

Nové analyty v diferenciální diagnostice autoimunitních systémových onemocnění

Ivana Půtová

Revmatologický ústav, Praha

ředitel: prof. MUDr. Karel Pavelka, DrSc.



Diagnostika systémového autoimunitního onemocnění



- **Lékař:**

- ✓ Jaký analyt (protilátky) chci analyzovat?
- ✓ Jakou metodou?
- ✓ Jak budu s výsledky vyšetření pracovat dále.....(co očekávám od výsledků vyšetření....)

- **Laboratoř:**

- ✓ Diferenciální laboratorní diagnostika – provedení vyšetření požadovaných analytů
- ✓ Laboratorní interpretace výsledku vyšetření
- ✓ Doporučení dalších laboratorních postupů.....

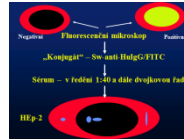


Klinický význam autoantilát

- ✓ **Součást diagnózy** (dg. kritéria, silná indikace určitého onemocnění)
- ✓ **Podpora diagnózy** (Ro, La - SS, SLE, PM, DM, SSc)
- ✓ **Asociace s klinickými příznaky** (P Ab-NPSLE, dsDNA, anti-C1q, NCS – SLE a nefritida)
- ✓ **Odhad prognózy** (Scl a RNA pol u SSc oproti ACA Ab)
- ✓ **Podskupiny onemocnění** (Jo-1, PL-7, PL-12 – antisyntetázový syndrom)
- ✓ **Klinické sledování a odhad aktivity** (ANA, ANCA Ab – hladina nekoreluje s klinickým obrazem, absolutní hladina ds DNA nesouvisí s aktivitou, pokud ↑2x během 6 týdnů relaps!!!)
- ✓ **Součást léčebného rozhodnutí** (agresivní léčba v případě asociace se závažným stavem)
- ✓ **Známka latentní/časné choroby** (ČRA – 38x větší riziko vývoje RA pokud anti CCP ↑)

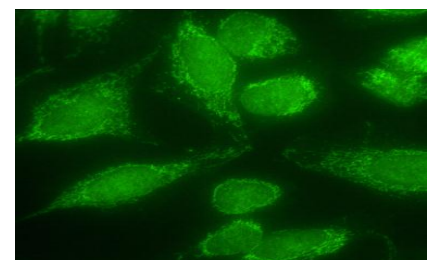
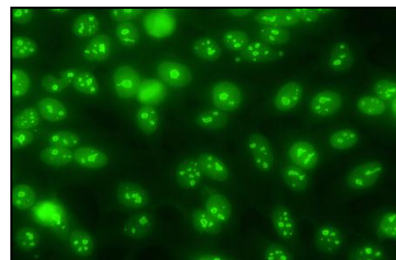
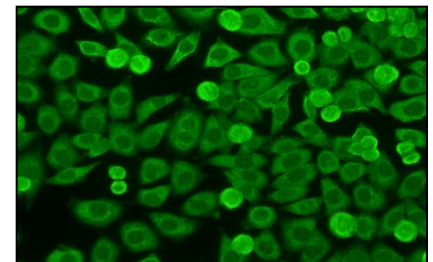
Antinukleární protilátky (ANA), ds DNA protilátky (dsDNA)

- ✓ NIF - metodou první volby pro stanovení ANA, ds DNA (ZLATÝ STANDARD)

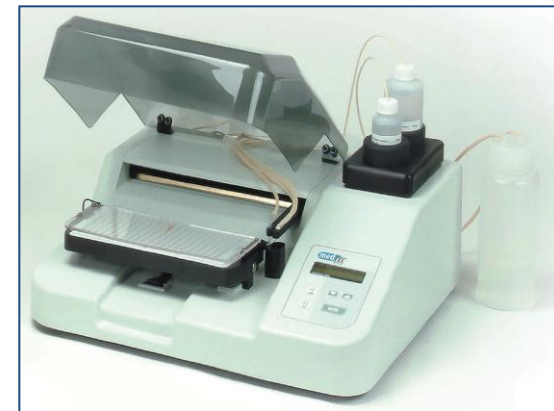


- ✓ Protilátky namířené proti orgánově nespecifickým buněčným antigenům, které jsou lokalizovány v buněčném jádře (DNA, RNA, další jaderné proteiny)
- ✓ Vyskytují se s vysokou četností u pacientů se systémovými onemocněními, ale i u pacientů s jinými onemocněními pojivové tkáně

- NIF - na sklíčku navázaný prvok *Crithidia luciliae*
- ředění sér 1:10 v PBS, v případě pozitivity se dále titrují
- pozitivita kinetoplastu



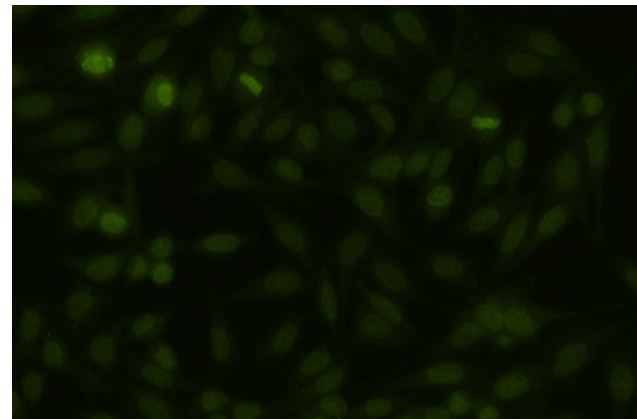
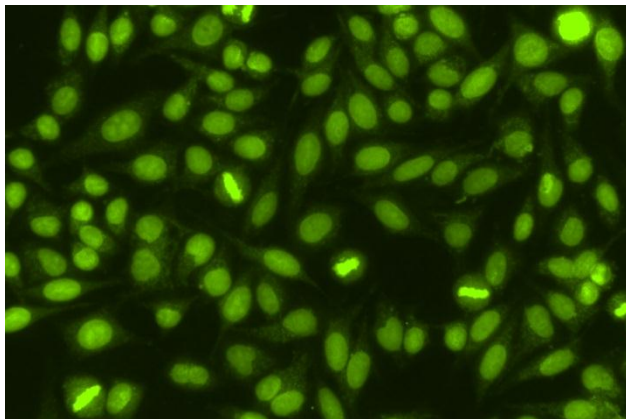
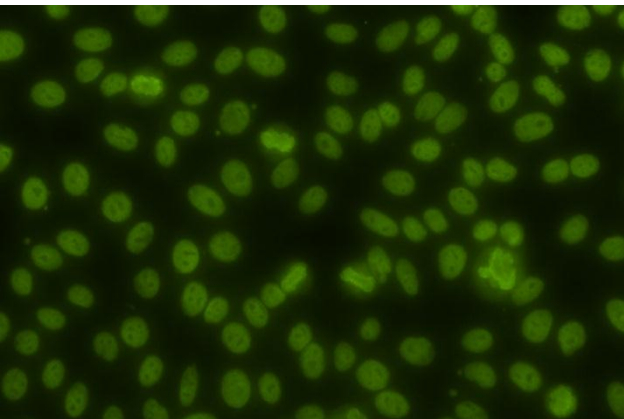
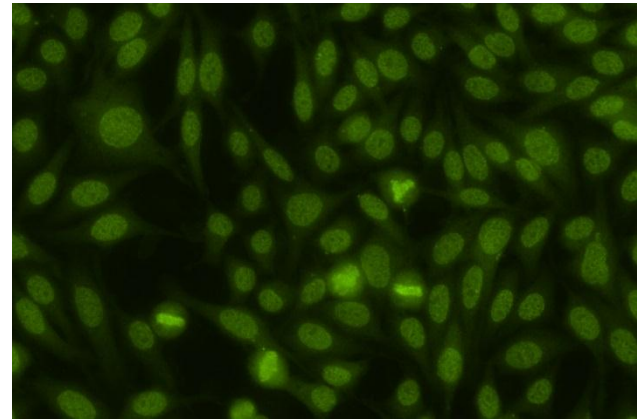
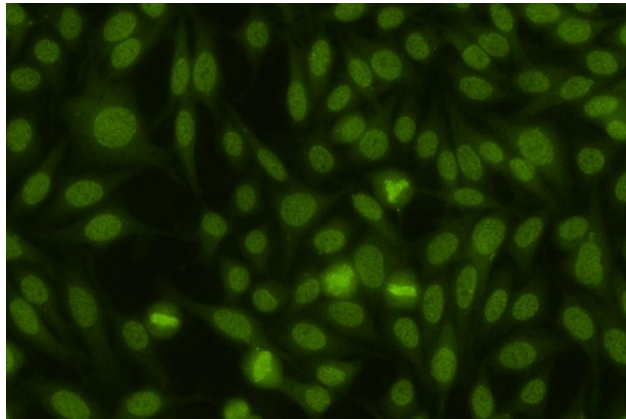
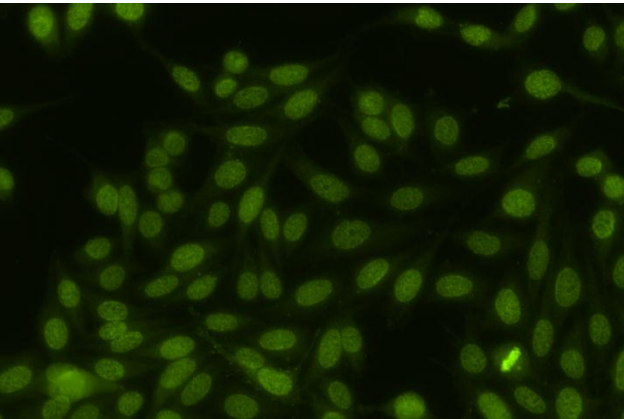
ANA - LIA



ANA-LIA

- SmB, SmD
 - RNP-70k, RNP-A, RNP-C
 - Ro52, Ro60
 - La
 - Cenp-B
 - **Sci-70**
 - Jo-1
 - P protein
 - histony
 - Nukleosomy
 - PCNA
 - M1
 - U1-snRNP
 - dsDNA
 - CENP B
 - Mi-2
 - Ku
- ***Doporučuje se pozitivní ANA dotestovávat dalšími metodami pro určení typu (ENA, protilátky proti dsDNA, nukleosomy, histony...)***
 - ***Výhody***
 - rychlá, přesná a spolehlivá detekce protilátek
 - jednoduchá interpretace výsledků stanovení (výsledky vztaženy k intenzitě zbarvení kontroly)
 - možnost počítačového vyhodnocení
 - ***Nevýhody***
 - detekce omezeného spektra vyšetřovaných protilátek

Co to je ?

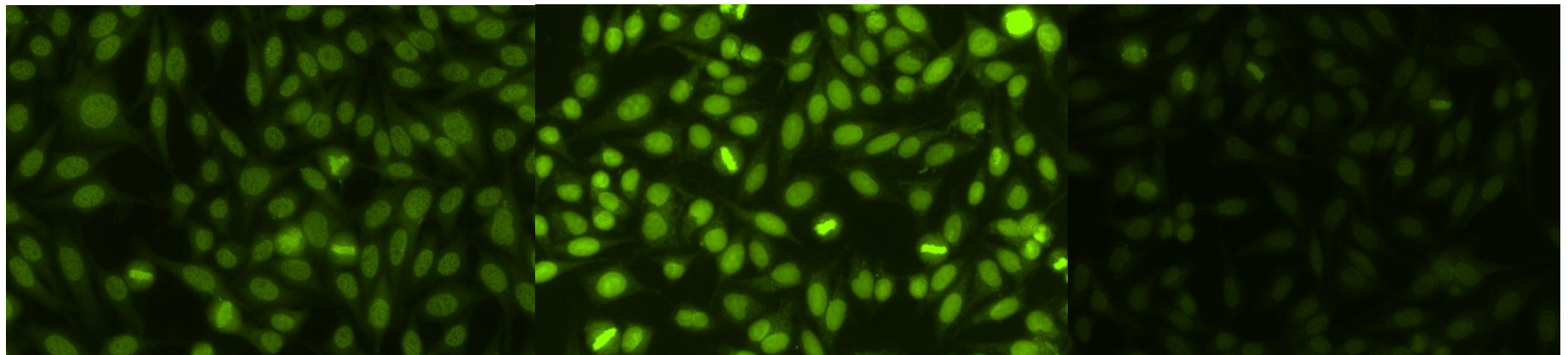


DFS70 / LEDGFp75

- ✓ Patří mezi fragmenty, které se odštěpují při buněčné smrti (*Wu X., Arthritis Rheum., 2001*)
- ✓ Je klíčovým buněčným kofaktorem pro intergraci HIV-1 do hostitelského chromatinu (*Maertens G., J Biol Chem., 2001*)
- ✓ Není pouze inhibitor apoptózy, ale spíše antagonist oxidací nekrotózy způsobené stresem – u karcinomu prostaty (*Basu A., Plos One., 2016*)

Protilátky proti DFS70

- ✓ Převážně IgG izotypu
- ✓ Na imunoblotu se váží na protein v oblasti 70-75 kDa
- ✓ Fluorescenční obraz:
 - ✓ **hustý, jemně zrnitý, typicky bez barvení jadérek a zároveň zvýšená intenzita fluorescence mitotických chromozomů**
 - ✓ **Může imitovat homogenní typ fluorescence, případně maskovat jiný fluorescenční obraz**



Protilátky proti DFS70

- ✓ **U pacientů s intersticiální cystitidou** (*Ochs RL, J Allergy Clin Immunol, 2000*)
- ✓ **U pacientů s atopickou dermatitidou** (*Ganapathy V, Arthritis & Rheumatism, 2004*)
- ✓ **U zdravých lidí a pacientů bez známek systémového onemocnění** (*Watanabe A, Arthritis & Rheumatism, 2004*)
- ✓ **U pacientů s rakovinou prostaty** (*Daniels T, Prostate, 2005*)
- ✓ **U dětských pacientů – juvenilní lokalizovaná sklerodermie, juvenilní dermatomyozitida, dětský SLE, difuzní kožní systémová skleróza, celiakie a juvenilní idiopatická artritida** (*Schmeling H, J Rheumatol, 2015*)
- ✓ **U pacientů s idiopatickými trombotickými chorobami nebo porodními komplikacemi** (*Marlet J, PLoS One., 2015*)

Protilátky proti DFS70

- ✓ **Objevuje se paralelně s dalšími ANA protilátkami (85 %) - SLE, SS, DM/PM a SSc**
- ✓ **Při dlouhodobém sledování čtyřiceti jedinců s anti-DFS70 se během 4letého sledování nerozvinulo systémové onemocnění** *(Schmeling H, J Rheumatol, 2015)*
- ✓ **V roce 2012 byl publikován algoritmus pro stanovení ANA s přihlédnutím k anti-DFS70** *(Mahler M, Fritzler MJ, Clin Dev Immunol, 2012)*

Algoritmus stanovení ANA

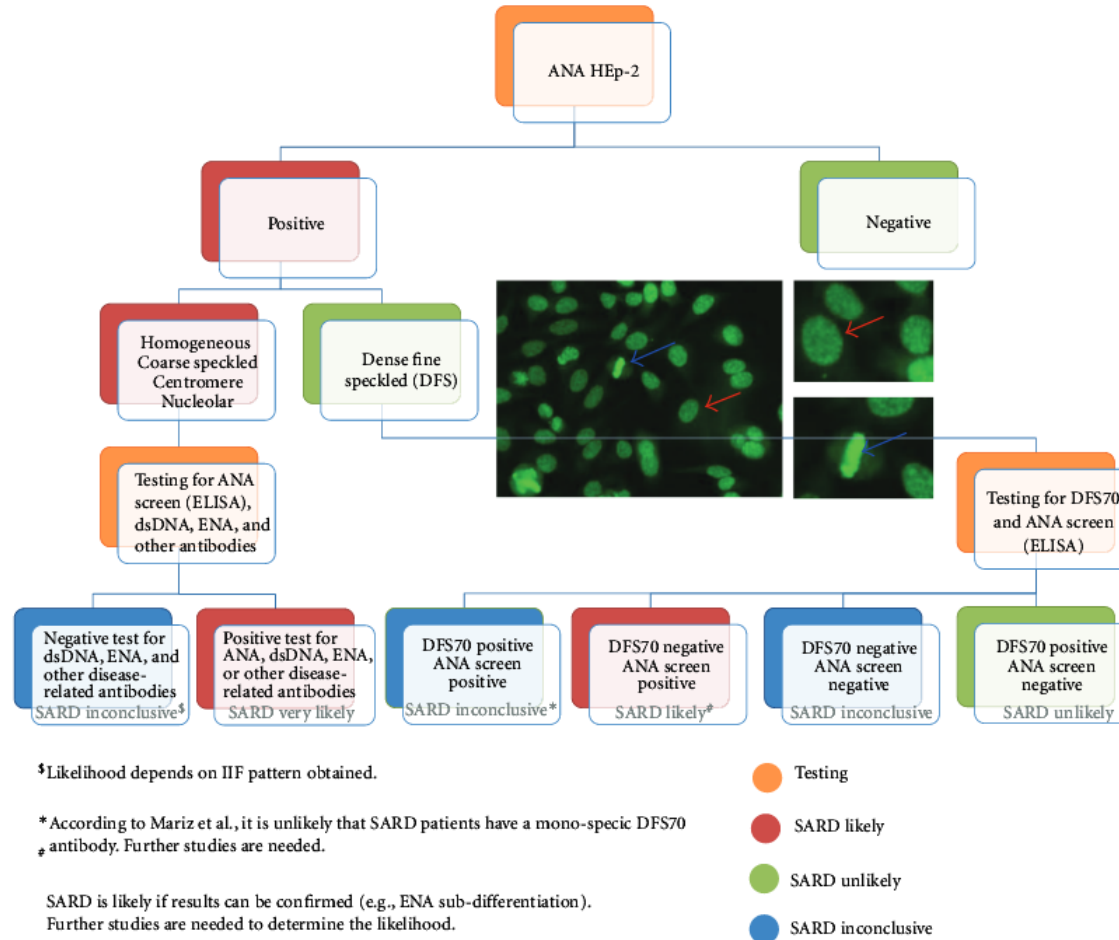
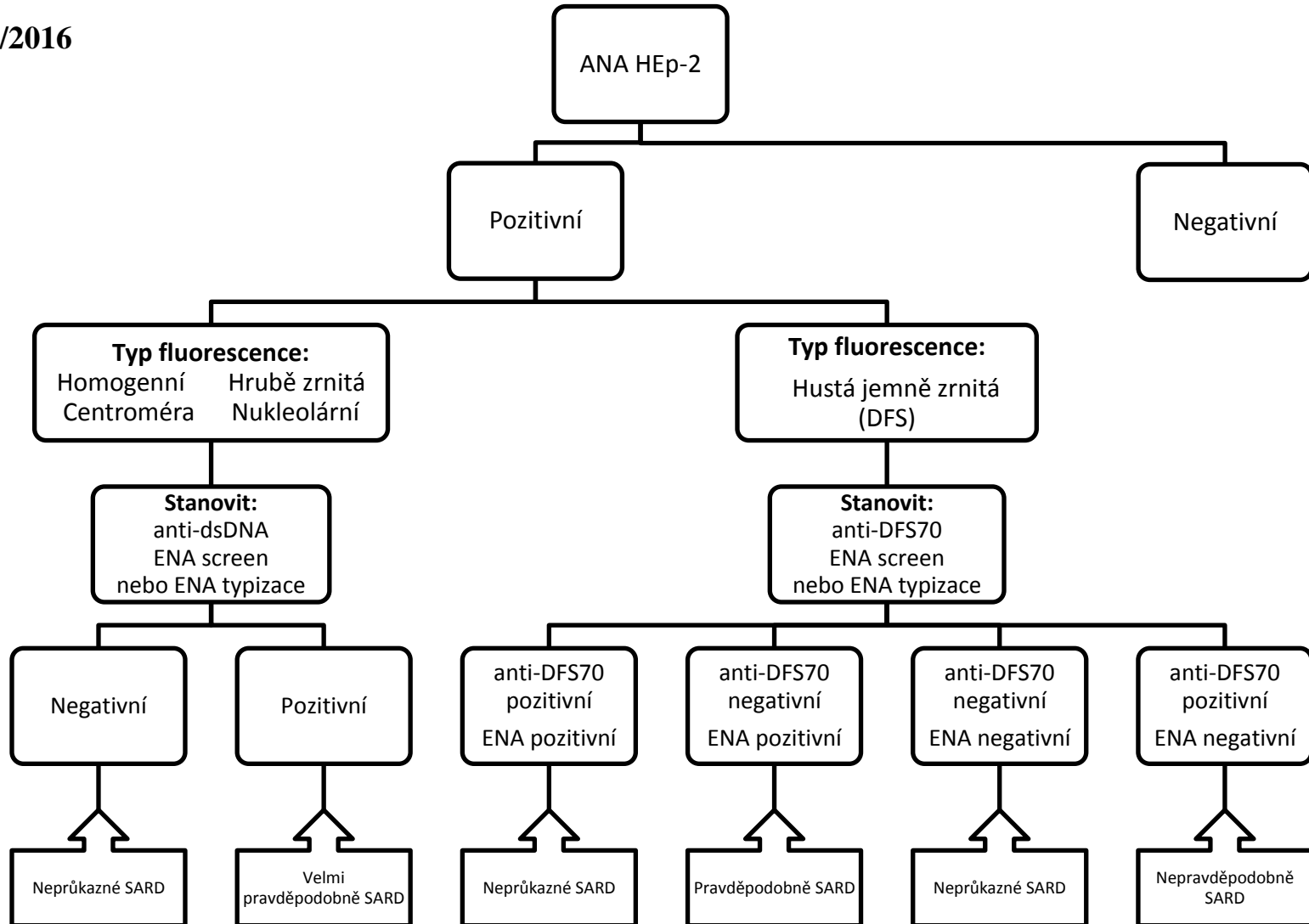


FIGURE 4: Characteristic staining pattern and suggested test algorithm considering anti-DFS70 antibodies. The characteristic dense fine speckled (DFS) staining pattern of interphase cells is indicated by the red arrow and the strong chromosome staining of metaphase cells by the blue arrow. Samples with a DFS pattern should be tested for anti-DFS70 antibodies by a confirmatory test and by ANA Screen ELISA (QUANTA Lite ANA Screen ELISA) containing various autoantigens. Patients with negative ANA Screen ELISA and positive DFS70 result have a low likelihood for having SARD. Patients with a positive ANA Screen ELISA either in combination with a positive or a negative DFS70 test result have an increase likelihood of having SARD.

Algoritmus stanovení ANA

Alergie 2/2016



Závěr/Metody pro stanovení anti-DFS70

✓ **Závěr:**

- ✓ *Izolovaný nález anti-DFS70 protilátek může být použit jako marker k vyloučení systémových zánětlivých onemocnění, toto je však nutné potvrdit v dalších studiích.*

✓ **Metody:**

✓ **Imunoblot – obsahující antigen DFS70**

(EUROLINE ANA Profile 3 plus DFS70, Euroimmun, Lübeck, Germany)

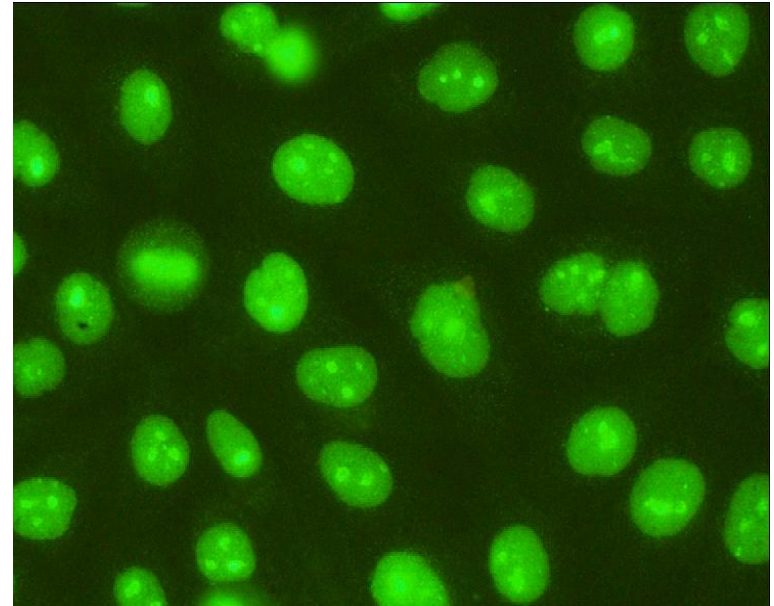
- ✓ nRNP/Sm, Sm, SS-A(native), Ro-52, SS-B, **Scl-70**, PM-Scl, Jo-1, CENP B, PCNA, dsDNA, nucleosomes, histones, rib.P-protein, AMA M2, **DFS70**

✓ **Chemiluminiscenční imunochemická metoda – Analyzátor BioFLASH**

(QUANTA Flash DFS70, Inova Diagnostics, San Diego, USA)

Falešná pozitivita Scl-70

- Sérum s **pozitivitou anti ds DNA Ab**
 - přítomny imunitní komplexy DNA – anti-ds DNA
 - **Scl-70** (topoizomeráza I)
 - ✓ váže se na DNA
 - ✓ vazba komplexu může způsobit pozitivitu v **anti Scl-70 testu**, aniž by **Ab byla přítomna**



Anti ds DNA protilátky X

Antinukleozomové protilátky - ELISA

- **Anti dsDNA Ab:**
- ✓ **ANA Hep-2 negativní, ELISA anti-dsDNA pozitivní**
 - Nespecifická vazba imunoglobulinu, falešně pozitivní výsledky
- ✓ **Anti-TNF terapie indukuje anti-dsDNA u 10-30% pacientů**
- ✓ **Vhodná k monitorování hladin!!!!**
- ✓ **Není vhodným diagnostickým testem !!!!!**



- **Anti nukleozomové Ab:**
- ✓ 95% specificita (SLE)
- ✓ Nekorelují s aktivitou orgánového postižení x anti dsDNA
- ✓ **↑senzitivita a prognostický význam pro SLE x anti dsDNA**
- ✓ U 20% pacientů s lupusem byly detekovány antinukleozomové protilátky bez přítomnosti anti-dsDNA a anti-histonových protilátek

Sanchez-Guerrero, J., Flores - Suárez, L. et al.: *Arthritis Rheum.*, 1995, 38 (10), 1485 – 91

Půtová, I., Dostál, C., Bečvář, R.: *Čes. Revmatologie*, 2006,

BIZZARO, N., VILLALTA, D., GIAVARINA, D., et al.. *Autoimmun Rev*, 2012, 12, p. 97–106

Detekce autoantilát

Dg.	Počet pacientů	aHST (%)	adsDNA (%)	aNCS (%)
SLE	70 /52	14/46	70/69,2	93/75
SCL	20/39	0/5,1	0/8	5/17,9
MCTD	50	12	30	70
SS	50/15	0/0	4/4	4/4

Sanchez-Guerrero, J., Flores - Suárez, L. et al.: Arthritis Rheum., 1995, 38 (10), 1485 - 91
Půtová, I., Dostál, C., Bečvář, R.: Čes. Revmatologie,



Revmatoidní artritida



2009 ACR/EULAR kriteria

Základní

RA

Povinné kritérium:

- Synovitida detekovaná expertem alespoň v 1 kloubu,
- s vyloučením DIP, a prvních MTP a CMC,
- ale zahrnující první IP,
- která není lépe vysvětlena jinou diagnózou

Netřeba relativní když:

Eroze na RTG popsaná expertem jako typická pro RA jak z hlediska vzhledu tak umístění

Klasifikováno jako RA, pokud je skóre ≥ 6 .

Relativní

Klouby	BODY
1 velký	0
2-10 velkých	1
1-3 malých (+/- postižení velkých)	2
4-10 malých (+/- postižení velkých)	3
>10 (alespoň 1 malý kloub)	5
Autoprotilátky	
RF i ACPA negativní	0
RF nebo ACPA slabě pozitivní	2
RF nebo ACPA vysoce pozitivní	3
Trvání	
< 6 týdnů	0
≥ 6 týdnů	1
Reaktanty akutní fáze	
CRP a FW normální	0
CRP nebo FW zvýšené	1
Celkem	10

Anti-MCV IgG - ELISA

- **ELISA**

- semikvantitativní stanovení hladiny protilátek nebo kvantitativní stanovení protilátek v jednotkách U/ml

- **Laboratorní interpretace:**

- Cut-off > 20 U/ml



- Vyšetřujeme: anti MCV ELISA - Orgentec, Germany, (ASCAMED, ČR)

- **Protilátky proti citrulinovanému vimentinu**

- ✓ vykazují silný vztah k aktivitě a závažnosti onemocnění a úspěšnosti léčby

- **Výskyt:**

- ✓ u 10 % anti-CCP negativních a až u 30 % IgM-RF negativních pacientů s revmatoidní artritidou

- **Kombinovaná pozitivita obou testů předurčuje vývoj revmatoidní artritidy téměř ve 100 %.**

Bang, H., Egerer, K. et al.; *Arthritis Rheum.* 2007; 56: 2503- 11

van Venrooij, W.J., Zendman, A.J., Pruijn, G.J.: *Autoimmun Rev.* 2006; 6: 37-41.

Protilátky proti karbamylovaným proteinům – anti -CarP

- **Anti CarP**
- **Laboratorní interpretace:**

Rozmezí detekce:

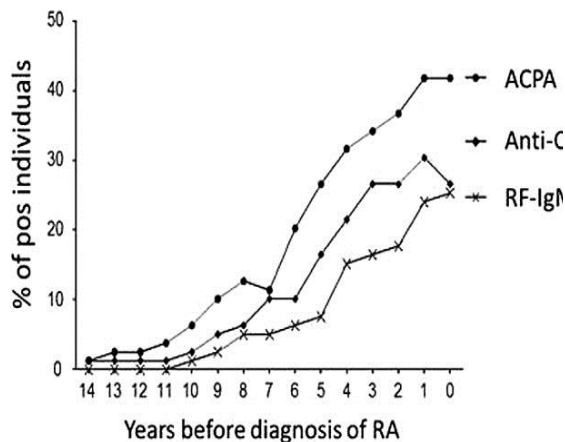
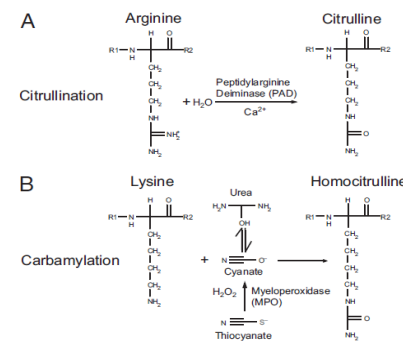
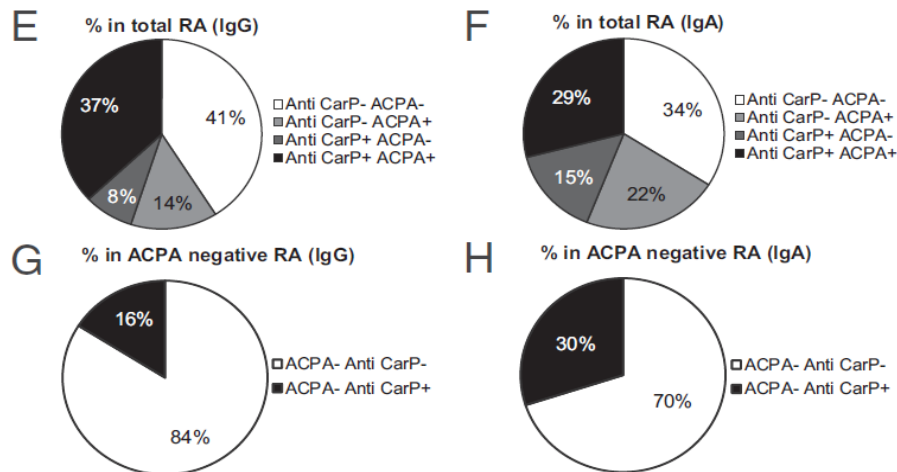
✓ 1,56-100 U/ml

Senzitivita testu:

✓ 0,5U/ml

K dispozici komerční dg. souprava:

Human anti-carbamylated Protein Antibody ELISA Kit -Sincere Biotech, China (Labmark, ČR)



Calprotectin v séru - ELISA

- ***Calprotectin:***

- ✓ Ca vazebný protein uvolňovaný především z neutrofilů
- ✓ Spolehlivý, citlivý a specifický marker zánětu v porovnání s CRP
- ✓ nový marker aktivity onemocnění RA
- ✓ hladiny v séru vykazují silný vztah k aktivitě onemocnění a úspěšnosti léčby adalimumabem

Laboratorní interpretace:

Normální rozmezí:

0,79-2,7 µg/ml

Senolt L: Int J Clin Rheumatol. 2012;7:127–9.

Hurnakova, J., Zavada, J et al.: Arthritis Res Ther. 2015 Sep 15;17:252.

Hammer HB, Fagerhol MK et al: Arthritis Res Ther. 2011;13:R178

- Vyšetřujeme: Buhlmann, xxx (BioVendor, ČR)

Laboratorní diagnostika DM/PM



Myositis LIA x Myositis WBI

- *Spektrum vyšetřovaných antigenů:*

- *Mi-2*
- *PM-Scl*
- *Ku*
- *U1-snRNP*
- *Jo-1*
- *Pl-7*
- *Pl-12*

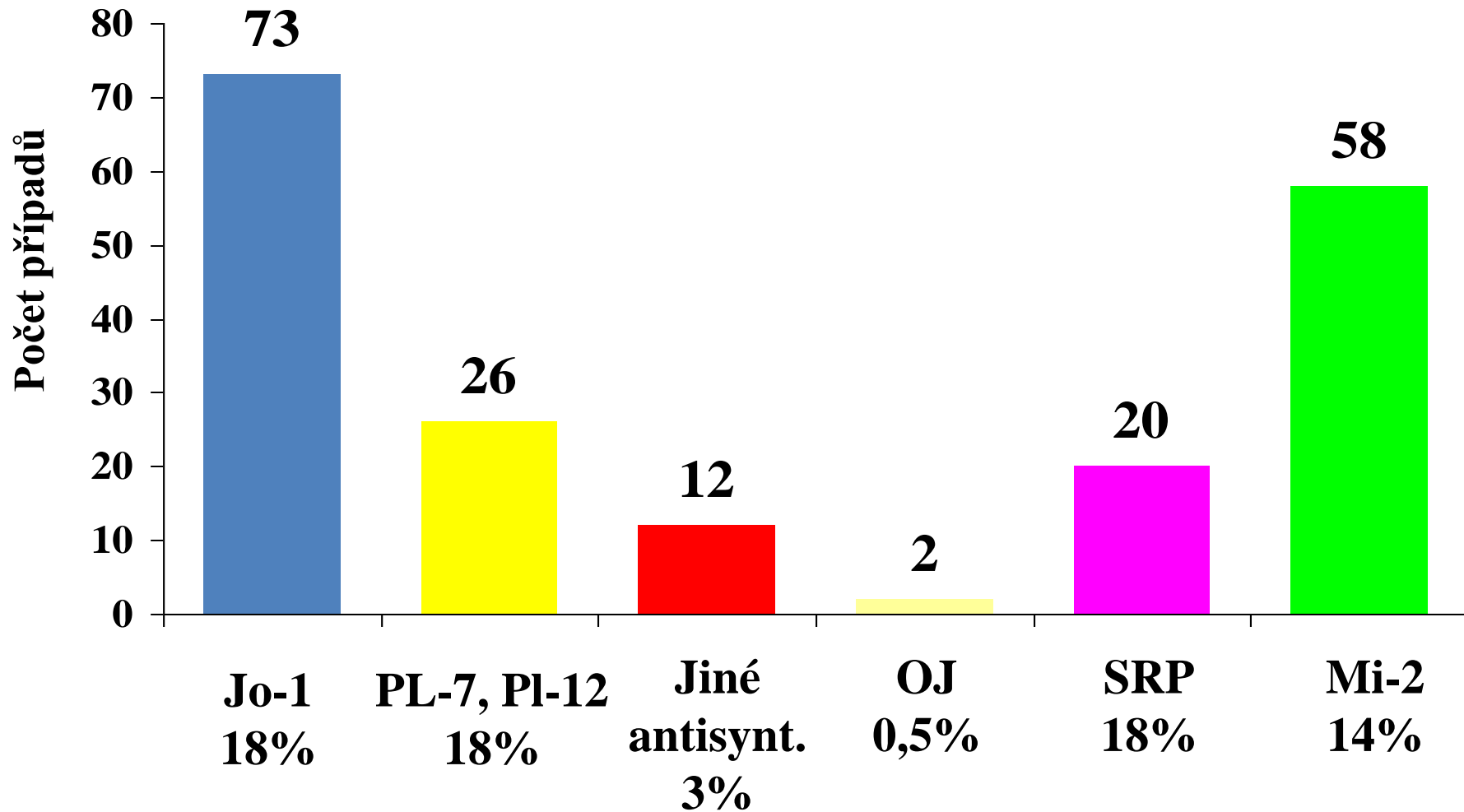
Vyšetřujeme: M-LIA, IMTEC (LABMARK, ČR)

- *Spektrum vyšetřovaných antigenů:*

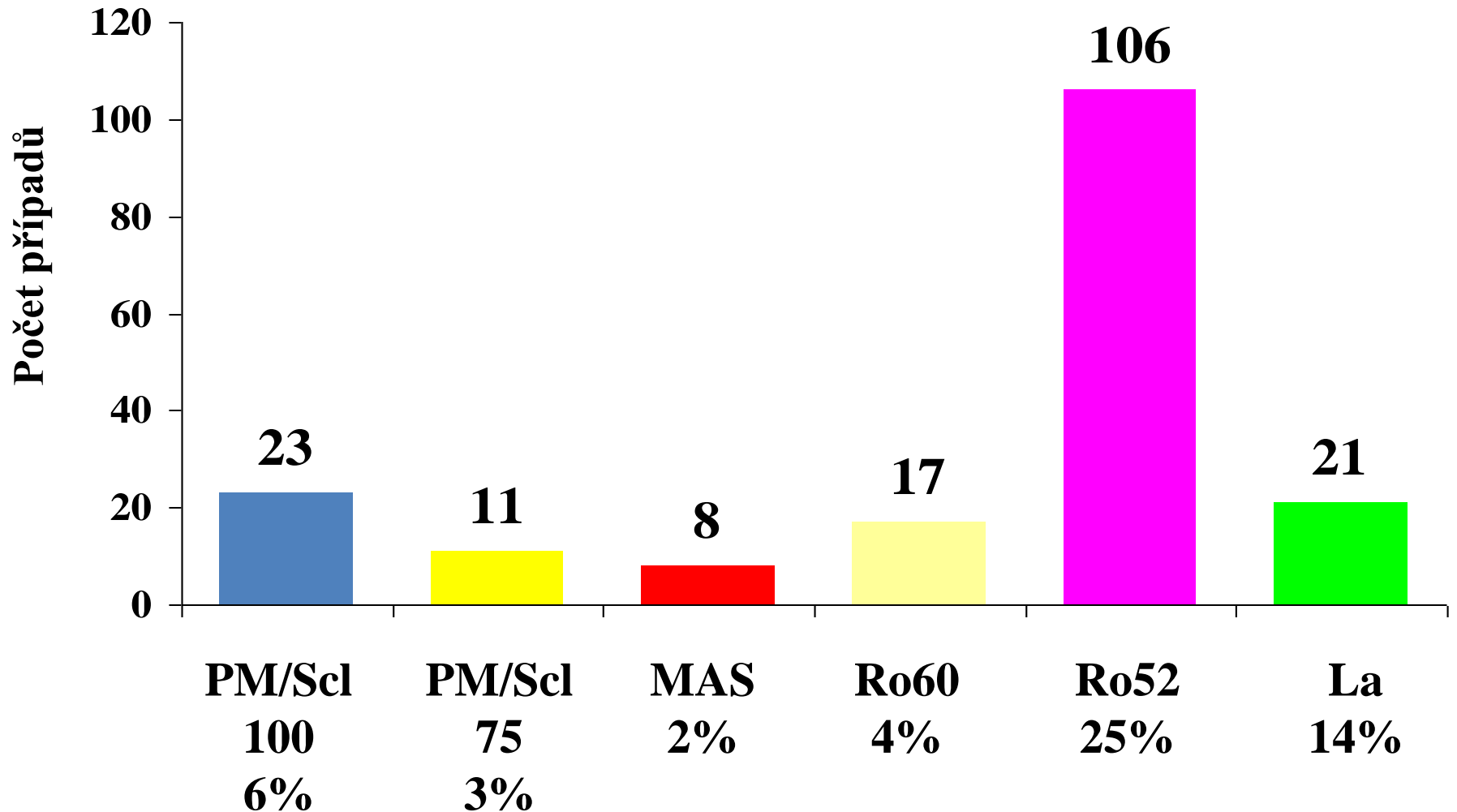
- *Mi-2^α*
- *Mi-2β*
- *TIF1γ*
- *MDAS*
- *NXP2*
- *SAE1*
- *Ku*
- *PM Scl 75*
- *PM Scl 100*
- *Jo-1*
- *SRP*
- *Pl-7*
- *PL-12*
- *EJ*
- *OJ*
- *Ro-52*

Vyšetřujeme: M-WBI, Euroimmun, Germany Dynex, ČR)

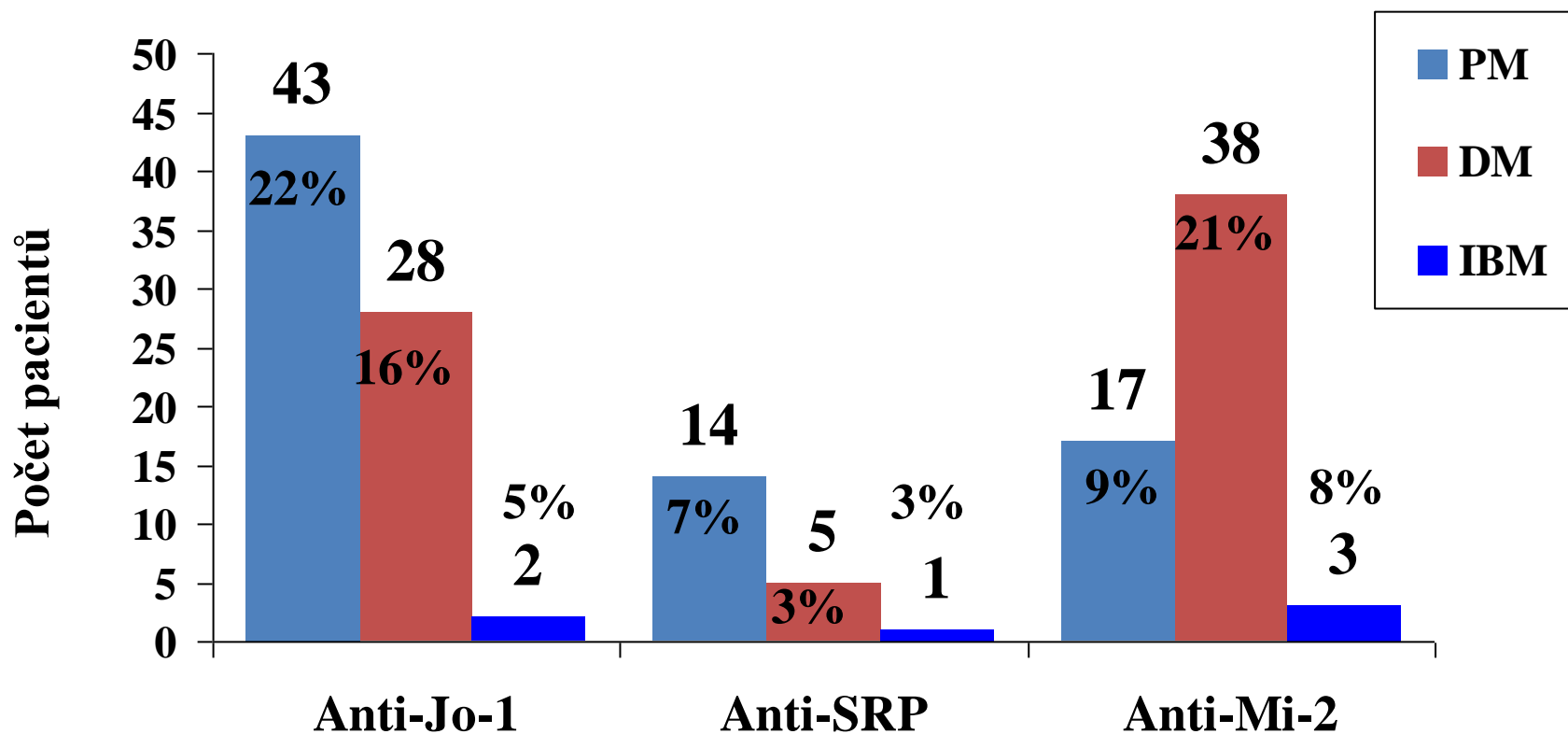
Pro myozitidu specifické autoprotiilátky



S myozitidou asociované autoprotiilátky



Anti-Jo-1, anti-SRP a anti-Mi-2 u PM a DM



Anti HMGCR (anti -200/100kDa) - ELISA

- **3-hydroxy-3-metylglutaryl koenzym A reduktáza**
 - ✓ u 5% pacientů s myositidou
 - ✓ silná asociace s **imunitně zprostředkovanou nekrotizující myopatií (IMNM)** navozenou předchozím užíváním statinů (63%)
 - ✓ Statiny blokují aktivitu HMGCR, vedou ke zvýšení exprese proteinu ve svalech
 - ✓ Vysazení hypolipidemické léčby obvykle nevede k úpravě klinického stavu a bývá nutná imunosupresivní léčba

- **ELISA**
- **Laboratorní interpretace:**
 - **Cut-off - $\geq 20,0$ U/ml**



- *Vyšetřujeme: anti HMGCR – INOVA (Werfen Czech, ČR)*
Werner, J.L., Christopher – Stine, L. et al. Arthritis Rheum 2012, Dec;64(12):4087-93
Ramanathan, S., Langguth. et al.:Neuro Immunol Neuroinflamm. 2015 Apr 2 ;2(3):e96.

Anti-cN-1A

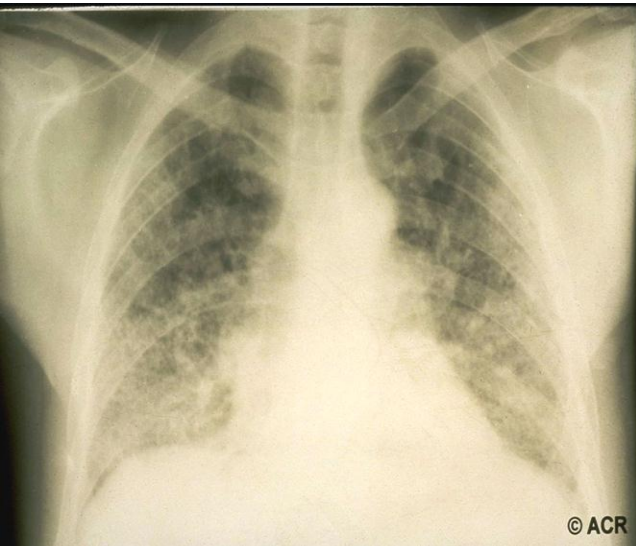
- **cytosolic 5'-nucleotidase 1A**
- ✓ U nemocných s **IBM**
 - ✓ Považováno spíše za degenerativní onemocnění
 - ✓ Nyní se ukazuje, že část má zřejmě autoimunitní podklad
- **Cíl:**
- ✓ Odlišení **IBM** od jiných svalových postižení:
 - ✓ PM, DM, nekrotizující myopatie, svalová dystrofie, myasthenia gravis

- ✓ Redukce počtu svalových biopsií/osobu
 - ✓ *Relativně vysoká prevalence v sérech pacientů se SS a SLE*
- **ELISA**
- **Laboratorní interpretace:**
 - **<1,0 – negativní (index)**
 - **≥1,0 - pozitivní (index)**



Herbert MK et al.: Curr Opin Rheumatol. 2015 Nov;27(6):595-600
Goyal NA et al.: J Neurol Neurosurg Psychiatry (E pub) 2015
Pluk H et al.: Ann Neurol. 2013. 73: 397-407
Laman HB et al.: Ann Neurol.2013. 73: 408-418
Herbert MK et al.: Ann Rheum Dis. 2016 Apr;75(4):696-701

Laboratorní diagnostika SCL



Scleroderma blot

- *Spektrum vyšetřovaných antigenů:*

Lab. interpretace: pozitivní/negativní

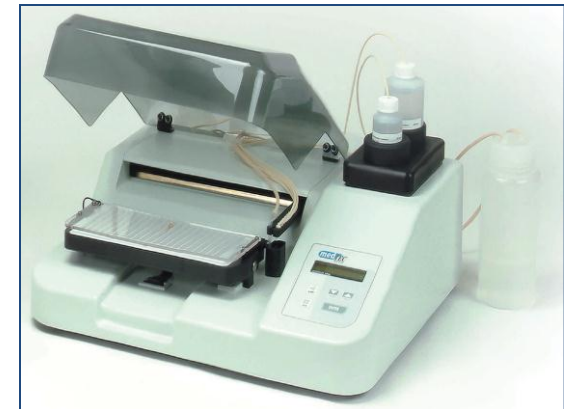
- **Scl-70**
- **CENP-A**
- **CENP-B**
- **RP 11**
- **RP 155**
- **Fibrilarin**
- **NOR-90**
- **Th/To**
- **PMScI 75,**
- **PM-ScI 100**
- **Ku**
- **PDGFR**
- **Ro 52**
- Vyšetřujeme: Scleroderma blot: EUROIMMUN, Germany (Dynex,ČR)

EUROLineScan - vyhodnocení

Strana 1 1

Protokol:	DEMO_DL1532-G	Datum:	15.2.2010
Operator:	euroimmun	Tisk:	27.4.2016
Patient ID	EUROLINE / Alergy / EUROASSAY		Výsledek
Lab číslo	Zkratka	Výsledek	Zkratka
Strž číslo	Interžida	Výsledek	Interžida
Bouřava	Char		Char
Test			
Lot			

	SC	Ro52	PM100	PM75	Th/To	NOR90	Fib	RP155	RP11	CB	CA	ScI70
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SSc profile	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0											
def_SSc	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0											
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SSc profile	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0											
def_SSc	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0											
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SSc profile	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0											
def_SSc	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0											
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SSc profile	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0											
def_SSc	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0											
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SSc profile	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0											
def_SSc	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0											
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SSc profile	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0											
def_SSc	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0											



RNA polymeráza III - ELISA

- **ELISA**
- **Laboratorní interpretace:**
 - **Cut-off-27,9 U/ml**



Vyšetřujeme: RNA polymerase III,
MBL, Japonsko (LABMARK, ČR)

RNA polym. III

- ✓ protilátky proti nukleolárním antigenům
- ✓ Izolovaná protilátková pozitivita (samostatná sérologická skupina)
- ✓ pojí se s rozvojem renální krize
- ✓ zvýšený výskyt postižení kůže
- ✓ významná asociace s rozvojem malignit
- ✓ *Přítomnost těchto protilátek v časně fázi onemocnění by tak měla vést k podezření na paraneoplastický fenomén a provedení onkologického screeningu.*

MOINZADEH, P., FONSECA, C. et al.: *Arthritis Res Ther*, 2014, 16, R53

TAKADA, D., HOSHINO, J. et al.: *Mod Rheumatol*. 2016 Mar 4:1-4

SOBANSKÝ, V., DAUCHET, L. et al.: *Arthritis Rheumatol*. 2014

Feb;66(2):407-17.

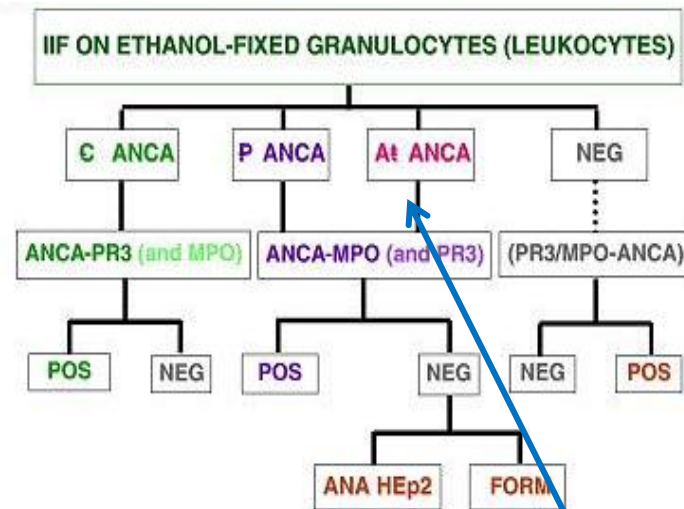
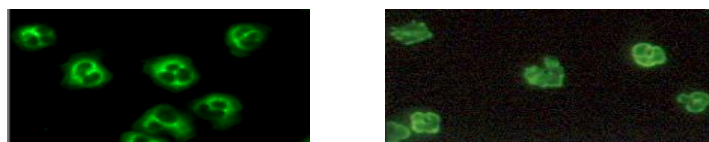
ANCA protilátky - NIF

Vyšetřujeme: NIF–INOVA (Werfen Czech)

- **Nepřímá IF** - protilátky proti cytoplasmě neutrofilních leukocytů
 - na sklíčku navázané neutrofilie (a eosinofily) fixované ethanolem (odlišení pANCA a cANCA, ale poz. ANA) nebo formalinem (neg. ANA)
- ředění sér 1:20
- odlišení 2 typy fluorescence + atyp. ANCA
 - **C ANCA (PR3)**
 - **P ANCA (MPO)**

SINICO, RA., RADICE, A.: *Clin Exp Rheumatol*, 2014, 32(Suppl. 82), S112–S117.

Postupy pro vyšetřování ANCA



**NIF : Senzitivita 80-90% , Specificita ≤80% , +
ELISA: Specificita až ≥98%**

LOCHMAN, I.: *Alergie č.2, str. 147-148, 2012 (CSAKI - SLI)*

ANCA protilátky - ELISA

ANCA ELISA

- **c ANCA**
 - **Proteináza 3 (PR3)**
- **p ANCA**
 - **Myeloperoxidáza (MPO)**
- **Laboratorní interpretace:**
 - **>5,0 U/ml – pozitivní**
- **Pozor!!!!!!**
 - ✓ *V případě podezření na granulomatózu s polyangiitidou se doporučuje provést oba testy.*
 - ✓ *Na korelaci hladiny c-ANCA s aktivitou nemoci nelze spoléhat.*
 - ✓ *Existuje limitovaná forma nemoci (přibližně 30 %), která nevykazuje pozitivitu ANCA protilátek.*
 - ✓ *Přibližně v 10 % se u granulomatózy s polyangiitidou vyskytuje také p-ANCA, která je ale častěji přítomna u mikroskopické polyangiitidy (60%).*

Vyšetřujeme: ANCA ELISA - Orgentec, Germany, (ASCAMED, ČR)

- ✓ *Existují i atypické formy ANCA, které nejsou namířeny proti PR3, ani proti MPO. Mohou se vyskytovat u řady systémových revmatických onemocnění nebo idiopatických střevních zánětů, ale neznamenaají přítomnost primární vaskulitidy.*

• ANCA combi ELISA

• Spektrum vyšetřovaných antigenů:

- ✓ *protein zvyšující baktericidii a permeabilitu (BPI)*
- ✓ *laktoferin*
- ✓ *elastáza,*
- ✓ *cathepsin G,*
- ✓ *lysozym*

• Laboratorní interpretace:

- **>10,0 U/ml – pozitivní**

SINICO, RA., RADICE, A.: *Clin Exp Rheumatol*, 2014, 32(Suppl. 82), S112–S117.

IgG4 - nefelometrie

Laboratorní interpretace:

Normální rozmezí:

- 62-1127 mg/ml
✓ nad 18 let



Hybášková J. et al: Otorinolaryng. a Foniat. /Prague/, 64, 2015, No. 3, pp. 163-167.

Brenn T, Calonje E et al: Am J Dermatopathol. 2002;24:385-91

Kuo TT, Chen TC, Lee LY, Lu PH.. J Cutan Pathol. 2009 Oct;36(10):1069-73

- *Vyšetřujeme: Binding Site*

**IgG 4 asociovaná nemoc:
IgG4-RD**

- ✓ systémové zánětlivé a fibrotizující onemocnění postihující celou řadu orgánových systémů
 - ↑ hladina IgG4 v séru
- ✓ histopatologické změny - storiformní (tzv. rohožkovitá) fibróza, lymfoplazmocyární infiltrace a obliterující vaskulitida
- ✓ řada dříve popisovaných chorob je nejspíše orgánovou manifestací **IgG4-RD**.

Závěr: Interpretace imunologických testů



- Indikace podle klinického obrazu a dalších nálezů u konkrétního pacienta
- Průkaz pozitivní autoprotiátky k dg. nikdy nestačí
- Autoprotiátky se tvoří u řady systémových revmatických onemocnění, přičemž jejich specifita je různorodá



- **Některé autoprotiátky** se mohou vyskytovat u **více revmatických onemocnění**, ale jejich přítomnost může být odhalena i u jiných chorobných stavů
- Jedna autoprotiátka může být analyzována větším množstvím laboratorních metodik (**možná limitace používaných metodik**)
- Případná pozitivita protiátky by měla být potvrzena nejméně 2 způsoby

Jednotlivé testy se mezi různými laboratořemi mohou lišit !!!!!

Poděkování

- Revmatologický ústav, Praha
OKI, Jiří Vencovský,
Heřman Mann, Olga Kryštůfková, Kateřina Jarošová



- Ústav patologie, 2.LF UK, Praha
Josef Zámečník



- Rheumatology Dept, Bath
Zoe Betteridge
Neil McHugh
Harsha Gunawardena



- Kennedy Institute of Rheumatology, London
Peter Charles

- Karolinska Institutet, Stockholm
Ingrid Lundberg



- Manchester, UK
Hector Chinoy
Bob Cooper



European
Myositis
Network



VZ MZ ČR 00023728

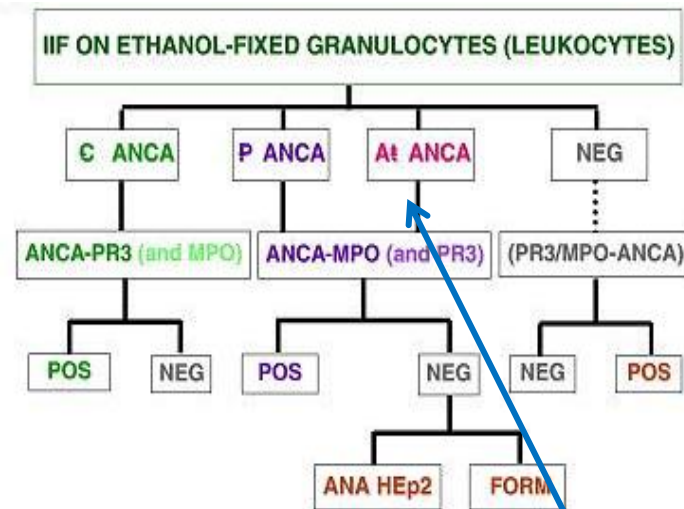
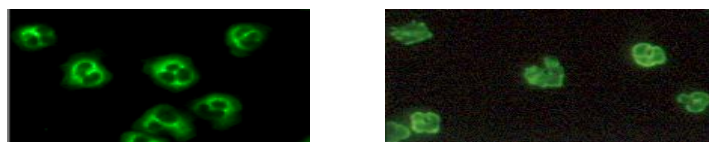
ANCA protilátky - NIF

Vyšetřujeme: NIF–INOVA (Werfen Czech)

- **Nepřímá IF** - protilátky proti cytoplasmě neutrofilních leukocytů
 - na sklíčku navázané neutrofilie (a eosinofily) fixované ethanolem (odlišení pANCA a cANCA, ale poz. ANA) nebo formalinem (neg. ANA)
- ředění sér 1:20
- odlišení 2 typy fluorescence + atyp. ANCA
 - **C ANCA (PR3)**
 - **P ANCA (MPO)**

SINICO, RA., RADICE, A.: *Clin Exp Rheumatol*, 2014, 32(Suppl. 82), S112–S117.

Postupy pro vyšetřování ANCA



**NIF : Senzitivita 80-90% , Specificita ≤80% , +
ELISA: Specificita až ≥98%**

LOCHMAN, I.: *Alergie č.2, str. 147-148, 2012 (CSAKI - SLI)*

ANCA protilátky - ELISA

ANCA ELISA

- **c ANCA**
 - **Proteináza 3 (PR3)**
- **p ANCA**
 - **Myeloperoxidáza (MPO)**
- **Laboratorní interpretace:**
 - **>5,0 U/ml – pozitivní**
- **Pozor!!!!!!**
 - ✓ *V případě podezření na granulomatózu s polyangiitidou se doporučuje provést oba testy.*
 - ✓ *Na korelaci hladiny c-ANCA s aktivitou nemoci nelze spoléhat.*
 - ✓ *Existuje limitovaná forma nemoci (přibližně 30 %), která nevykazuje pozitivitu ANCA protilátek.*
 - ✓ *Přibližně v 10 % se u granulomatózy s polyangiitidou vyskytuje také p-ANCA, která je ale častěji přítomna u mikroskopické polyangiitidy (60%).*

Vyšetřujeme: ANCA ELISA - Orgentec, Germany, (ASCAMED, ČR)

- ✓ *Existují i atypické formy ANCA, které nejsou namířeny proti PR3, ani proti MPO. Mohou se vyskytovat u řady systémových revmatických onemocnění nebo idiopatických střevních zánětů, ale neznamenaají přítomnost primární vaskulitidy.*

• ANCA combi ELISA

• Spektrum vyšetřovaných antigenů:

- ✓ *protein zvyšující baktericidii a permeabilitu (BPI)*
- ✓ *laktoferin*
- ✓ *elastáza,*
- ✓ *cathepsin G,*
- ✓ *lysozym*

• Laboratorní interpretace:

- **>10,0 U/ml – pozitivní**

SINICO, RA., RADICE, A.: *Clin Exp Rheumatol*, 2014, 32(Suppl. 82), S112–S117.

Závěr: Interpretace imunologických testů



- Indikace podle klinického obrazu a dalších nálezů u konkrétního pacienta
- Průkaz pozitivní autoprotiilátky k dg. nikdy nestačí
- Autoprotiilátky se tvoří u řady systémových revmatických onemocnění, přičemž jejich specifita je různorodá



- **Některé autoprotiilátky** se mohou vyskytovat u **více revmatických onemocnění**, ale jejich přítomnost může být odhalena i u jiných chorobných stavů
- Jedna autoprotiilátka může být analyzována větším množstvím laboratorních metodik (**možná limitace používaných metodik**)
- Případná pozitivita protiilátky by měla být potvrzena nejméně 2 způsoby

Jednotlivé testy se mezi různými laboratořemi mohou lišit !!!!!

Myositis specifické autoantilátky (MSA)

Anti-ARS (aminoacyl-tRNA synthetases)

– Anti-Jo-1	Histidyl-tRNA synthetase	15-20%
– Anti-PL-7	Threonyl-tRNA synthetase	5-10%
– Antti-PL-12	Alanyl-tRNA synthetase	< 5%
– Anti-EJ	Glycyl-tRNA synthetase	5-10%
– Anti-OJ	Isoleucyl-tRNA synthetase	< 5%
– Anti-KS	Asparaginyln-tRNA synthetase	< 5%
– Anti-Zo	Phenylalanyl-tRNA synthetase	< 1%
– Anti-YRS	Tyrosyl-tRNA synthetase	< 1%

Anti-SRP

– Anti-7SL RNA	Signal recognition particle 6 peptides	5-10% (5-50%)
----------------	---	------------------

Anti-Mi-2

218/240 kDa helicase family proteins	5-10%
---	-------

Anti-CADM-140

Melanoma-differentiation cytoplasmic 140 kDa protein	(50%)
--	-------

Anti-p155(/140)

Transcriptional intermediary factor 1γ	(20%)
---	-------

Anti-MJ

Nuclear matrix protein NXP-2	<5%
-------------------------------------	-----

Anti-hPMS1

DNA repair mismatch enzyme	<5%
-----------------------------------	-----

Protilátky asociované s myozitidou (MAA)

Anti-PM-Scl	Komplex 11-16 proteinů v jadérku	8-10%
Anti-U1RNP	Malé jaderné RNP	10%
Anti-Ku	regulační podjednotka DNA-PK 70/80 kDa	(20-30%)
Anti-Ro (52, 60)	hY RNA + peptidy	10-30%
Anti-56 kD	RNP protein	(87%)
Anti-Fer	Prodlužovací faktor α	< 1%
anti-KJ	Translační faktor 120 kDa	< 1%
Anti-MAS	protein vázající tRNA ^{Ser}	(myalgie 50%)
Anti-proteasome (α C9)	20 S proteasom α	62%

Anti-aminoacyl-tRNA syntetázy (ARS)

- katalyzují vazbu vždy jedné aminokyseliny na tRNA

– Anti-Jo-1	Histidyl-tRNA syntetáza	20-25%
– Anti-PL-7	Threonyl-tRNA syntetáza	< 5%
– Anti-PL-12	Alanyl-tRNA syntetáza	< 5%
– Anti-EJ	Glycyl-tRNA syntetáza	< 5%
– Anti-OJ	Isoleucyl-tRNA syntetáza	< 5%
– Anti-KS (AsnRS)	Asparaginyln-tRNA syntetáza	vzácné
– Anti-Zo	Phenylalanyl-tRNA syntetáza	vzácné
– Anti-YRS (Ha)	Tyrosyl-tRNA syntetáza	vzácné