

Immunológiai módszerek a klinikai kutatásban

10. előadás

Az autoimmun betegségek
diagnosztikája

Természetes és patológiás autoantitestek összehasonlítása

Jellemző	Természetes AAT	Patológiás AAT
Izotípus	Legtöbbször IgM	IgG, IgA vagy IgM
Koncentráció	pg/ml	ng/ml, mg/ml
Affinitás	Alacsony	Nagyobb
Reaktivitás	Polireaktív	Monoreaktív
Termelő sejt	B1-sejt	Konvencionális B sejt
T-sejt függés	T-independens	T-dependens

> 80 ismert autoimmun betegség

- Az autoimmun betegségek gyakorisága a rheumatoid arthritis és az autoimmun thyroiditis kivételével alacsony, de együttesen a nyugati populáció kb 5%-át érinti.
- Szisztémás és szervspecifikus kórképek tartoznak ide.
- A szisztémás kötőszöveti autoimmun betegségek a mozgásszervek érintettsége miatt jelentős munkaerőkiesést okoznak
- A tünettana a legtöbb szisztémás autoimmun betegségnek színes, azért a diagnózis felállítása nem egyszerű, speciális algoritmus alapján történik, melynek része a **laboratóriumi diagnosztika** is.

A szisztémás autoimmun kórképek (kötőszöveti betegségek) jellemzői

- Női dominancia
- Jellemző klinikai kép és betegség lefolyás, progresszió
- Több szerv érintettsége, gyulladásos tünetek
- Immunológiai abnormalitások (jellemző autoantitestek)
- Genetikai / környezeti faktorok fontosak a létrejöttében
- Corticosteroid és immunosuppresszív kezelés többnyire hatékony

Általános laboratóriumi eltérések

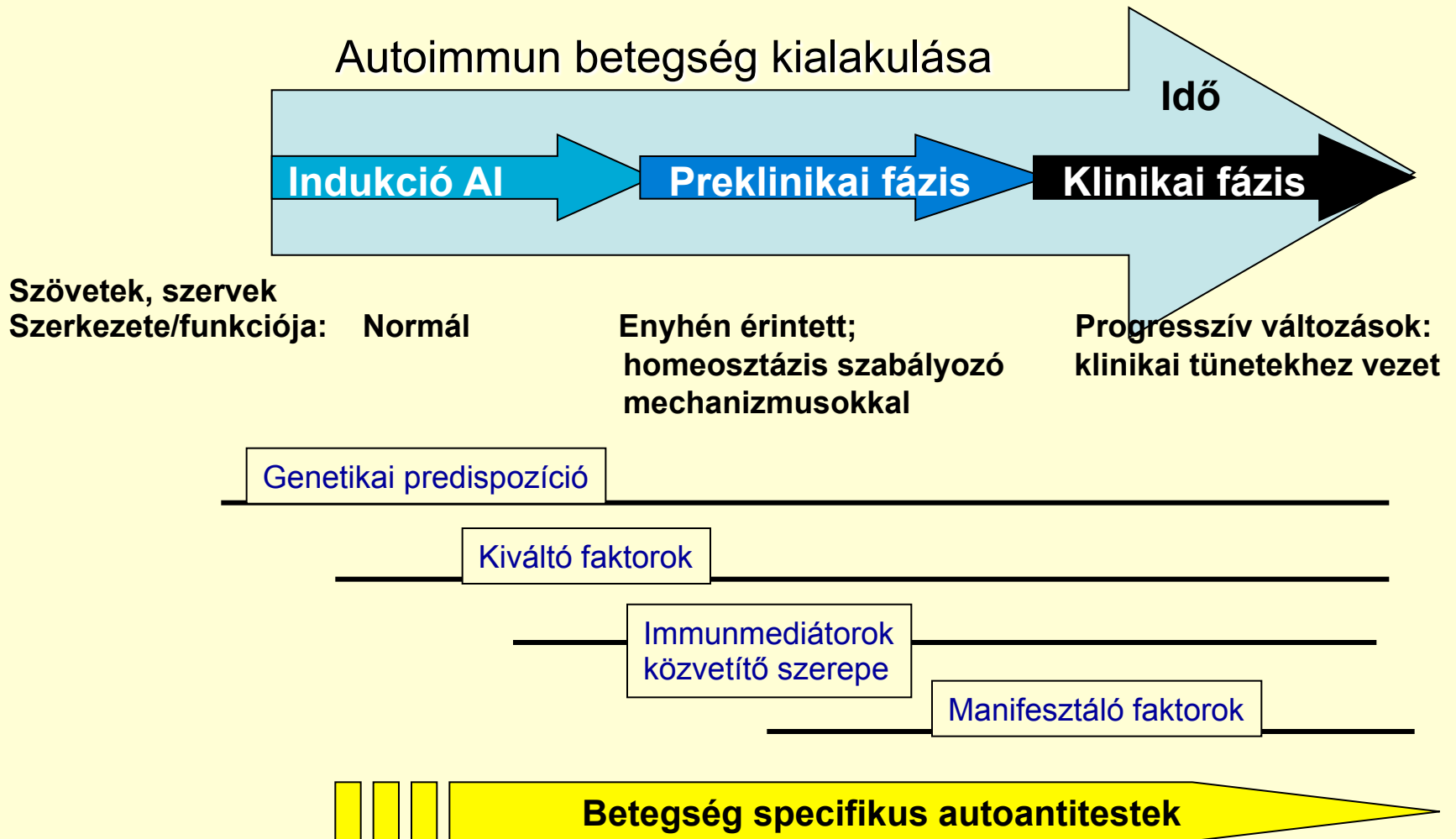
- Gyorsult süllyedés (CRP nem, csak szuperinfekcióban)
- Hypokomplementaemia (aktív szakban)
- Vizelet eltérések (haematuria, proteinuria, cylindrúria stb)
- Leukopaenia, thrombocythopaenia
- Anaemia (normocitás, normochrom, Coombs pozitivitás)
- **Autoantitestek** jelenléte (nukleoszóma, dsDNA, anti-Sm, anti-foszflipid AAT stb.)

Autoantitest laboratóriumi kimutatásának jelentősége

- Diagnózis felállítása – „marker autoantitest” (dsDNA, CCP, cardiolipin stb)
- Alcsoport, rizikócsoporthoz elkülönítése a kórképen belül
- Prognózis felállítása
- Aktív vagy inaktív stádium megítélése (dsDNA)
- Therápia eredményességének lemérése (Foszfolipid)
- Több kórkép együttes fennállásának („overlap”) megállapítása

Autoantitestek mint betegség előrejelzők-

M. Fritzler



Jellemző autoantitestek

Szisztémás	Szervspecifikus
<p><u>SLE:</u> dsDNA, Nucleosome ENA: Sm, RNP</p> <p><u>Sjögren:</u> SSA, SSB</p> <p><u>SSC:</u> Scl-70, Centromere</p> <p><u>Vasculitis:</u> ANCA: MPO, PR3</p> <p><u>Myositis:</u> Jo-1, Rib-P, SRP, Ku, Mi-2, PL-7, PL-12, PMScI-100</p> <p><u>Foszfolipid szindróma:</u> Cardiolipin β2-GP1 Phosphatidylserine Prothrombin</p> <p><u>RA:</u> Rheumatoid factor, CCP</p>	<p><u>Thyroiditis:</u> thyreoglobulin, TPO</p> <p><u>Coeliakia:</u> tissue transglutaminase (tTG), gliadin</p> <p><u>Diabetes mellitus:</u> glutamic acid decarboxylase (GAD), thyrosine phosphatase (IA2)</p> <p><u>Primer biliaris cyrrhosis:</u> M2-mitochondrial (PDH)</p> <p><u>Colitis – Crohn:</u> ASCA - PR3</p> <p><u>Goodpasture szindróma:</u> GBM</p>

Jelenleg alkalmazott módszerek

Immunfluoreszcencia (IF)

Direkt IF : a páciens szövetmintájához kötődött antitesteket vizsgáljuk

Indirekt IF: a beteg szérumában keringő antitesteket vizsgáljuk szöveten vagy sejten lévő antigénnel

Csak minőségi értékelés, szubjektív, munkaigényes

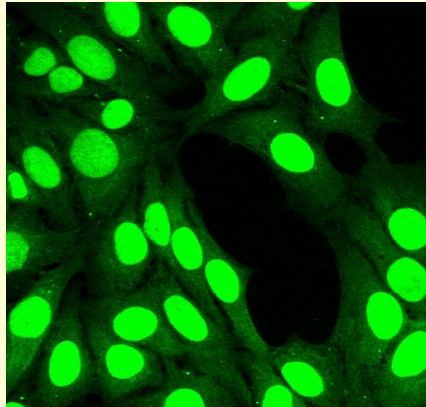
Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Enzimmel (Tormaperoxidáz) jelzett második ellenanyaggal mutatjuk ki a szérumból lekötődött ellenanyagokat.

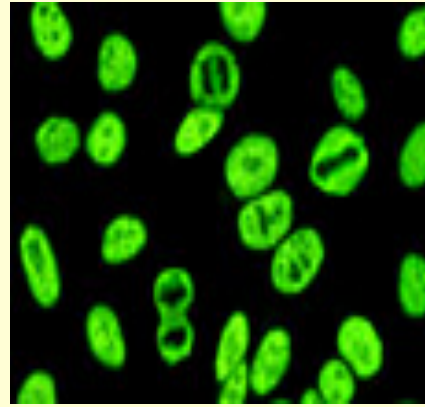
**Alkalmas minőségi (screening) és mennyiségi meghatározásra is a gyári kitekben található ismert koncentrációjú <U/ml> standardok segítségével).
Antigénspecifikus, automatizálható**

ANA screen – antinukleáris antitestek meghatározása - IIF

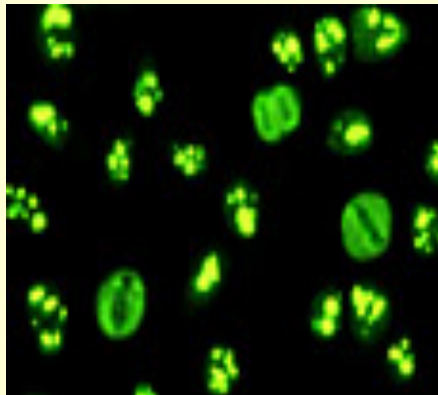
Több különböző autoantitest összefoglaló elnevezése.
Szűrőteszt, a leggyakrabban kért vizsgálat.



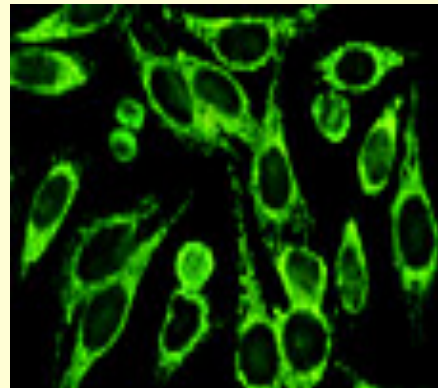
Anti-dsDNA +



Anti-PMScl+



Anti-SSA/SSB+ ?



AMA-M2 +



Hep-2 sejt

1. Szérum - AAT

2. Anti-humán IgG-FITC

Indirekt immunfluoreszcencia (IIF) előnyei:

- a vizsgálathoz használt antigén természetes környezetében látható
- a mintahígítás változtatásával (csökkentésével) a metodika érzékenysége fokozható
- inkubációs idő növelésével a vizsgálat érzékenysége növelhető
- a beteg különféle autoantitestjei sokszor nem tankönyvi vagy jól ismert formában jelennek meg,
- ilyenkor lehetőség van sejt /szövet / szerv metszetek kombinált használatára (biochip)
- az anti-humán IgG vagy IgA vagy IgM-PO (Peroxidáz) konjugátum változtatásával az autoantitest izotípusa is meghatározható
- szűrésre alkalmas
- kis mintaszám esetén is olcsó, részben automatizálható

Indirekt immunfluoreszcencia (IIF) hátrányai

- kiértékelés gyakorlatot igényel
- kiértékelésben sok a szubjektív elem
- fluoreszcens mikroszkóp szükséges
- heterofil antitestek zavaró hatása
- háttér fluoreszcencia zavaró hatása
- aspecifikus lelet nem ritka
- konfirmáló metodikára van szükség (dsDNS, ENA-6, stb.)
- nagy minta szériára megszorításokkal alkalmas

Antinukleáris antitest (ANA) IIF mintázat és betegségek összefüggése

ANA HEp-2 mintázat	Antigén	Betegség
Homogén	ds-DNA-hisztin komplex	SLE
Foltos, szemcsés	Sm RNP SS-A SS-B Centromer	SLE MCTD M. Sjögren, SLE, RA Scleroderma, CREST, PBC
Nukleoláris	Nukleoláris RNA Scl-70 PM-Scl	Scleroderma Scleroderma myositis Scleroderma overlap
Citoplazma	Jo-1 Riboszóma	Polymyositis/ dermatomyositis

A leggyakoribb anti-nukleáris autoantitestek prevalenciája és relevanciája

AAT	Asszociált betegség	AAT frekvencia	IFA mintázat
SSA(Ro)	SLE, Sjögren, neonatalis lupus	25-35% SLE 40-70% Sjögren 100% neonatalis lupus	Finom pöttyözött sejtmag
SSB (La)	Sjögren, SLE	30% Sjögren 10% SLE	Finom pöttyözött sejtmag
Sm	SLE (specifikus)	15-30% SLE	durva pöttyözött sejtmag
RNP	MCTD- Kevert kötőszöveti betegség (<i>Raynaud, sclerodactilia, oesophagus dysmotilitás</i>)	95% MCTD 20% SS 30-50% SLE	Nagy, durva pöttyözött sejtmag
Scl-70	Scleroderma	20-35%	Granuláris nucleoláris/homogén
Jo-1	Polymyositis	20-40%	Pöttyözött citoplazmatikus
Cenp-B	Scleroderma, CREST variáns	80% limitált SS 20% SS	Diszkért pöttyözött, a metafázisban levő sejtekben
Hiszton	Drog indukálta SLE	90%	Homogén mag
dsDNS	SLE (specifikus)	40-60%	Homogén mag

Autoimmun májbetegségek autoantitestjei

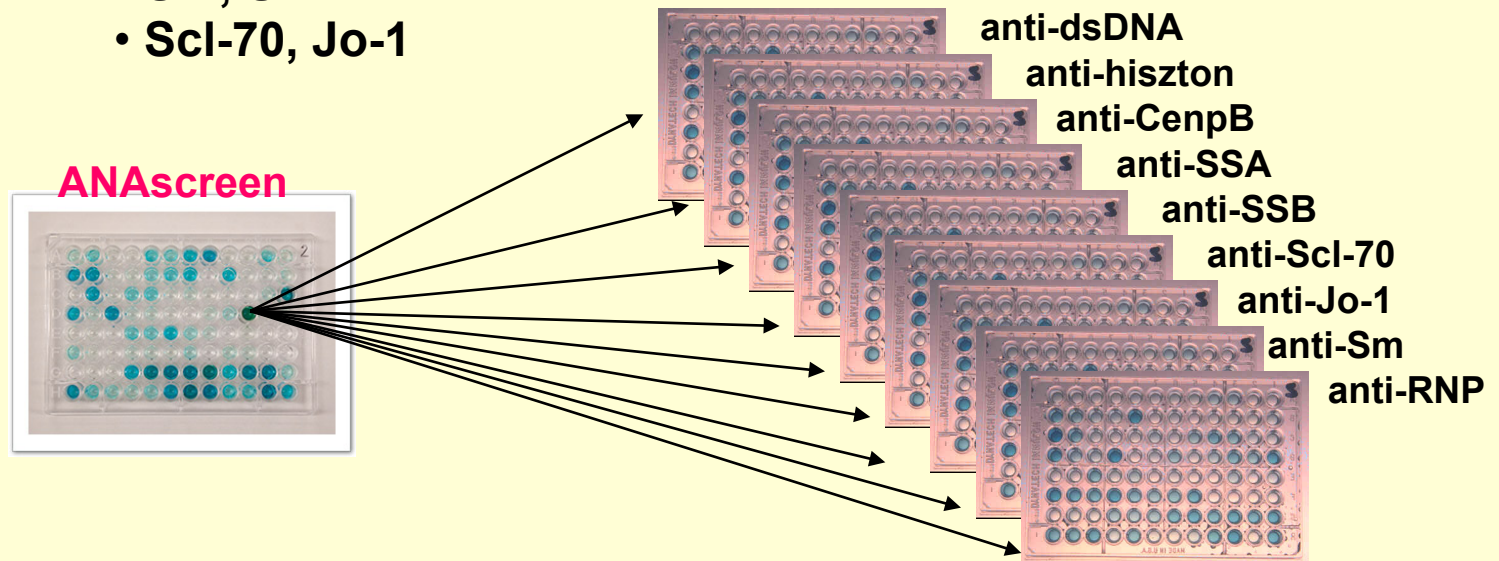
Antibody	Antigen	AIH1	AIH2	PBC	Overlap
ANA	Sp 100 (nuclear matrix) Gp 210 (Rim ANA)	+		+	+
ASM	Actin, Vimentin, Tubulin	+			+/-
LKM1	Cytochrome P450		+		
LC1	Formiminotransferase Cyclodeaminase		+		
SLA/LP	UGA suppressor tRNA associated protein	+	+		+
M2	pyruvate dehydrogenase complex			+	+

ANAscreen - microplate ELISA

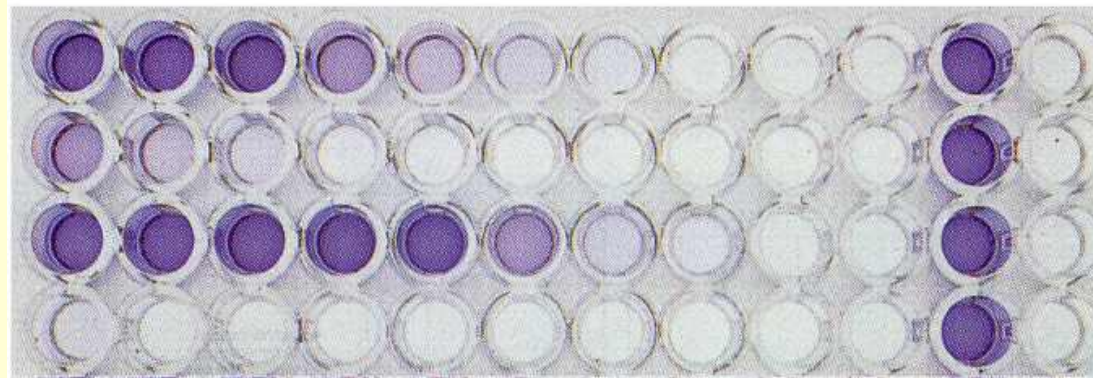
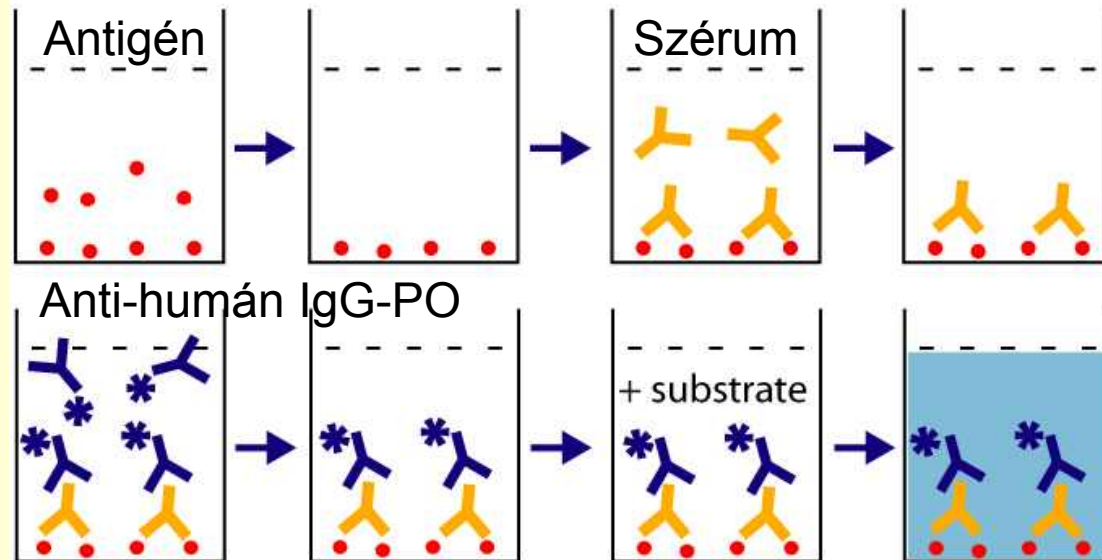
Az ELISA lemezt Hep2 sejtek magjából kivont antigének keverékével érzékenyítik:

- dsDNA
- hiszton
- centromer
- SSA/Ro, SSB/La
- Sm, Sm/RNP
- Scl-70, Jo-1

Pozitivitás esetén egy-egy antigénnel fedett külön ELISA lemezekon un. „kifejtő” vizsgálatok következnek



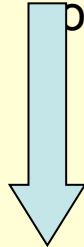
Autoantitest microplate ELISA



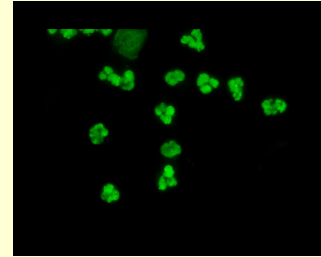
ANAcreeen- ELISA előnyei	Hátrányai
nagy szenzitivitás	sokszor bizonytalan antigén(forrás)
kis és nagy aviditású antitestek kimutatására egyaránt alkalmas	bizonytalan antigén tisztaság
kvantitatív meghatározás	egyedi standardok és kontrollok
izotípus meghatározás lehetséges	nemzetközi standardizálás hiánya
automatizálható	aspecifikus reakciók okozta álpozitivitás (CIC, RF, Immunglobulinok)
nagy számú minta, gyors és olcsó vizsgálata	

Merre halad az AAT diagnosztika?

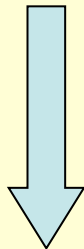
IIF: nem-specifikus, mintázatot ad, multiplex kép, manuális,
csak AAT nem vizsgálható



Mi ez ?



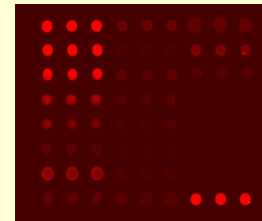
ELISA: antigén specifikus, egyedi autoantitestek mérése,
automatizálható, új autoantigének felismerése



Idő ?

Multiplex microarray technológia: antigén specifikus, komplex
autoantitest mintázat, automatizálható

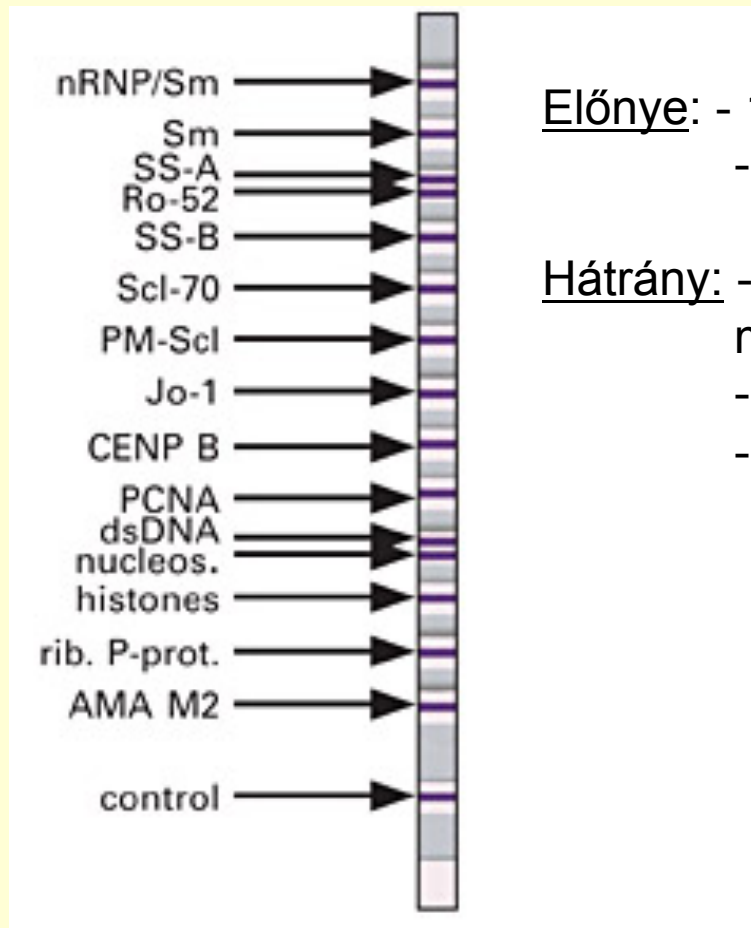
Gyors, specifikus



Multiplex immunszerológiai módszerek

1. **Immunoblot eljárás:** antigén denaturált konformációban, sok a fals pozitív/negatív reakció, nem elfogadott
2. **Protein chip módszerek: „microarray”:** - chip reader
 - üveg
 - műanyag
 - szilikon
 - nano-well
3. **Mikrogyöngy alapú módszerek:** - Flow citométer
 - Becton Dickinson
 - Bender MedSystem
 - Luminex platform

ANA-Profil Immunoblot



Előnye: - 1 beteg mintája is vizsgálható
- gyors

Hátrány: - antigén denaturált, nem megfelelő konformációban
- ál-negatív reakciók
- sok antigén nem vizsgálható

CombiChip Autoimmune 1.0

FOR DIAGNOSIS OF THE AUTOIMMUNE DISEASES VASCULITIS & COLLAGENOSIS

- Simultaneous quantitative analysis of 14 autoantibodies
- Easy as an ELISA test
- Up to 64 samples in one working cycle



Antigen Array



FAST® Slide Surface

Detection
fluorophor-labelled anti-IgG antibody binds

Serum-Incubation
auto-antibody binds to antigen

Printing
antigen on FAST Slide

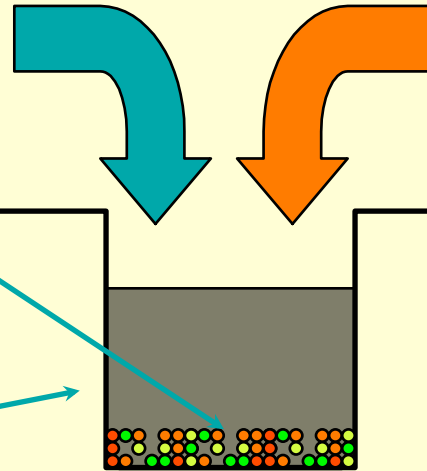


Multiplex Microbead Ass(rr)ay (MMA)

Reagensek:

különböző
színű
mikrogyöngyök

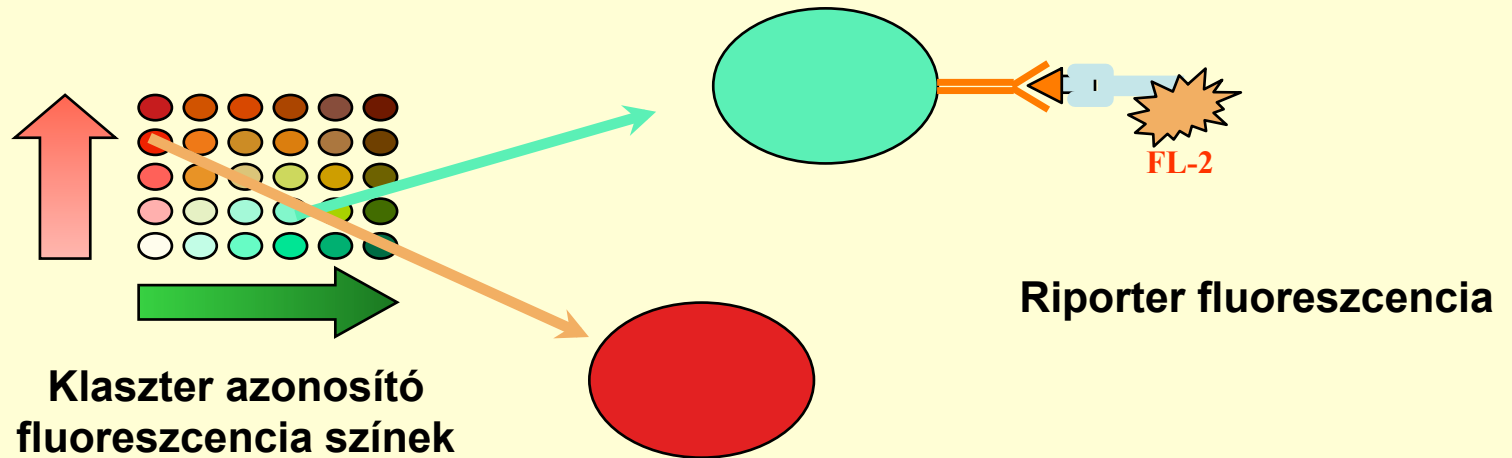
Reakció cella



Vizsgálati
minta: szérum

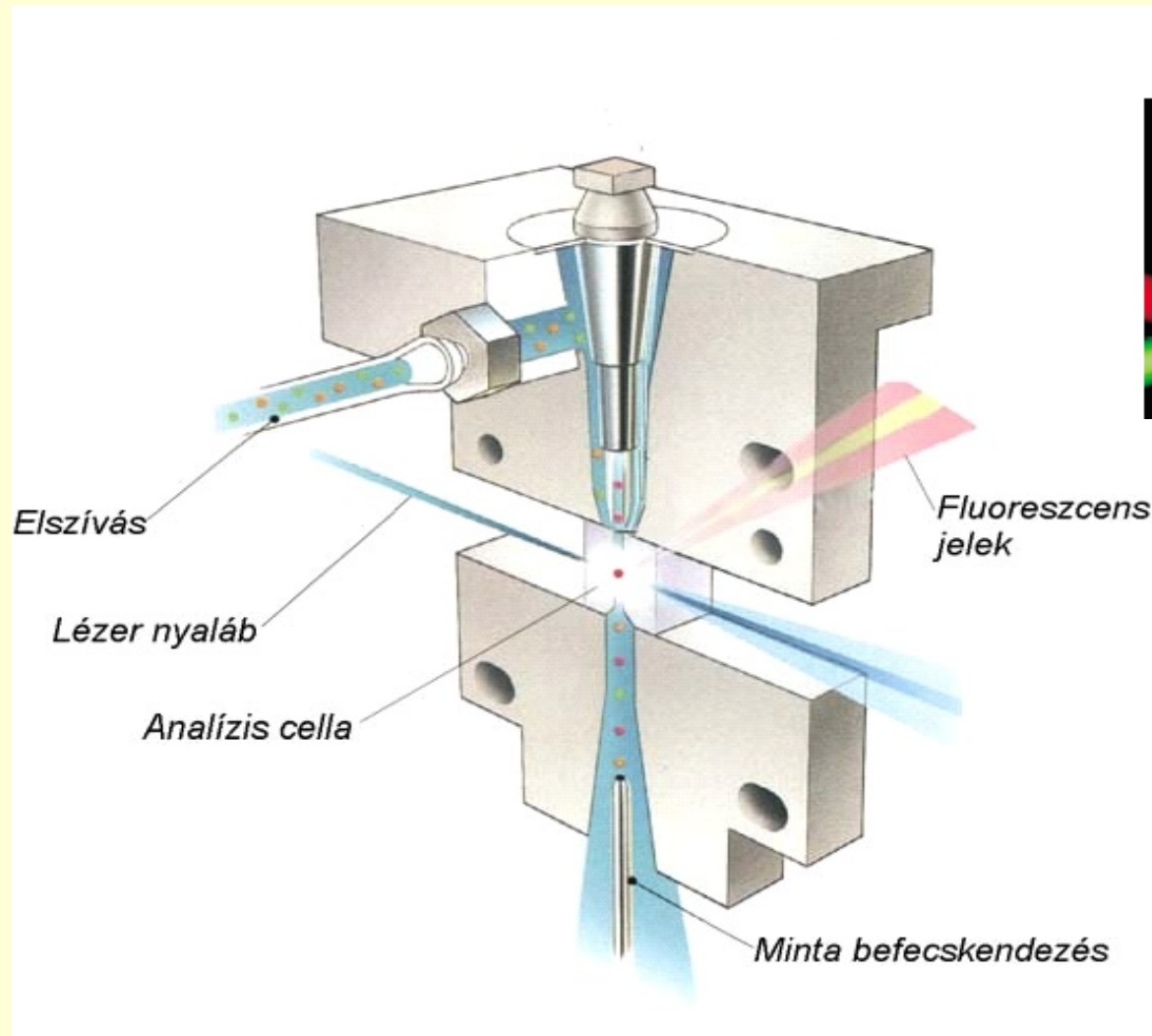
1000 gyöngy/ antigén

Multiplex Microbead Assay



- Minden egyes szín önálló microbead csoportot (klasztert) alkot
- Minden klaszter más-más specifikus AAT vagy citokin kimutatását végzi
- Egy minta-komponens a mennyiségével (koncentrációjával) egyenesen arányos riporter fluoreszcenciát „gerjeszt”

Áramlási citométer cella



ELISA / Athena Luminex összemérések

Antigén	ANA-II Plus 70 szérum			ANA-III 90 szérumminta			ANA-III-Plus 90 szérumminta		
	Positive ELISA/AtheNa	Neg.Discrep No / %	PosDiscrep No. / %	Positive ELISA/AtheNa	Neg.Discrep P No / %	PosDiscrep No. / %	Positive ELISA/AtheNa	Neg.Discrep No / %	PosDiscrep No. / %
dsDNA	18/13	7(10%)	1 (1%)	23/12	11(12%)	3 (3%)	20/21	8 (9%)	3 (3%)
SSA	24/28	1 (1%)	8 (11%)	23/37	1 (1%)	13 (14%)	23/25	1 (1%)	4 (4%)
SSB	12/16	0 (0%)	4 (6%)	13/19	2 (2%)	7 (8%)	8/14	3 (3%)	8 (9%)
Sm	5/5	2 (3%)	2 (3%)	5/5	1 (1%)	1 (1%)	5/4	1 (1%)	1 (1%)
RNP	7/9	3 (3%)	5 (7%)	12/15	3 (3%)	5 (6%)	14/13	6 (7%)	6 (7%)
Scl-70	3/8	1 (1%)	5 (7%)	5/3	3 (3%)	1 (1%)	3/9	2 (2%)	8 (9%)
Jo-1	2/2	1 (1%)	1(1%)	3/2	2 (2%)	1 (1%)	2/2	0 (0%)	0 (0%)
Cenp-B	3/3	0 (0%)	1 (1%)	3/3	1 (1%)	1 (1%)	2/5	1 (1%)	4 (4%)

A multiplex meghatározás előnyei:

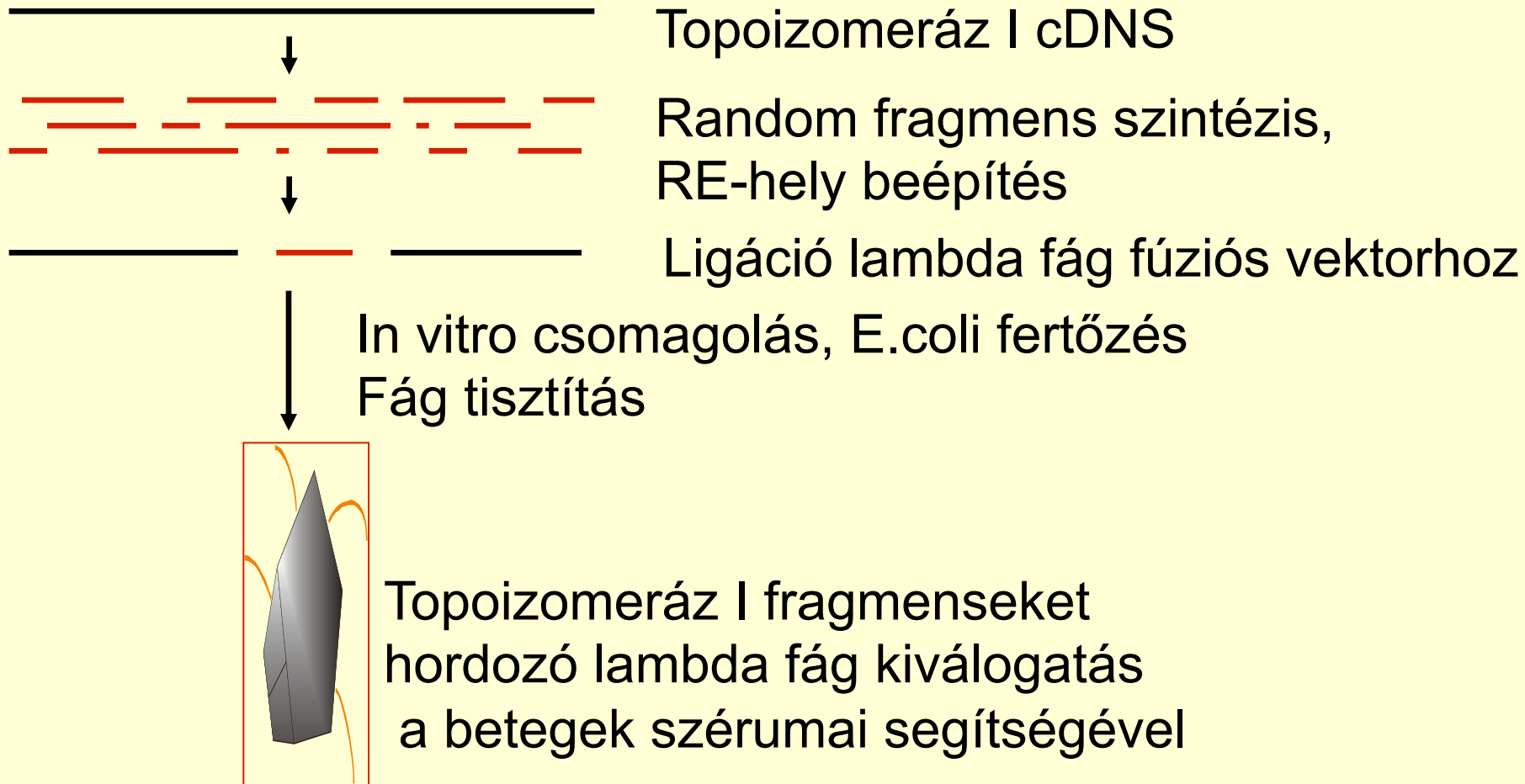
- Több AAT eredmény egyetlen méréssel a minta egyszeri felhasználásával
- Gyors diagnózis, szűrés, és ezzel a prevenció lehetőségét biztosítja
- Idő és pénzmegtakarítás
- Számítógépes analízis lehetővé teszi a kvantitatív és kvalitatív módszert is
- Szubjektivitás kizárható
- Intra-assay kalibrálási mód
- Munkaerő megtakarítás, de nagy szakértelem kell az értékeléshez

Jövő? Eritóp térképezés

SCL-70 pozitívitas lehet:

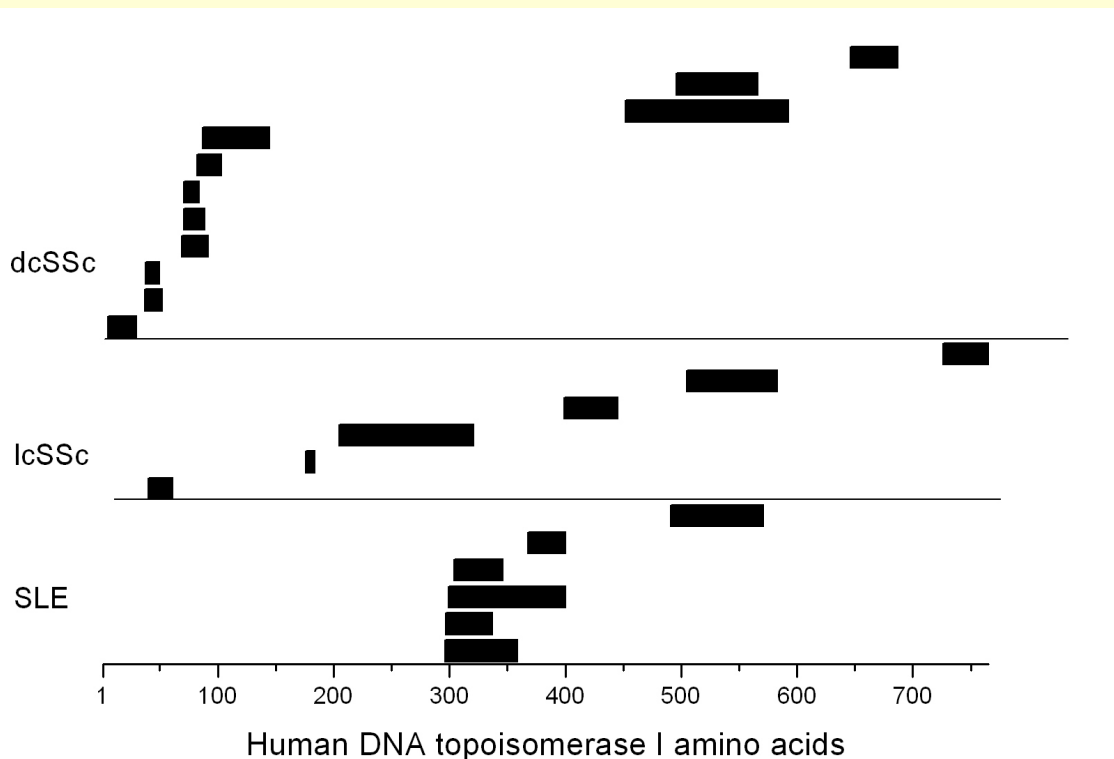
- Szisztémás sclerosis két csoportja:
 - dcSSc: végtagok bőre és a törzs bőre is érintett súlyos belső szervi elváltozásokkal járó, rossz prognózisú forma
 - lcSSc: csak az arc bőre érintett és a végtagok bőre distalisan, kórjólata kedvező
- EGYÉB KÓRKÉPEK:
 - szisztémás lupus erythematosus (SLE)
 - Sjögren sy
 - MCTD

ScI-70 = topoizomeráz I antigén fragmens könyvtár előállítása



Felismert epitópok mintázata különböző dcSSc-s, lcSSc-s és SLE-s betegekben

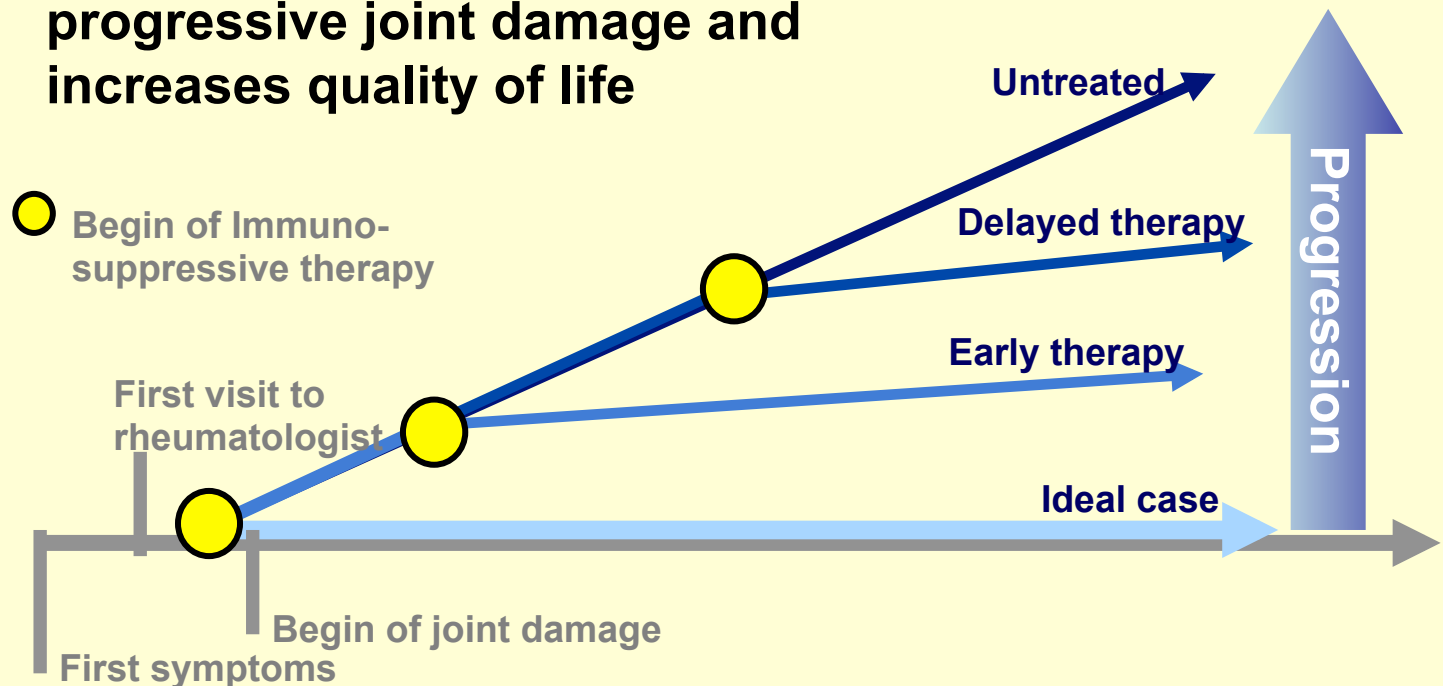
DNS topoizomeráz I egyik fragmensét (immunodomináns) mindhárom betegcsoportba tartozó anti-Sci-70 pozitív beteg széruma felismeri



- ◆ dcSSc-s betegek az N-terminális doménben ismernek fel epitópokat
- ◆ lcSSc-s betegek széruma különböző fragmenseket ismer fel a molekula teljes hosszán
- ◆ SLE-s betegek által felismert epitópok a molekula meghatározott részén csoportosulnak

A korai diagnózis javít a betegség progresszióján

Early treatment prevents progressive joint damage and increases quality of life



Autoantitest predikció – szűrés előnyei

Yehuda Schoenfeld, Tel Aviv Israel

- Mi a teendő tünetmentes autoantitest (ANA, RF) pozitív beteggel?
- (1) Kivizsgálni, hogy van-e más AAT-je is?
- (2) HLA vizsgálat (HLA-A1, B8, DR3 – SLE, DR-B1 +CCP AAT: RA). C1q,C2, C4 deficiencia van-e?
- (3) Kerülni az orális kontraceptívumokat
- (4) Terhesség külön figyelmet igényel - ösztrogén, prolaktin provokál
- (5) UV kerülése
- (6) Fölösleges védőoltások kerülése
- (7) Telítetlen zsírsavban gazdag diéta
- (8) Dohányzás kerülése
- (9) Mozgás
- (10) D-Vitamin napi 400-800IU