

VYŠETŘENÍ AUTOPROTILÁTEK - SOUČASNÉ MOŽNOSTI

MUDr. Pavlína Hrdá, doc. MUDr. Ivan Šterzl, CSc.

Ústav imunologie a mikrobiologie 1. LF UK, Praha

Laboratorní imunologické vyšetření přispívá k diagnóze autoimunitních onemocnění. Relativně jednoduchou metodou je vyšetření autoprotilátek. Autoprotilátky mohou předcházet klinické manifestaci onemocnění, provázet klinickou manifestaci, přetrvávat po klinicky manifestní onemocnění nebo mohou existovat bez onemocnění. Autoprotilátky slouží jako marker autoimunitního onemocnění. K jejich detekci slouží řada metod, jako je např. nepřímá imunofluorescence, enzymová imunanalýza, radioimunoanalýza, imunoblot. V publikaci jsou konkrétně popsány možnosti stanovení jednotlivých systémových i orgánově specifických autoprotilátek. Laboratorní stanovení autoprotilátek však může mít řadu úskalí. Proto by měl být u každé diagnostické metody určen optimální poměr senzitivita/specificita.

Klíčová slova: autoprotilátky, autoimunitní onemocnění, nepřímá imunofluorescence, enzymová imunanalýza.

DETERMINATION OF AUTOANTIBODIES - PRESENT POSSIBILITIES

The laboratory immunological findings contribute to the diagnosis of autoimmune diseases. A relatively simple method is the detection of autoantibodies. Autoantibodies can precede the clinical manifestation of the disease, accompany the clinical manifestation, last during the clinical manifestation or even exist without any disease present. Autoantibodies serve as a marker of autoimmune diseases. Various methods serve for the detection of autoantibodies, e.g. indirect immunofluorescence, enzyme immunoanalysis, radioimmunoanalysis, immunoblotting. The paper describes the detailed possibilities for the detection of the particular systemic and organ specific autoantibodies. However, the laboratory determination of autoantibodies can present a series of pitfalls. Therefore, for each diagnostic method, an optimum sensitivity/specificity ratio should be determined.

Key words: autoantibodies, autoimmune disease, indirect immunofluorescence, enzyme immunoanalysis.

Úvod

Autoimunitní onemocnění je charakterizováno stavem, při kterém vytvořené autoprotilátky nebo autoreaktivní T- či B-lymfocyty poškozují vlastní buňky či tkáň organismu. Diagnostika autoimunitních chorob spočívá v rozboru anamnézy, klinických příznaků, objektivního nálezu a laboratorního vyšetření. Laboratorní imunologické vyšetření přispívá k diagnóze autoimunitního onemocnění, eventuálně k posouzení jeho aktivity. Vyšetření autoprotilátek je proti buněčným metodám metodou relativně jednoduchou. Autoprotilátky můžeme dělit na orgánově specifické a orgánově nespecifické (tabulky 1 a 2).

Autoprotilátky jsou heterogenní skupinou protilátek s ohledem na jejich indukci, specifitu, efekt a klinický význam. Jsou to imunoglobuliny namířené proti endogenním antigenům, jako jsou proteiny, glykoproteiny, nukleové kyseliny, fosfolipidy a glykofosfolipidy. Můžeme je detekovat v séru a v dalších tělesných tekutinách (např. synoviální tekutině, cerebrospinální tekutině). Tvorba autoprotilátek může být indukovaná různými patogenetickými mechanismy (patologické autoprotilátky) nebo může probíhat bez indukce jako součást tvorby přirozeného repertoáru obrany (přirozené autoprotilátky). Přirozené autoprotilátky hrají více či méně fyziologické role (např. první linie v obraně proti infekci, imunoregulace), obvykle jsou přítomny v nižších titrech, mají relativně nízkou afinitu k odpovídajícímu antigenu a většina patří do třídy IgM, zatímco antigenem aktivované autoprotilátky mohou mít patogenetický efekt (např. inhibice nebo stimulace receptoru). Řada autoprotilátek, které jsou indukovány specificky u autoimunitních nemocí, mají významnou klinickou relevanci bez ohledu na svou úlohu v patogenezi onemocnění.

Prevalence autoimunitních onemocnění v populaci (3–5 %) podporuje důležitost diagnostiky autoprotilátek ve veřejném zdravotnickém sektoru. V klinické rozvaze se uplatňují autoprotilátky při diferenciální diagnóze možného systémového nebo orgánově specifického onemocnění, při zpřesnění diagnózy, odhadu aktivity autoimunitního procesu a případně prognózy onemocnění.

Autoprotilátky mohou předcházet klinické manifestaci autoimunitního onemocnění, provázet klinickou manifestaci, přetrvávat po klinicky manifestním onemocnění nebo mohou existovat bez onemocnění.

Autoprotilátky pravděpodobně nejsou většinou bezprostřední příčinou onemocnění. Spíše slouží jako marker autoimunitního onemocnění.

Možnosti stanovení autoprotilátek

Antinukleární protilátky - ANA

Tyto autoprotilátky jsou nespecifické, zaměřeny na komplex různých nukleárních antigenů. Cílem antinukleárních protilátek v buňce je chromatin (DNA, histony, jejich komplex zvaný nukleozom a nehistonové chromozomální proteiny, např. centromery), jaderná membrána a póry, jádérko (polypeptidy, někdy v komplexu s RNA, různé enzymy), ribonukleové kyseliny (především RNA v komplexu s proteiny = ribonukleoproteiny RNP), jaderná matrix (fibrilární kostra jádra), jaderná tekutina (obsahující celou řadu rozpustných antigenů) a různé součásti cytoplazmy (např. enzymy, ribozomy, mitochondrie).

První screeningovou metodou by mělo být mikroskopické vyšetření antinukleárních protilátek nepřímou imunofluorescencí, kde jako substrát slouží vrstva lidských nádorových buněk - HEP-2 buněčná linie z lidského karcinomu.

nomu laryngu. Je možno odečítat různé typy fluorescence tak, jak různé autoprotilátky reagují s různými komponentami buněk. Většina těchto obrazů neurčí jednoznačně některou z autoprotilátek, ale může napomoci při dalším vyšetřování. Rozeznáváme šest základních typů fluorescence: homogenní, periferní, zrnitý, nukleolární, centromerový a cytoplazmatický, některé s dalšími podtypy (tabulka 3). Pozitivní nález je vždy nutné hodnotit v kontextu s klinickým obrazem nemoci. Na metodu nepřímé imunofluorescence by v případě pozitivity mělo navazovat vyšetření ANA některou ze složitějších a přesnějších metod vedoucích k určení přesné protilátkové specifity. K přesnější identifikaci autoprotilátek se používají další metody, např. enzymová imunanalýza (EIA), při níž se užívají celá jádra, jaderné extrakty nebo směsi purifikovaných nebo rekombinantních jaderných proteinů.

Autoprotilátky proti dvojspirálové DNA - anti dsDNA

Důležitým indikátorem přítomnosti anti dsDNA je homogenní fluorescence interfáze jádra a chromatinu mitotických buněk při screeningu antinukleárních protilátek nepřímou fluorescencí na HEP-2 buňkách. Další možností je imunofluorescenční test se substrátem *Crithidia Luciliae*, což je bičíkovec, který má kromě jádra ještě tělísko, zvané

Tabulka 1. Orgánově nespecifické autoprotilátky a jejich klinické užití

orgánově nespecifické autoprotilátky	klinické užití
ANA	• systémový lupus erythematoses, screening pro jednotlivé antinukleární autoprotilátky
DsDNA	• systémový lupus erythematoses
ENA-SS-A, SS-B	• Sjögrenova choroba, systémový lupus erythematoses
ENA-Scl-70	• systémová sklerodermie
ENA-Sm	• systémový lupus erythematoses, popřípadě overlap syndrom
ENA-Jo-1, PL-7, PL-12	• dermatomyozitida/polymyozitida
ACA	• CREST syndrom, systémové sklerodermie
ANCA	• vaskulitické syndromy typu Wegenerovy granulomatózy (cANCA) a nodózní polyarteritidy (pANCA)
aPL	• antifosfolipidový syndrom
AMA	• primární biliární cirhóza • možno u polékového SLE, u chronické aktivní hepatitidy a cirhózy, dermatomyozitidy/polymyozitidy
SMA	• chronická aktivní autoimunitní hepatitida, virová hepatitida
LKM	• chronická autoimunitní hepatitida, virová hepatitida typu C
StMAB	• myasthenia gravis, polymyozitida
RF	• revmatoidní artritida, systémový lupus erythematoses, Sjögrenův syndrom

Vysvětlivky: ANA – antinukleární protilátky, ENA – protilátky proti extrahovatelným nukleárním antigenům, ANCA – protilátky proti cytoplazmě neutrofilů, dsDNA -proti dvojspirálové DNA, aPL – protilátky proti fosfolipidům, RF – revmatoidní faktor, ACA – autoprotilátky proti centromerům, AMA – protilátky proti mitochondriím, SMA – protilátky proti hladkým svalům, LKM – autoprotilátky proti mikrozomům jater a ledvín, StMAB – protilátky proti příčně pruhovaným svalům

kinetoplast, které obsahuje čistou dvouvláknovou DNA. Přítomnost protilátek indikuje fluorescence kinetoplastu.

Dalšími možnými detekčními metodami jsou i radioimunoanalýza (Farr esej) nebo EIA, které se doporučují pouze pro longitudinální sledování hladin anti dsDNA u pozitivních pacientů.

Autoprotilátky proti extrahovatelným jaderným antigenům - ENA

Extrahovatelné jaderné antigeny jsou všechny ribonukleoproteiny a nehistonové proteiny, které mohou být vymyty z buněčných jader užitím neutrálního roztoku pufru. K detekci autoprotilátek slouží dvojitá radiální imunodifúze (metoda podle Ouchterlonyho).

Detekce jednotlivých autoprotilátek ze skupiny ENA:

Autoprotilátky proti Sm antigenu: dvojitá radiální imunodifúze, imunoblot, EIA, radioimunoprecipitace.

Autoprotilátky anti SS-A: dvojitá radiální imunodifúze, imunoblot, EIA.

Autoprotilátky anti SS-B: dvojitá radiální imunodifúze, imunoblot, EIA.

Antisyntetázové autoprotilátky (autoprotilátky namířené proti aminoacyl-tRNA-syntetázám) – např. Scl-70 (proti DNA-topoizomeráze), Jo-1 (proti histidyl-tRNA-syntetáze), PL-7 (proti threonyl-tRNA-syntetáze) a PL-12 (proti alanyl-tRNA-syntetáze): metody nepřímé imunodifúze, imunoblot, EIA, imunoprecipitace.

Autoprotilátky proti cytoplazmě neutrofilů - ANCA

ANCA je obecný termín pro všechny autoprotilátky namířené proti cytoplazmatickým antigenům neutrofilů. Cílové antigeny ANCA jsou proteináza 3, myeloperoxidáza, elastáza, cathepsin G, azurozidin, lactoferin, lysozym, BPI (protein zvyšující bakteriální permeabilitu). Ke stanovení ANCA se užívá nepřímá imunofluorescence, kde jako substrát slouží etanolem fixované lidské neutrofile, produkující rozdílné typy cytoplazmatické imunofluorescence (granulární cytoplazmatická – cANCA, perinukleární – pANCA a atypická – aANCA nebo xANCA).

Tabulka 2. Orgánově specifické autoprotilátky a jejich klinické užití

orgánově specifické autoprotilátky	klinické užití
proti TPO	• autoimunitní tyreoiditida
proti Tgl	• autoimunitní tyreoiditida
proti nadledvinám	• autoimunitní Addisonova choroba, autoimunitní polyglandulární syndromy I. a II. typu
proti ovariím	• autoimunitní poruchy reprodukce, syndrom předčasného ovariálního selhání
proti testes	• autoimunitní poruchy reprodukce
proti Langerhansovým ostrůvkům	• diabetes mellitus 1. typu
proti GAD	• diabetes mellitus 1. typu
proti IA2	• diabetes mellitus 1. typu
proti inzulínu	• diabetes mellitus 1. typu
proti endomyziu	• celiakie, dermatitis herpetiformis

Vysvětlivky: TPO – tyreoidální peroxidáza, Tgl – tyreoglobulin, GAD – dekarboxyláza kyseliny glutamové, IA2 – specifický ostrůvkový antigen 2

ANCA se specificitou pro myeloperoxidázu stanovujeme enzymovou imunoanalýzou s vysoce purifikovanou lidskou myeloperoxidázou, jako screening se užívá nepřímá imunofluorescence pro ANCA s obrazem perinukleární fluorescence (pANCA). ANCA se specificitou pro proteinázu 3 se detekují též metodou enzymové imunoanalýzy s vysoce purifikovaným nativním PR3 a opět jako screening slouží nepřímá imunofluorescence pro ANCA s obrazem cytoplazmatické fluorescence (cANCA). ANCA se specificitou jinou než pro proteinázu 3 a myeloperoxidázu stanovujeme metodou EIA nebo užitím imunoblotu.

Protilátky proti fosfolipidům - aPL

Jedná se o termín pro všechny autoprottilátky namířené proti neutrálním nebo negativně nabitým fosfolipidům tj. kardiolipinové prottilátky, lupus antikoagulans, fosfatidylcholinové prottilátky, fosfatidyletanolaminové prottilátky, fosfatidylinositolové prottilátky, fosfatidylserinové prottilátky. K detekci těchto prottilátek slouží metoda EIA s užitím purifikovaných fosfolipidů v přítomnosti β 2-glykoproteinu nebo kininogenu. Dále se dá užít koagulační test.

Revmatoidní faktor - RF

Revmatoidní faktor jsou autoprottilátky namířené proti Fc fragmentu pozměněného IgG imunoglobulinu.

V minulosti byly nejčastěji pro stanovení revmatoidního faktoru užívány aglutinační techniky. Obecně užívaný-

mi metodami v současnosti jsou kvantitativní metody, jako je EIA a nefelometrie.

Revmatoidní faktor může být nalezen ve všech imunoglobulinových třídách (IgM, IgG, IgA, IgD, IgE). Nefelometrie umožňuje kvantitativní stanovení revmatoidního faktoru, preferenčně detekuje IgM revmatoidní faktor. Při nefelometrii se vzhledem k cirkulujícím imunokomplexům mohou vyskytovat falešně pozitivní výsledky. EIA je pouze test, který umožňuje rozlišení izotypů IgM, IgG a IgA revmatoidního faktoru.

Autoprottilátky proti centromérům - ACA

ACA můžeme detekovat pomocí nepřímé fluorescence na Hep-2 buňkách. Dalšími detekčními metodami jsou EIA s užitím rekombinantního CENP-B proteinu a imunoblot s užitím buněčných extraktů reagujícími s centromerovými proteiny CENP-A, -B a -C.

Protilátky proti mitochondriím - AMA

Tyto autoprottilátky můžeme detekovat nepřímou imunofluorescencí, pomocí imunoblotu nebo metodou EIA. Imunofluorescence je zdaleka nejužívanější metodou pro klinické testování AMA, jako substrát se užívají Hep-2 buňky nebo krysí řezy. Imunofluorescence detekuje pouze přítomnost či absenci AMA a nemá schopnost detekovat specifické antigeny. Screeningové vyšetření AMA imunofluorescenční metodou je proto diferenciativně diagnosticky omezené. Přínosem je vyšetření podtypů AMA (M1-M6).

Protilátky proti hladkým svalům - SMA

Tyto autoprottilátky reprezentují heterogenní skupinu prottilátek s rozdílnou specificitou, které reagují s různými antigeny cytoskeletu hladkého svalu buněk. Detekujeme je pomocí nepřímé imunofluorescence, kde jako substrát slouží kultury fibroblastů nebo myši žaludky.

Autoprottilátky proti mikrozomům jater a ledvin - LKM

Je známo několik cílových antigenů, a tak rozlišujeme autoprottilátky LKM-1, LKM-2, LKM-3, LM. Standardní, ačkoliv ne nejlepší technikou pro detekci LKM-1, LKM-2, LKM-3 a LM je nepřímá imunofluorescence s užitím hlodavčích kryostatických řezů jater a ledvin. Nejvíce senzitivní a specifickou pro detekci LKM-1 je detekce pomocí imunoblotu s užitím rekombinantního P450II D6.

Protilátky proti příčně pruhovaným svalům - StMAb

K detekci těchto autoprottilátek se užívá nepřímá imunofluorescence s hlodavčí nebo lidskou svalovou tkání jako substrátem, nebo metoda EIA, s užitím směsi proteinů extrahovaných z lidských příčně pruhovaných svalů nebo purifikovaných proteinů příčně pruhovaných svalů.

Orgánově specifické autoprottilátky

K detekci autoprottilátek proti antigenům nadledvin, ovarií, testes, Langerhansových ostrůvků, štítné žlázy a proti endomyziu se užívá metoda nepřímé imunofluorescence, kde jako substrát slouží opičí řezy dané tkáně.

Tabulka 3. Typy fluorescence na Hep-2 buňkách, jednotlivé prottilátky a nejčastější výskyt při onemocnění

typ fluorescence	ANA	onemocnění
homogenní	• anti-histonové • anti-dsDNA	• SLE, RA, LI-SLE, JCA • SLE
periferní	• anti-dsDNA • anti-laminové	• SLE • SLE
skvrnitý	• anti-U1 RNP • anti-Sm • anti-La (SS-B) • vanti-Ro (SS-A) • anti-PCNA/cyklin anti-Ku anti-Scl-70	• MCTD, SLE • SLE • SS, SLE, vzácné RA • SS, SLE, neonatální lupus, řídce RA • SLE • SLE, SCL/DM • SCL
nukleolární	• anti-ribosomální RNP	• SLE
homogenní	• anti-PM-Scl	• SCL/DM
chomáčkovitý	• anti-U3 RNP (fibrilarin)	• SCL
skvrnitý	• anti-RNA polymeráza I	• SCL
tečkovaný	• anti-centromerové	• CREST
cytoplazmatický	• anti-tRNA syntetázy (Jo-1, PI-7) • anti-ribosomální RNP • anti-Ro • anti-mitochondriální	• PM/DM • SLE • SLE • PBC

Vysvětlivky: SLE – systémový lupus erythematosus, LI-SLE – léky indukovaný SLE, RA – revmatoidní artritida, SS – Sjögrenův syndrom, SCL – systémová sklerodermie, PM/DM – polymyozitida/dermatomyozitida, CREST – limitovaná forma sklerodermie, MCTD – smíšené onemocnění pojiva, JCA – juvenilní chronická artritida, PBC – primární biliární cirhóza

Enzymovou imunoanalýzou se stanovují autoprotilátky proti tyreoidální peroxidáze, tyreoglobulinu a gliadinu. Autoprotilátky proti dekarboxyláze kyseliny glutamové, proti inzulinu, proti specifickému ostrůvkovému antigenu IA2 se detekují pomocí radioimunoanalýzy.

Závěr

Je nutné si uvědomit, že stanovení autoprotilátek má řadu úskalí. Diagnosticky relevantní autoprotilátky jsou heterogenní s ohledem na jejich specifitu, tj. rozpoznávají různé druhy epitopů. Následkem toho je, že rozdílné analýzy často detekují rozdílné subpopulace autoprotilátek. Výsledek stanovení pro konkrétní autoprotilátkovou specifitu se proto může lišit od metody k metodě.

Byla-li užita k určení přítomnosti dané antigenní specifity pouze jedna detekční metoda, tak nikdy nemůžeme vyloučit možnost falešně pozitivního nebo negativního výsledku. Příkladem efektivního přístupu k sérologické diagnóze systémových autoimunitních onemocnění může být kombinace vyšetřování antinukleárních autoprotilátek cestou nepřímé imunofluorescence následované diferenciací autoprotilátkové specifity cestou enzymové imuno-

analýzy. Kontrolní testy by měly být provedeny v případě, kdykoliv byla nalezena negativní nukleární fluorescence v kombinaci s pozitivním výsledkem pro ANA specifitu (např. dsDNA, Sm, U1-RNP autoprotilátky) nebo negativní cytoplazmatická fluorescence v kombinaci s pozitivním nálezem anticytoplazmatických protilátek (např. Jo-1 autoprotilátky). Jestliže je tato kombinace (IF negativní, EIA pozitivní), tak je diagnostická cena enzymové imunoanalýzy limitovaná.

Diagnostická hodnota autoprotilátkové specifity se liší v závislosti na typu použité detekční metody. Vysoká senzitivita metody obvykle vede k vysoké diagnostické senzitivě, ale často k nízké specifitě daných autoprotilátek pro odpovídající onemocnění. Např. autoprotilátky proti různým extrahovatelným jaderným antigenům detekované dvojitou radiální imunodifuzí jsou vysoce specifické pro autoimunitní onemocnění pojivové tkáně, ačkoliv jejich senzitivita je limitovaná. Užitím vysoce senzitivní EIA roste diagnostická senzitivita, ale obvykle to vede i k rozšíření diagnostické specifity. U každé diagnostické metody by měl být proto určen optimální poměr senzitivita/specifita.

Literatura

1. Bartůňková J. Autoimunitní onemocnění. *Forum medicinae* 2001: 5–6.
2. Conrad K, Schöpler W, Hiepe F. Autoantibodies in systemic autoimmune diseases: a diagnostic reference. Lengerich, Berlin, Riga, Rom, Viernheim, Wien, Zagreb: Pabst Science Publishers 2002.
3. Fučíková T. Klinická imunologie v praxi. Praha: Galén 1997.
4. Lokaj J. Imunitní systém a možnosti jeho vyšetřování. *Forum medicinae* 2001: 5–6.
5. Peter JB, Shoenfeld Y. Autoantibodies. Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Tokyo: Elsevier 1996.