesekben is - **alacsonyabb specificitás**
- **RF IgM, IgA és IgG** együttes előfordulása:
  - ✓ RA-s betegek 52%-ban
  - ✓ Egyéb kötőszöveti betegségekben: <5%
- **RF IgM és IgA együtt**: **magasabb diagnosztikai specificitás**



RF előfordulása különböző betegségekben (%-ban)

Előfordulás	%
Arthritis	
RA	**70-90**
JIA	5
PsA	<15
Reaktív arthritis	<5
Egyéb kötőszöveti betegségek	
Sjögren szindróma	**75-95**
MCTD	50-60
SLE	15-35
Szisztémás sclerosis	20-30
DM/PM	20
Szisztémás vasculitis	5-20

Előfordulás	%
Fertőző betegségek	
Endocarditis	25-50
TBC	15
Vírus infekciók	10-20
HCV	40-76
Egyéb betegségek	
Krioglobulinémia	**40-100**
Májcirrhosis	25
PBC	45-70
Sarcoidosis	5-30
Tumorok	5-25
Egészségesek (50 éves)	<5
Egészségesek (70 éves)	10-25

Ingegnoli F, Castelli R, Gualtierotti R. Dis Markers. 2013;35(6):727-34.

ACPA:

- **ACPA, gyűjtőnév:** anti-CCP, -citrullinált vimentin (Sa, Savoie és MCV), -citrullinált fillagrin antitestek („citrullinome”, 53); izotípusok: IgG, IgA, IgM, IgE
- Szoros asszociáció: genetikai (HLA-DRB1 shared epitop, PTPN22) és környezeti tényezők (dohányzás)
- Az RA korai stádiumában gyakran pozitív, **diagnosztikai specificitása meghaladja az RF-ét** (RA-s betegek 70 %-ban pozitív, **RF szeronegatív betegek 20 – 30 %-ban pozitív**
- **Erozív arthritis prognosztikai markere**
- A betegség kezdete előtt akár több ével is kimutatható
- ACPA izotípus repertoár a betegség progressziójával nem változik, de több izotípus rosszabb prognózisra utal (1,4x odds ratio izotípusonként)
- Korai RA-ban a szerokonverzió aránya alacsony (ismételt tesztelés jelentősége?)

ACPA előfordulása különböző betegségekben (%-ban)

Előfordulás	%	Előfordulás	%
Arthritis psoriatica	9	Juvenilis idiopathias arthritis	8
SLE	8	Polymyalgia rheumatica	0
Sjögren szindróma	6	Vasculitis	5
Spondylarthropathia	2	**Tuberculosis**	**34**
Scleroderma/CREST	7	Polymyositis/Dermatomyositis	0
Hepatitis C/Cryoglobulinemia	4	Fybromyalgia	3
Hepatitis B	1	Köszvény, álkoszvény	0
Osteoarthritis	2		

Magasabb specificitás

Kiegészítő laboratóriumi vizsgálatok RA-ban:

- **További gyulladásos paraméterek:** fibrinogén, α_2,γ-globulinok (emelkedett lehet), szérum calprotectin
- **Teljes vérkép:** thrombocytosis, normokróm, normociter vagy mikrociter anémia
- Komplement (C3, C4): normál vagy enyhén emelkedett
- Genetikai vizsgálatok:

  HLA-DRB1

  HLA-B27 (differenciál diagnózis: SPA, PsA, Reaktív arthritis, IBD asszociált arthritis)

RA Differenciál diagnózis:

- **További autoantitestek** vizsgálata, egyéb kötőszöveti betegség kizárása:

  ANA: pozitivitás esetén differenciál diagnózis (mintázat segíthet):

  anti-SSA, anti-SSB antitest (Sjögren szindróma)

  anti-Sm, anti-dsDNS antitest (SLE)

  anti-centromer, anti-Scl-70 (Szisztémás sclerosis)

  Antifoszfolipid antitestek: anti-CL , anti-Beta2 GPI antitest IgG/IgM, LA (APS)

- **Szinoviális folyadék vizsgálata:**

  sejtszám, tenyésztés, kristály vizsgálatok (MSU, CPPD)

- **Vírus szerológiai vizsgálatok:**

  Borrelia, Chlamydia HCV, HBV, Parvovirus B19, (bakteriális, vírusindukált arthritis)

- **Kémiai vizsgálatok:**

  máj-, vesefunkció, szérum húgysav (komorbiditások, köszvény)

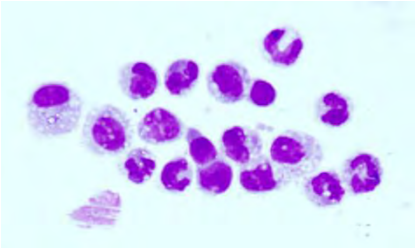
- Vizelet vizsgálatok:

  mikroszkópos hematuria, proteinuria előfordul kötőszöveti betegségekben

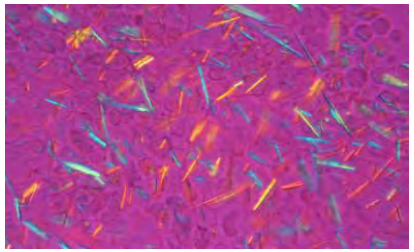
Szinoviális folyadék (SF) vizsgálatok

Paraméter	Normál	Nem gyulladásos	Gyulladásos	Szeptikus	Hemorrhagiás
Térfogat (mL)	< 3.5	> 3.5	>3.5	> 3.5	> 3.5
Szín					
Tisztaság	átlátszó	átlátszó	átlátszó/ opálos	opálos	véres
Tenyésztés	negatív	negatív	negatív	pozitív	negatív
WBC (µL SF)	< 200	200-2000	2000-10^4	> 10^5	200-2000
PMN %	< 10	< 25	≥ 50	≥ 75 (90)	50 - 75

Normál SF sejtösszetétele: Ly 24 %, Mo 48 %, PMN 7 %



SF: Festett kenet Gr./Mf./Ly Pol. Mikr.



MSU kristály képe (kompenzált polarizációs mikroszkóp, negatív kettős törés)

Laboratóriumi vizsgálatok szisztémás Sclerosisban (SSc)

ANA-IFA

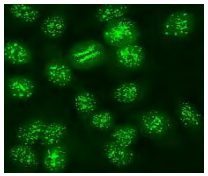
↓

Pozitív (mintázat függvényében) – Konfirmálás: ENA-ELISA / Line/Dot Blot

Centromer

CENP

+

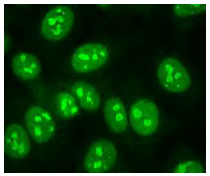


Scleroderma limitált forma (Crest sy.)

Nucleoláris

RNS Polim I.
Fibrillarin PM/Scl
Th/To

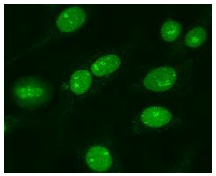
+



Scleroderma vagy PM Scleroderma overlap sy

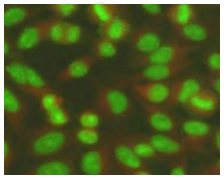
RNS Polim. III

+



Scl-70

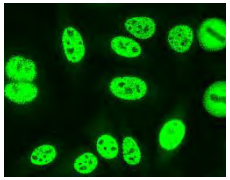
+



Sleroderma főként diffúz forma

U1-RNP

+



Sleroderma izületi, izom manif. vagy MCTD

Kiegészítő laboratóriumi vizsgálatok SSc-ben

Differenciál diagnózis, prognózis, szervi érintettség :

- Komplement (C3, C4)
- Kryoglobulin
- RF, AMA-M2 (CREST szindróma 25%-ban)
- ANA, anti-ENA antitest (SSA,SSB)
- Gyulladásos markerek (CRP, ESR)
- Teljes vérkép
- Izom- és májenzimek (CK, Aldoláz, GPT, GOT)
- Vizelet- és vesefunkciós vizsgálatok (szérum kreatinin, karbamid)
- Fehérje elektroforézis
- Pajzsmirigy funkció vizsgálat (TSH, fT3, fT4)

Laboratóriumi vizsgálatok Myositisben

ANA - IFA

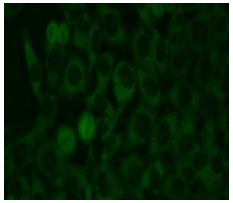
CK, Aldoláz, GPT, GOT, LDH

Finom / diffúz szemcsés **citoplazma** pozitivitás

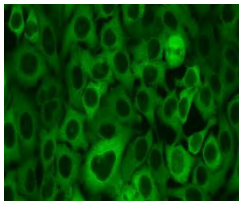
CITOPLAZMA negatív

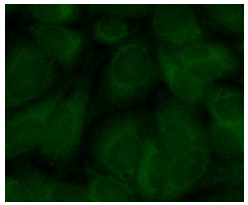
Granulált **nucleáris** / homogén **nucleoláris** pozitivitás

SRP

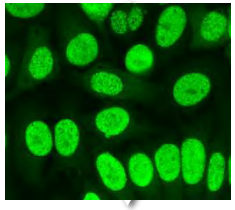


PL-7 PL-12 Jo-1

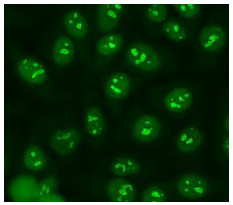




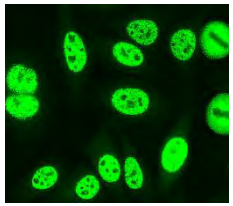
Mi-2



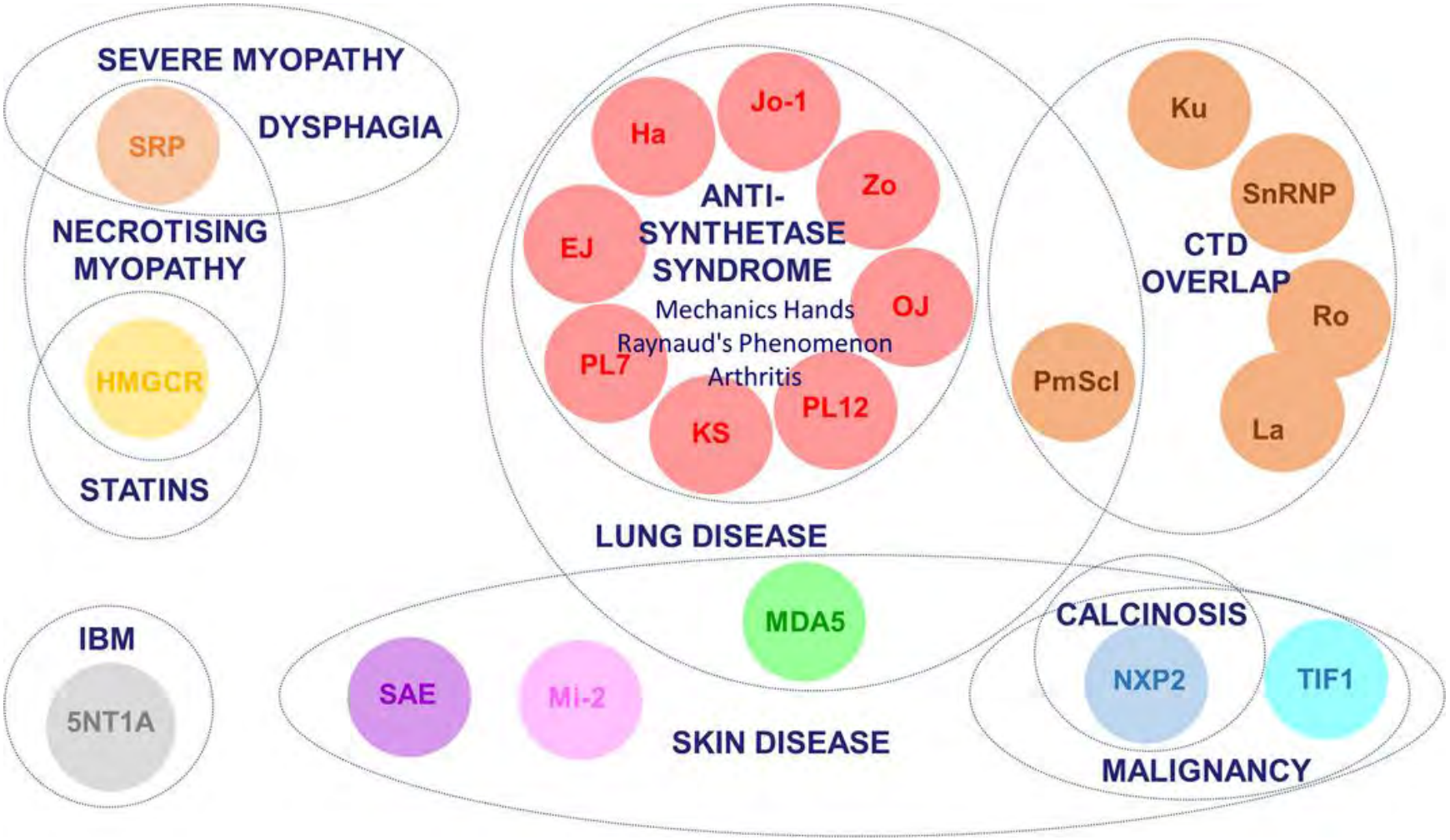
PM/Scl Ku



U1-RNP



Myositis antitestek klinikai asszociációja



Z Betteridge, N Mc Hugh. 2015, DOI: 10.1111/joim.12451

Laboratóriumi vizsgálatok MCTD-ben

Autoantitest vizsgálatok:

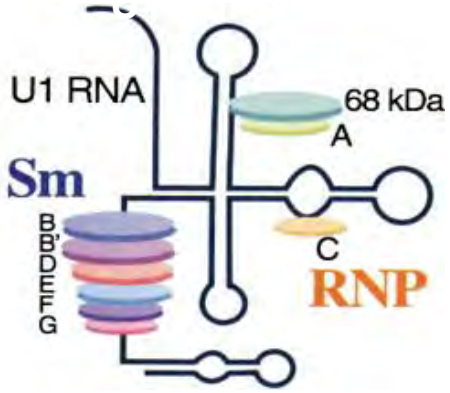
- **ANA:** durva szemcsés mintázat**,** általában magas titer
- **ENA - U1-snRNP** (Sm-RNP komplex része (target antigének: **68 kDa**, **A**, C) **diagnosztikai marker** (100% specificitás), hiánya kizárja az MCTD-t

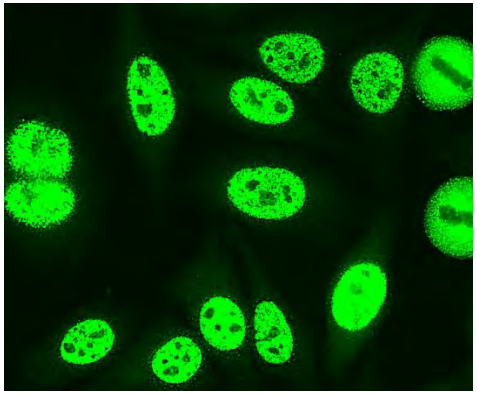
  További előfordulás:

  - SLE-ben (13-32 %) pozitivitása bőr és nyálkahártya léziókkal,
  - SSc-ben (10 %) jelenléte tüdőfibrózissal függ össze

Kémiai, hematológia vizsgálatok:

- Vérkép
- Vizelet
- CRP



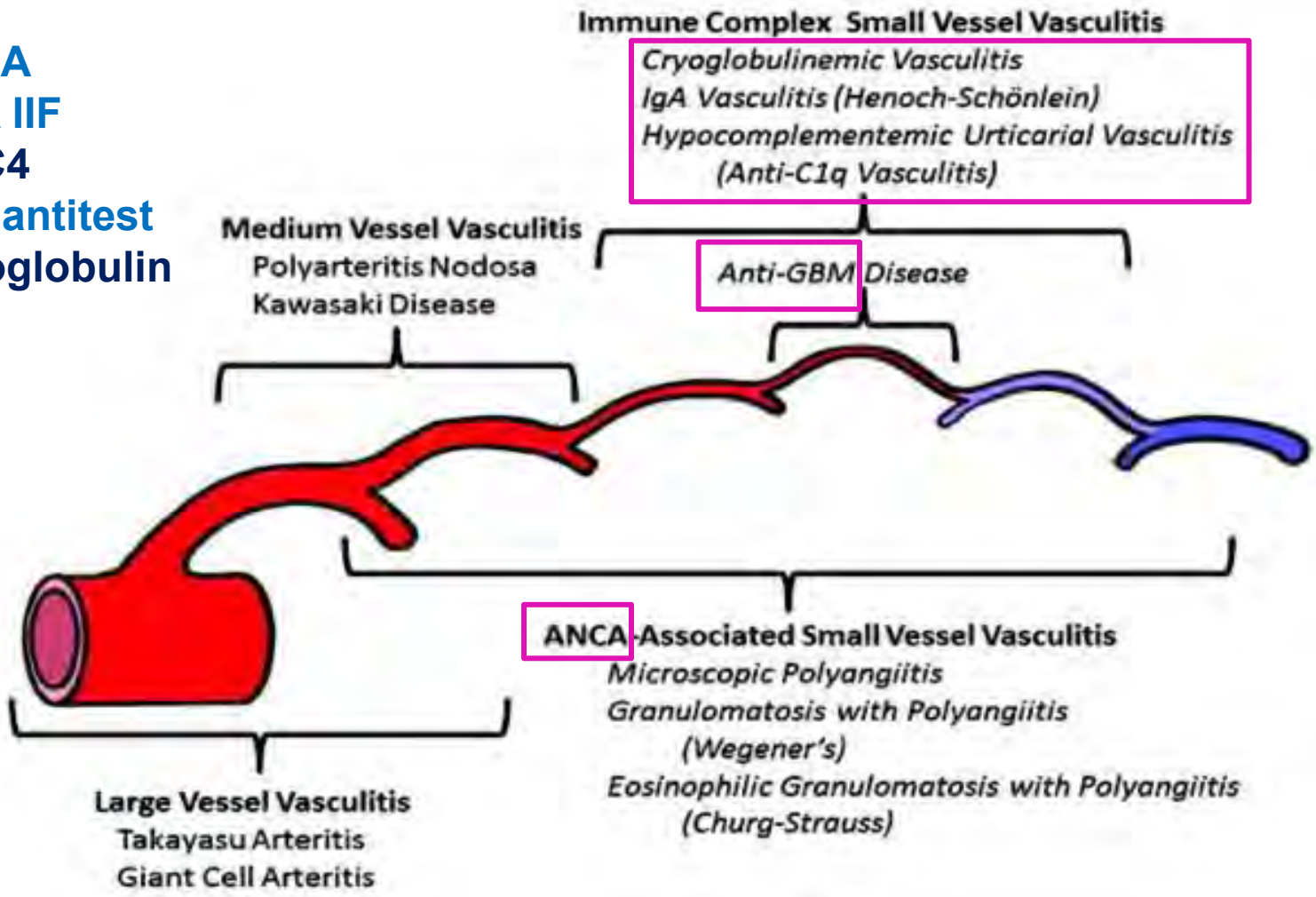


Anti-U1-snRNP IIF képe

Laboratóriumi vizsgálatok szisztémás vasculitisekben

Vasculitisek osztályozása – Chapel Hill-i Konszensus alapján - 2012

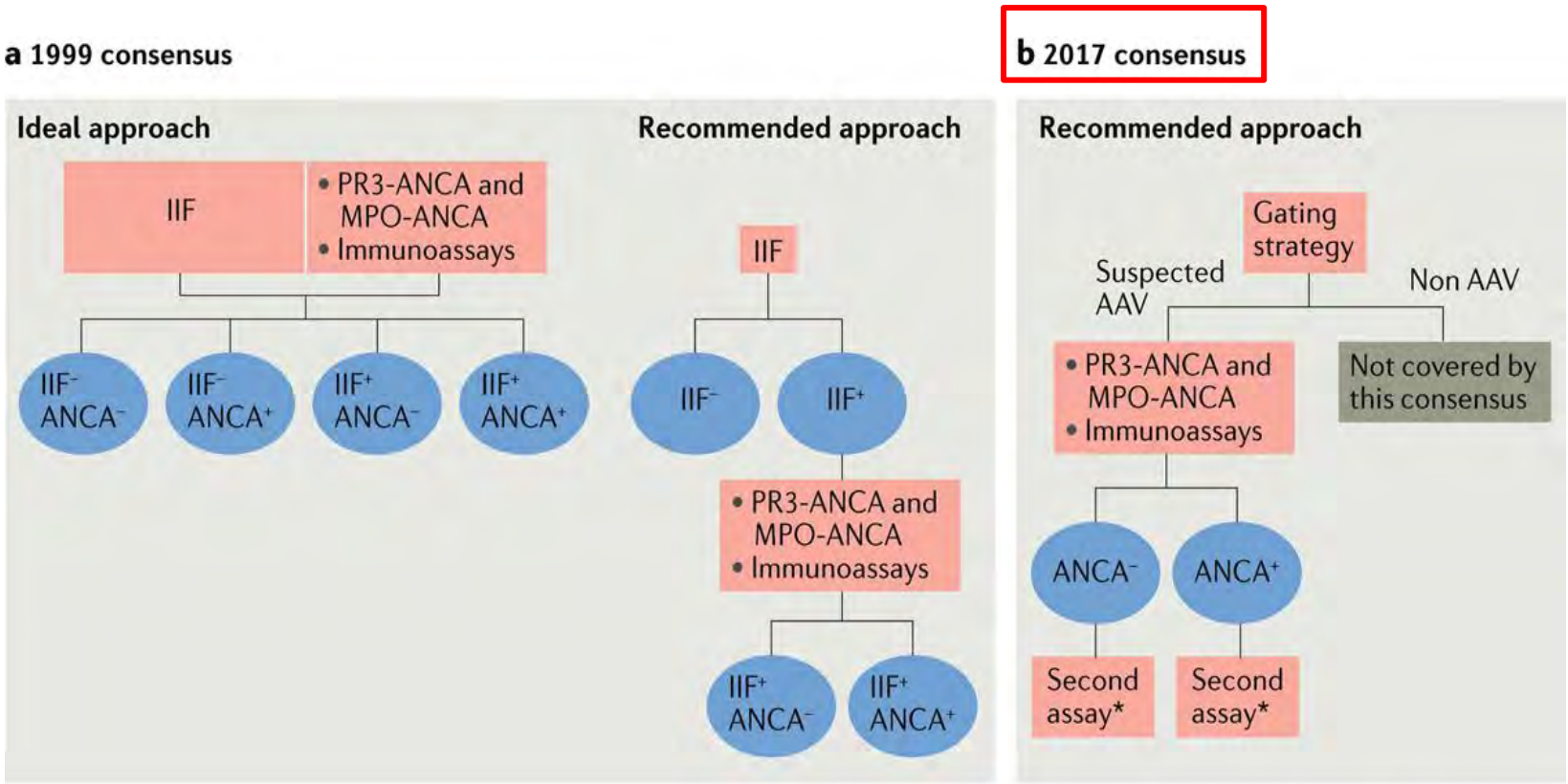
- ANCA
- ANA IIF
- C3/C4
- C1q antitest
- Kryoglobulin
- RF
- CRP
- We



J.C. Jennette. Clin Exp Neprhrol 2013; Oct 17(5):603-606

ANCA antitestek vizsgálati algoritmusa AAV-ben

(régi és új ajánlás)



Nature Reviews | Rheumatology

Xavier Bossuyt et al. Nature Review Rheumatol (2017) doi:10.1038/nrrheum.2017.140

ANCA vizsgálata AAV-ben - az új ajánlás fontos elemei

- **A vizsgálat igénylése célzottan (a klinikai tünetek alapján, 1999-es ajánlásnak megfelelően) -** fölösleges vizsgálatkérések elkerülése
- **ANCA szűrése magas teljesítményű** (magas szenzitivitás/specificitás) **antigén specifikus immunoassay-el (MPO/PR3)**
- **Erős klinikai gyanú esetén az MPO/PR3 negativitás ellenőrzése javasolt másik teszttel (módszerrel)**
- **ANCA (MPO/PR3) antitest hiánya nem zárja ki az AAV diagnózisát**
- **ANCA antitest jelenléte megerősíti az AAV diagnózisát, de nem diagnosztikai kritérium**

Xavier Bossuyt et al. Nature Review Rheumatol (2017) doi:10.1038/nrrheum.2017.140

Laboratóriumi vizsgálatok Antifoszfolipid szindrómában (APS)

Klasszifikációs kritérium *(Miyakis S., J. Thromb Haemost 2006; 4: 295-306)*

1. **Klinikai kritériumok:**
   - Artériás / vénás thrombózis
   - Habituális vetélés
2. **Laboratóriumi kritériumok:**
   - Lupus Anticoaguláns (LA) (*meghatározás az ISTH ajánlása szerint, 2009*)

     pozitivitás 2 vagy több alkalommal - 12 hét különbséggel
   - Anti-CL antitest (IgG/IgM)

     mérsékelt / magas titer (> 40 GPL vagy MPL , vagy > az egészséges populációban mért érték 99 percentilise)

     pozitivitás 2 vagy több alkalommal - 12 hét különbséggel
   - Anti-beta-2GPI antitest (IgG/IgM)

     > az egészséges populációban mért érték 99 percentilise

     pozitivitás 2 vagy több alkalommal - 12 hét különbséggel

APS diagnózis: 1 klinikai és 1 laboratóriumi kritérium teljesülése alapján

2023 ACR/EULAR Klasszifikációs kritérium

Entry Criteria[a]
At least one documented[b] clinical criterion listed below (domains 1-6)
plus
A positive antiphospholipid antibody (aPL) test
(a lupus anticoagulant test, or moderate-to-high titers of anticardiolipin or anti-β_2-glycoprotein-I antibodies [IgG or IgM])
within three years[b] of the clinical criterion

If absent, do not attempt to classify as APS - If present, apply additive criteria

Additive clinical and laboratory criteria[a]
Do not count a clinical criterion if there is an equally or more likely explanation than APS.
Within each domain, only count the highest weighted criterion towards the total score.

Clinical domains and criteria	Weight
D1. Macrovascular (Venous Thromboembolism [VTE])	
VTE with a high-risk VTE profile[c]	1
VTE without a high-risk VTE profile[c]	3
D2. Macrovascular (Arterial Thrombosis [AT])	
AT with a high-risk CVD profile[c]	2
AT without a high-risk CVD profile[c]	4
D3. Microvascular	
Suspected (one or more of the following)	2
Livedo racemosa (exam)	
Livedoid vasculopathy lesions (exam)	
Acute/chronic aPL-nephropathy (exam or lab)	
Pulmonary hemorrhage (symptoms and imaging)	
Established (one of more of the following)	5
Livedoid vasculopathy (pathology[d])	
Acute/chronic aPL-nephropathy (pathology[d])	
Pulmonary hemorrhage (BAL or pathology[d])	
Myocardial disease (imaging or pathology)	
Adrenal hemorrhage (imaging or pathology)	
D4. Obstetric	
≥3 Consecutive pre-fetal (<10w) and/or early fetal (10w 0d -15w 6d) deaths	1
Fetal death (16w 0d – 33w 6d) in the absence of pre-eclampsia (PEC) with severe features or placental insufficiency (PI) with severe features	1
PEC with severe features (<34w 0d) or PI with severe features (<34w 0d) with/without fetal death	3
PEC with severe features (<34w 0d) and PI with severe features (<34w 0d) with/without fetal death	4
D5. Cardiac Valve	
Thickening	2
Vegetation	4
D6. Hematology	
Thrombocytopenia (lowest 20-130x10^9/L)	2

Laboratory (aPL) domains and criteria[e]	Weight
D7. aPL test by coagulation-based functional assay (lupus anticoagulant test [LAC])	
Positive LAC (single – one time)	1
Positive LAC (persistent)	5
D8. aPL test by solid phase assay (anti-cardiolipin antibody [aCL] ELISA and/or anti-β_2-glycoprotein-I antibody [aβ_2GPI] ELISA [persistent])	
Moderate or high positive (IgM) (aCL and/or aβ_2GPI)	1
Moderate positive (IgG) (aCL and/or aβ_2GPI)	4
High positive (IgG) (aCL or aβ_2GPI)	5
High positive (IgG) (aCL and aβ_2GPI)	7

TOTAL SCORE
Classify as Antiphospholipid Syndrome for research purposes if there are
at least 3 points from clinical domains AND at least 3 points from laboratory domains

Medha Barbhaiya et al. Ann Rheum Dis 2023;82:1258-1270

Anti-foszfolipid antitestek (aPL) vizsgálata ajánlott:

a. **primer** és **szekunder antifoszfolipid szindrómában** (APS, **diagnosztikai marker)**

b. **APS**-ben a **kezelés hatékonyságának** megítélésében

c. **SLE** gyanúja esetén **(diagnosztikai kritérium)**

   anti-C*L és anti-Béta-2-GPI **IgA** antitest is diagnosztikus értékű **(SLICC kritérium)***

a. SLE és más szisztémás autoimmun kórképekben a thrombózis és spontán vetélés rizikójának megítélése

d. ismeretlen eredetű thrombocytopeniában

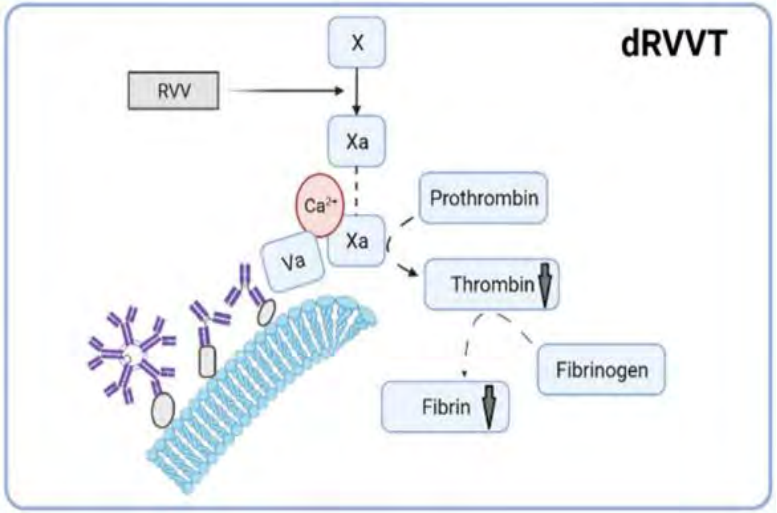
FONTOS: Anti-PL antitest vizsgálatok interpretációja az ajánlásnak megfelelően!

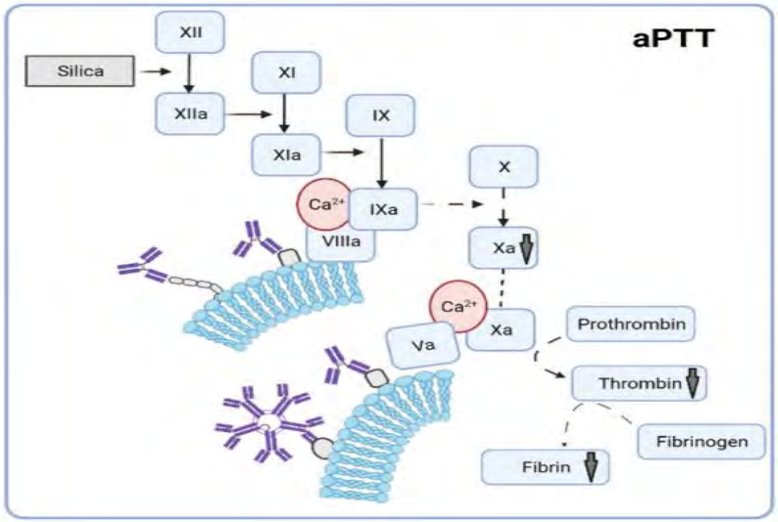
Nagyobb a kockázat

- **Egyszeres / kétszeres / háromszoros antitest pozitivitás**
- **IgM vagy IgG izotípusú antitest**
- **Alacsony / magas antitest titer**

Lupus Anticoaguláns és az LA paradoxon:

- **Elnevezés félrevezető:**
  - **előfordulás nem csak SLE-ben**
  - ***„in vivo”* thrombosist okoznak**
- **Heterogén immunglobulinok**
- **Alvadási kaszkád inhibitoraiként viselkednek *„in vitro”*– megnyúlt aPTI, PT**
- **Kimutatás funkcionális teszttel: RVVT, Silica „clotting time”**





Vandevelde A, Devreese KMJ. J Clin Med. 2022 Apr 13;11(8):2164.

aPL meghatározását befolyásoló tényezők (interferencia)

	LA	anti-CL/anti-β2GPI antitest	Javaslat
Pozitív RF IgM	NEM	álpozitív anti-CL /anti-β2GPI at. IgM	Interpretáció, kontroll másik teszttel
Emelkedett FVIII aktivitás *(terhesség, gyulladás, daganatos megbetegedések)*	álnegatív	átmeneti pozitivitás *infekciók, gyulladás*	Kontroll (terhesség után/12 hét)
Emelkedett CRP	álpozitív	NEM	Kontroll (12)
Bizonyos gyógyszerek *(antibiotikumok, chlorpromazine, vakcinák)*	álnegatív	NEM	Kontroll
Antikoaguláns terápia ▪ **K-vitamin antagonisták** ▪ **DOAC** Thrombin gátló: *dabigatran* Fxa gátló: *apixaban, edoxaban, rivaroxaban*	álpozitív	NEM	LMWH, mintavétel, mérés ▪ 3 hét múlva ▪ min. 2 nap (48 h) múlva *Jövő:* ▪ *Thrombin generációs assay (TGA)?* ▪ *Anti PS/PT antitest?*
Heparin (UFH, LMWH) terápiás koncentrációban!!!	NEM	NEM	Heparin neutralizáló reagens használata, aXa szint meghatározás

LA vizsgálat előfeltétele: tájékoztatás az antikoaguláns terápia kezelésről !!!

Interferon-gamma release assay - IGRA

- **Vírus / Baktérium antigénekre specifikus memória T-sejtek hosszútávú jelenléte**
  centrális és effektor memória T-sejtek

Antigén expozíció: memória T-sejtek aktivációja - IFN-gamma termelés

  - ELISA
  - ELISPOT

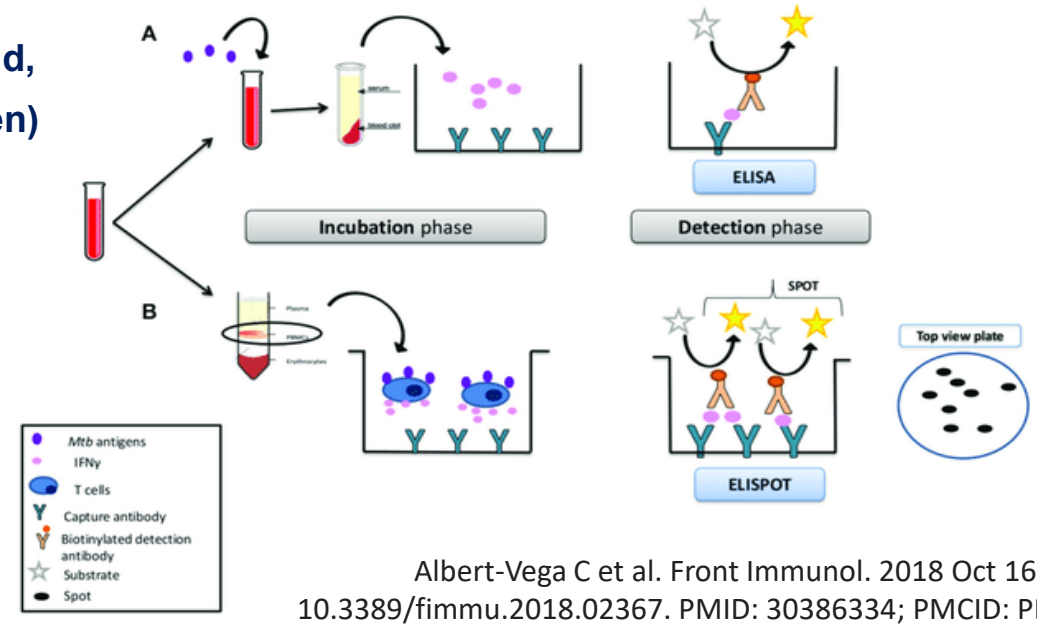
- **Rutin diagnosztikában elérhető vizsgálatok mindkét módszerrel:**
  - *Mycobacterium tuberculosis (látens TB szűrése, reaktiváció rizikó immunszuppresszív terápia során)*
  - CMV (vírus reaktiváció prognózisa szerv transzplantációban)
  - SARS-CoV-2

- **IGRA-t befolyásoló tényezők:**
  - Életkor (idősek-alacsony mitogén válasz, magasabb háttér; gyerekek < 2 év alacsony mitogén válasz éretlen immunrendszer miatt)
  - Terhesség (alacsony mitogén válasz - gyakran csak átmeneti)
  - Fertőzések (HIV, CD4+ T-sejt szám < 200 / µL)
  - Immunszuppresszív terápia

IGRA – ELISA, ELISPOT

Quantiferon TB Gold,
SARS-CoV-2 (Qiagen)

T-SPOT.TB
T-SPOT CMV
T-SPOT.COVID
(Oxford Immunotec)



Albert-Vega C et al. Front Immunol. 2018 Oct 16;9:2367. doi: 10.3389/fimmu.2018.02367. PMID: 30386334; PMCID: PMC6198655.

ELISPOT előnye:

- **Magas szenzitivitás:** a szekretált analit a szekertáló sejt közelében „csapdába esik” (antigén-specifikus T-sejtekre alacsony szám jellemző (1/100 000 – 1 000 000)
- **Szekretált bioaktív molekulák mérésének lehetősége egyedi sejtek szintjén**
- **A többi módszerhez képest kevésbé szenzitív az immunszuppresszív terápiára**

Allergia vizsgálatok

1. Az IgE (össz-IgE, totál-IgE) mennyiségi meghatározása:

Indikációja:

- **Allergiás bronchopulmonáris aspergillosisban**: extrém magas IgE szint diagnosztikai kritérium)
- **Jób szindróma** (hyper IgE szindróma) gyanúja esetén a magas IgE szint diagnosztikai jelentőségű
- **IgE-myelomában** mennyisége szintén nagyon magas , de előfordulása ritka.
- **Gyermekkorban az atópiás betegségek diagnózisában** fontos lehet: a korban egyeztetett normál értéknél jelentősen magasabb IgE szint az **atopiás hajlamra** utalhat (idővel igazi atopiás betegség léphet fel). *De emelkedett szintje utalhat bélférgességre is!*
- **Felnőttkori atópiás betegek esetében** a diagnosztikai értéke **kérdéses** (szintje a betegek 50 %-ban normál értékű). A monoszenzibilizált egyének között a normál IgE szint gyakoribb a poliszenzibillizált egyénekhez képest.
- IgE szint monitorozás **Omalizumab terápia** hatékonyságának megítélése céljából (különbség a tesztek teljesítménye között - az IgE-anti-IgE zavarja a mérést!)
- Az össz-IgE szint **emelkedése** tapasztalható HIV-fertőzésben, bélférgességben, candidiasisban és bizonyos daganatokban is.

- Az IgE **szintjét** egyedi jellemzők és környezeti tényezők is befolyásolják. Normál értéke az életkorral változik (**korfüggő**), és **földrajzi területenként** is eltérő lehet.
- Mivel szérum koncentrációja a többi immunglobulinhoz képest alacsony (ng/ml), meghatározása elsősorban immunoassay-el (ELISA) történik, nemzetközi standardhoz (WHO) kalibrálva: IU/ml vagy kU/l vagy ng/ml
- (1 IU/ml = 1 kU / l = 2,4 ng/ml)

2. Allergén specifikus IgE (sIgE) meghatározása:

A teszt az **allergén azonosítására**, és nem az allergiás betegség megállapítására szolgál - gyakran diagnosztikai tesztként értelmezik, DE **valójában az allergénnel való szenzibilizációt jelzi.**

Az eredmények értékelése az anamnézis és a klinikai tünetekkel együtt ajánlott!

A sIgE meghatározása **elsősorban olyan esetekben ajánlott, ha az „in vivo" vizsgálatok nem értékelhetőek**, vagy különböző okok miatt **nem végezhetőek** (magas kockázat - anafilaxiás reakció, gyógyszeres kezelés, pl. antihisztamin, szteroid, bőrbetegség, pl. krónikus urticaria).

Rovarméreg specifikus IgE kimutatása - módszerek

Jelenleg elérhető módszerek:

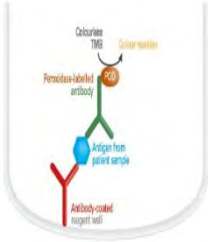
- ELISA
- ImmunoCAP (FEIA)
- Line immunesszé (LIA)

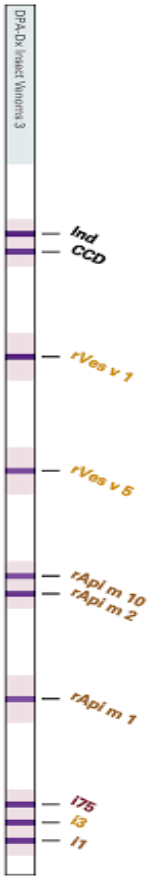
Allergén:

- Allergén kivonat, tisztított, rekombináns
- Teljes allergén, allergén mixek, egyedi komponensek

Értékelés:

- Szemikvantitatív - RAST egység
- Kvantitatív: kU/l vagy ng/ml

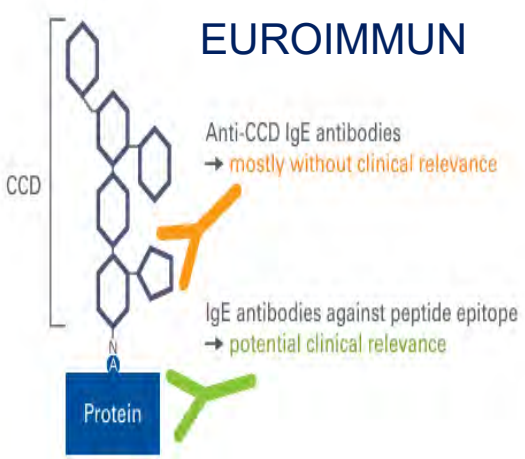




ELTÉRŐ szenzitivitás és specificitás – MÓDSZER megnevezése!

A specifikus IgE meghatározását befolyásoló tényezők

- **Alacsony IgE koncentráció (ng/ml)**
- **Az allergén epitópok sokfélesége**
- **Az allergén mennyiségének változása / stabilitása**
- **Az epitóp konformációjának megváltozása az előállítás során**
- **Keresztreakciók a különböző komponensek között - diagnosztikai nehézségek**



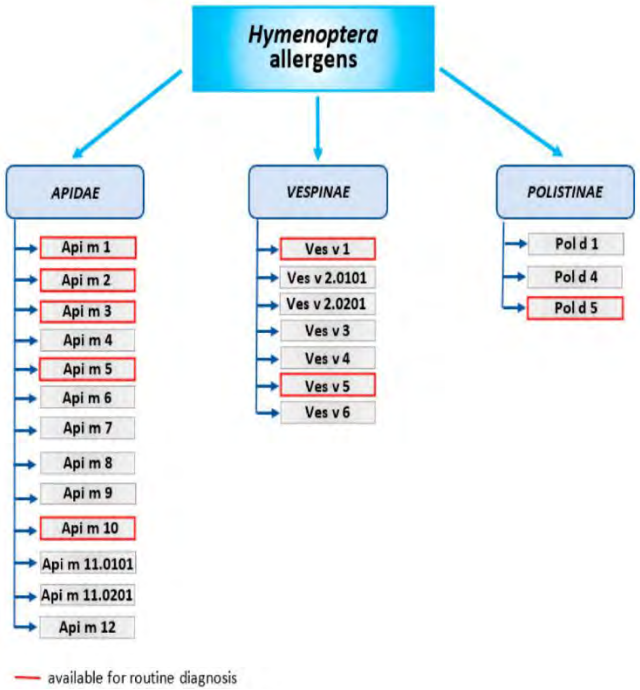
Kettős szenzibilizáció

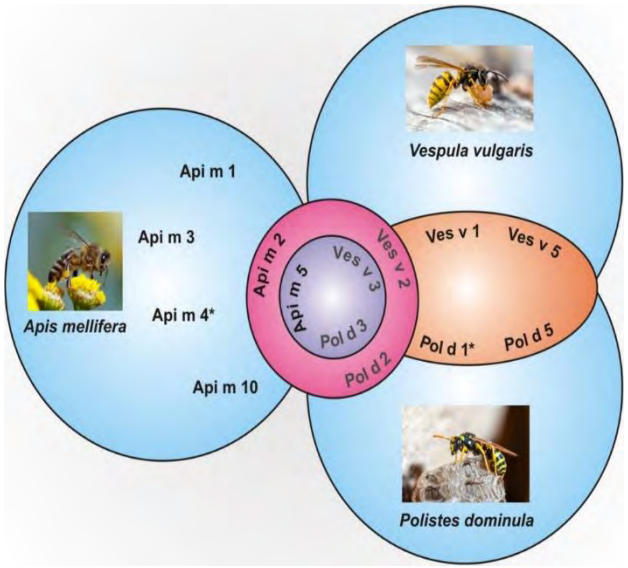
1. Szénhidrát determinánsok (CCD) miatt - dupla szenzibilizáció, de klinikailag irreleváns (álpozitivitás)
2. Homológ peptid szekvenciák jelenléte miatt - dupla szenzibilizáció (elsődleges szenzibilizáló)
3. Valós kettős szenzibilizáció

Marker és keresztreagáló allergének

A komponensekre bontott diagnosztika (CRD) néhány gyakorlati haszna

- **Releváns allergének azonosítása -** high risk / low risk allergének megkülönböztetése, hasznos tanácsok a beteg számára
- **Keresztreagáló allergének kiszűrése -** elkerülhető a fölösleges terápia / diéta
- **Allergén specifikus immunterápia (SIT) tervezése**





Matysiak et al. Biomedicines 2022, 10, 2170. Biomedicines. 2023 Aug 8;11(8):2224. doi: 10.3390/biomedicines11082224.

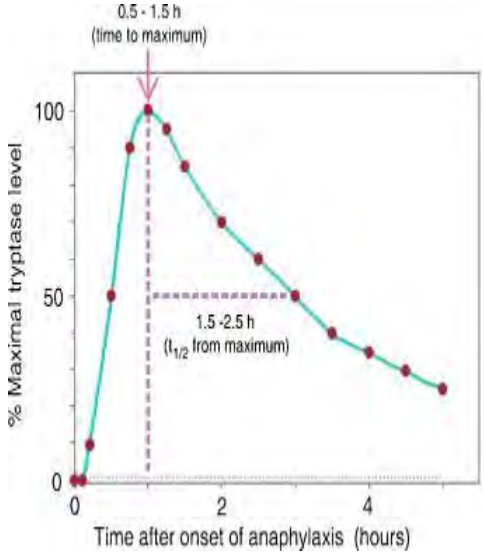
*Blank S et al. Allergo J Int **30**, 26–38 (2021). https://doi.org/10.1007/s40629-020-00151-5*

3. Szérum triptáz szint meghatározása

- **Hízósejtek által termelt és szekretoros granulumaiban tárolt szerin proteáz** (bazofil sejtek szintén termelik, 500x kisebb mennyiségben)
- Nagyon stabil (szobahőmérsékleten napokig)
- **Egészségesekben szintje 5 – 15 ng/ml (cut-off: 10 ng/ml)**
- **Emelkedés jellemző:**
  a. Súlyos anafilaxiás reakciókban
  b. Masztocitózisban
  c. Mieloid betegségekben
- **Mérése ajánlott:**
  a. Anafilaxiás reakciókban (gyógyszerek, rovarméreg, élelmiszerek, latex, radiokontraszt anyagok)
  b. Immunterápiában a súlyos reakciók rizikójának megítélése céljából
  c. Masztocitózisban
  d. Mieloid betegségekben (AML, CML, MDS, CMML)
- **Meghatározás:**
  1. Az allergiás reakciót követő **30 perc - 2 (3) óra**
  2. **24 (48) óra múlva**

Átmeneti emelkedés ≥ alap szint 20% -a + 2 µg/L - hízósejt aktiváció

Módszer: FEIA, UniCap-Phadia



https://doi.org/10.1016/j.resuscitation.2008.02.001

4. Bazofil aktivációs teszt (BAT)

- A bazofil sejtek aktivációját méri az allergénnel való stimulációt követően (funkcionális teszt)
- Elvégzése az életet veszélyetető reakciók esetén és magas rizikójú betegeknél a bőrtesztet megelőzően ajánlott
- **Aktivációs markerek:**
  - CD203c: nyugvó állapotban is expresszált alacsony koncentrációban
  - CD63: csak aktivációt követően jelenik meg a bazofil sejtek felszínén

Allergénenként el

- sIgE koncentrácio

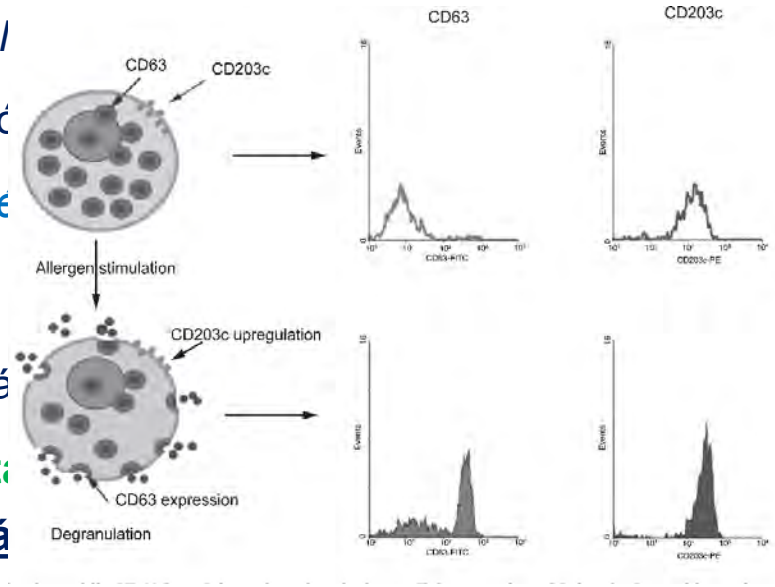
Ajánlás: tünetek e *(> 3 ÉV NEM ajánlott)*

- A populáció 5-10 ékelhető)

Meghatározás: á

Szükséges minta **tolt vér**

(a minta NEM tá



DG Ebo et al. Allergy 2006; 61:1028-1039

Köszönöm a figyelmet!