



National University
of Athens
Greece

Το Ανοσολογικό Εργαστήριο στα Συστηματικά Αυτοάνοσα Νοσήματα: δυνατότητες και περιορισμοί

Αθανάσιος Γ. Τζιούφας



Dept. of
Pathophysiology
School of Medicine

ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

- 5-8% στο γενικό πληθυσμό
- 2^η αιτία εισαγωγών σε παθολογικές κλινικές
- 3^η αιτία νοσηρότητας/θνητότητας
- Οργανοειδικά
- Συστηματικά

ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑ

- Αυτοδραστικά Τ-λεμφοκύτταρα
 - Αυτοδραστικά Β-λεμφοκύτταρα (autoantibodies)
- = Αυτοάνοση απόκριση

+

Βλάβη ιστού

= Αυτοάνοση νόσος

Φυσικά και παθογενετικά αυτοαντισώματα

- Υγιείς
- Χαμηλός τίτλος
- IgM
- Μικρή συγγένεια στο αυτοαντιγόνο
- Πολυδραστικότητα
- Κωδικοποίηση από το σπερματικό DNA
- Υψηλός τίτλος
- IgG
- Μεγάλη συγγένεια στο αυτοαντιγόνο
- Παρόντα στη βλάβη ιστού
- Παραγωγή νόσου σε πειραματικά πρότυπα
- Ελάττωση τίτλου στην ύφεση της νόσου

Αυτοαντισώματα στην κλινική πράξη

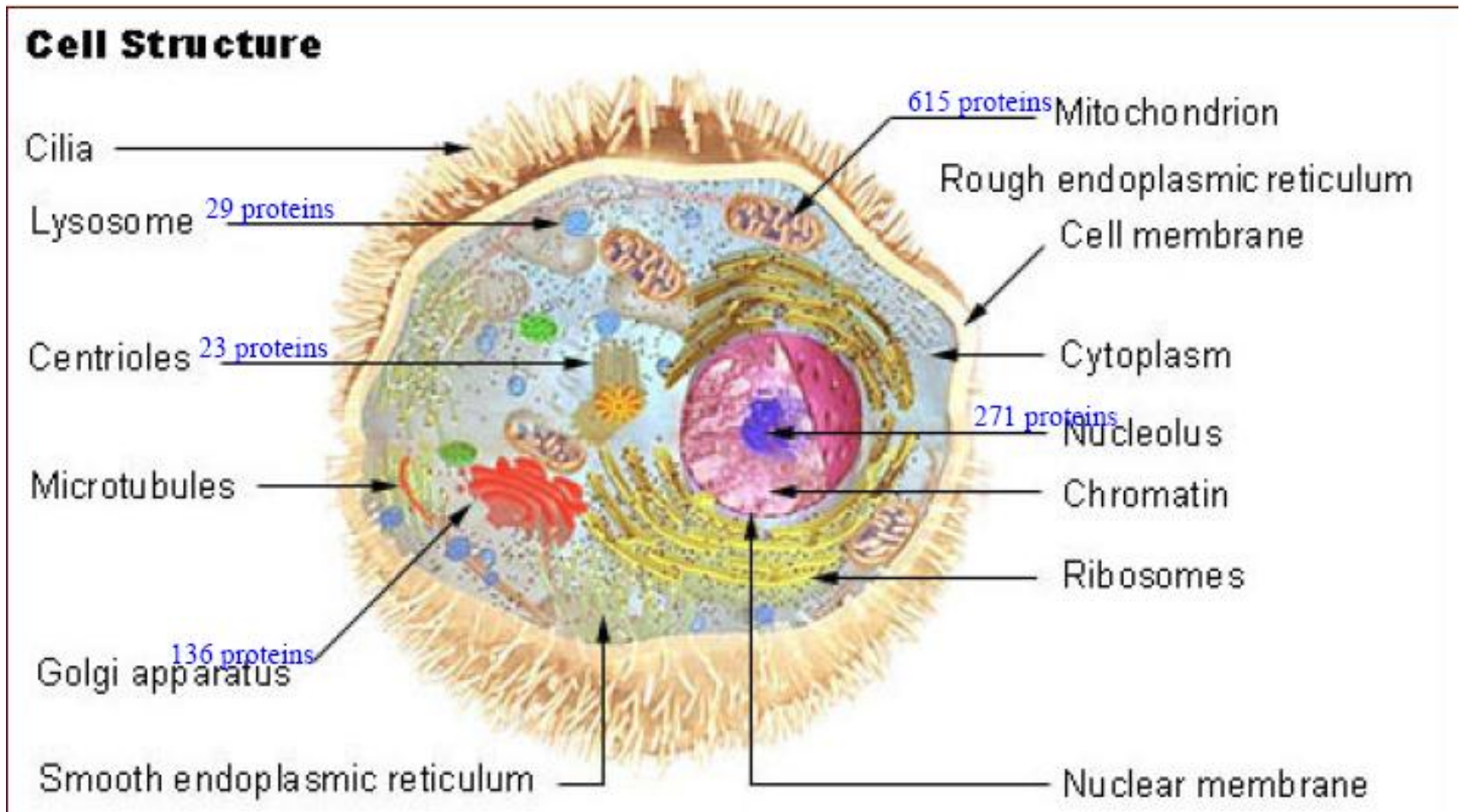
- Σκοπός
- Ευαισθησία και ειδικότητα
- Χρησιμότητα
- Περιοδικότητα ελέγχου. Πότε?
Ποιά?
- Κόστος

Συστημικά αυτοάνοσα ρευματικά νοσήματα

Αυτοαντισώματα

- ✓ Πρωτείνες ορού
 - ✗ Αντι-ανοσοσφαιρίνη (ρευματοειδής παράγων)
- ✓ Κυτταρικές μεμβράνες
 - ✗ Αντιγόνα ερυθρών αιμοσφαιρίων (Coombs)
 - ✗ Αντι-β₂GPI (antiphospholipid syndrome)
- ✓ Πυρηνικά και κυτταροπλασματικά αντιγόνα
 - ✗ Αντιπυρηνικά αντισώματα

Δομή του κυττάρου



Συστημικά αυτοάνοσα ρευματικά νοσήματα

Αυτοαντισώματα

✓ Διαγνωστικά

× Νόσος

× Υποκατηγορίες νόσου

✓ Πρόβλεψη ανάπτυξης νόσου ή έξαρσης

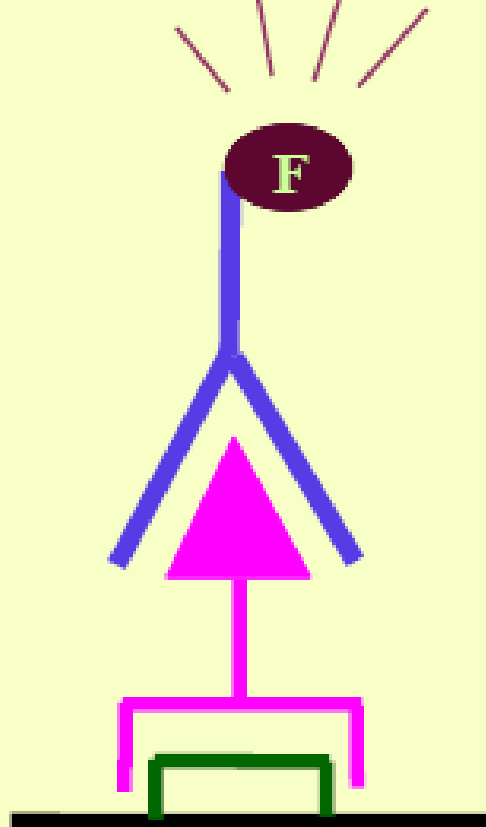
ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ

- Αρχική μέθοδος
- Πρότυπο χρώσης κυττάρου (Τύπος)
- Τίτλος

Έμμεσος ανοσοφθορισμός

Potentially sensitive

Broad screening potential



Fluorescence

Fluorochrome
conjugate

ANA

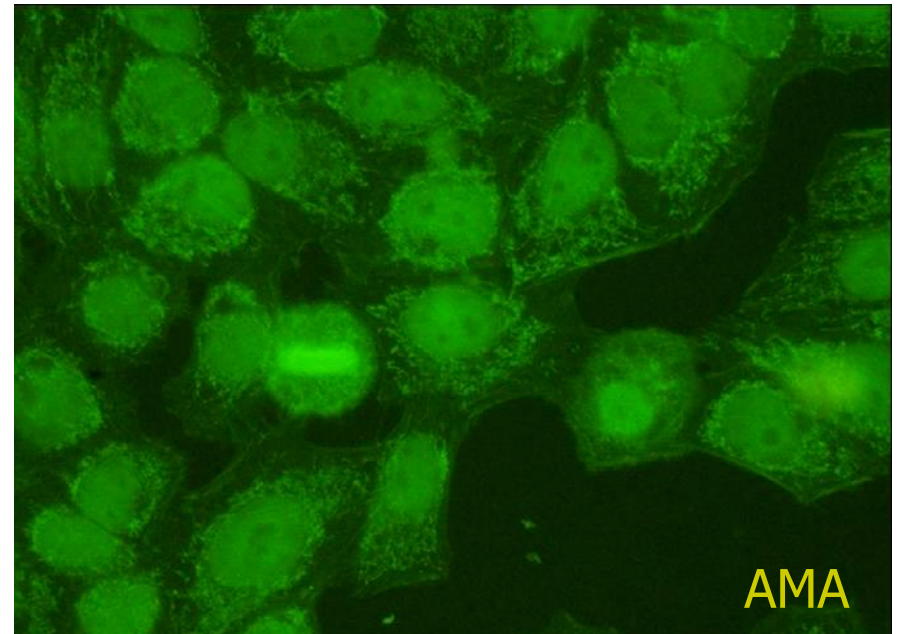
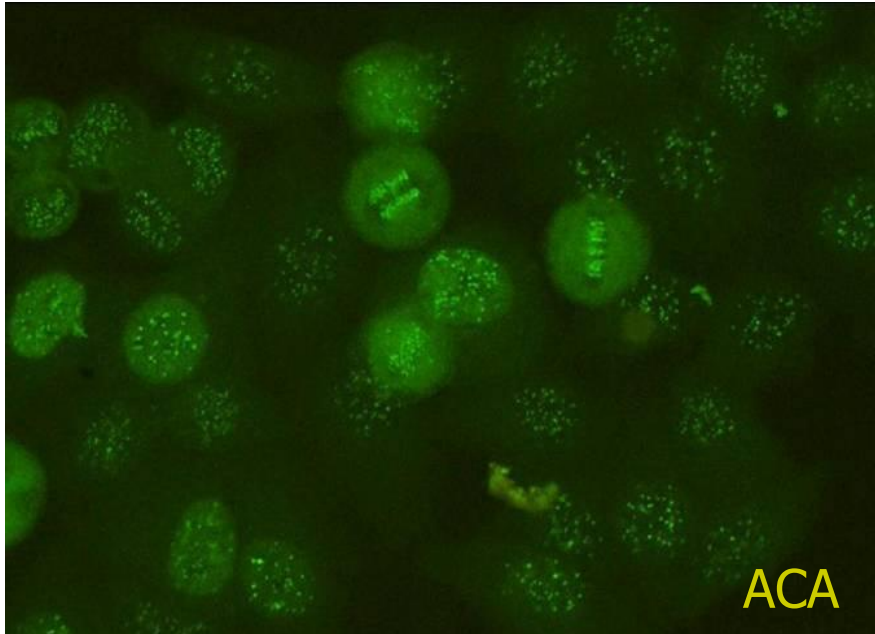
HEp-2 cell

ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ

Ειδικοί τύποι (Δεν χρειάζεται άλλος έλεγχος)

- Κεντρομερίδιο
- Δακτυλιοειδής
- Μιτοχονδριακός
- Ριβοσωμικός

Ειδικοί τύποι

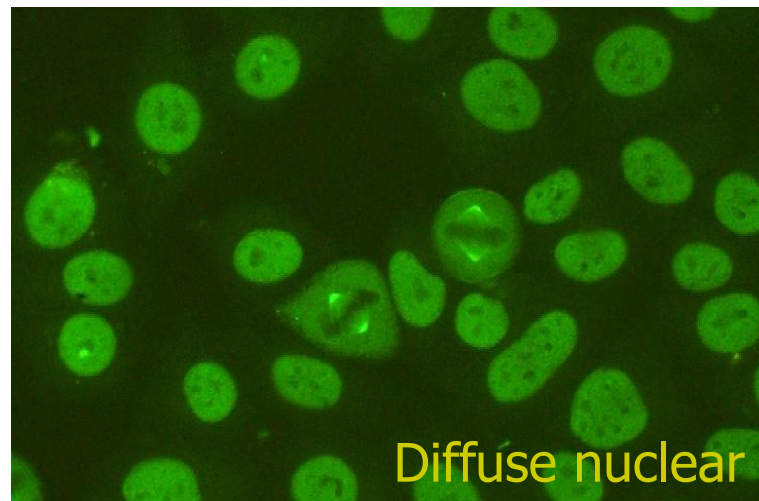
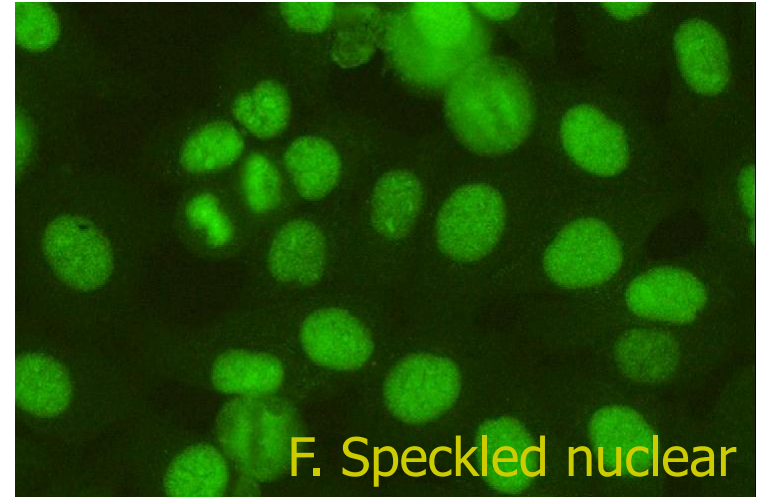
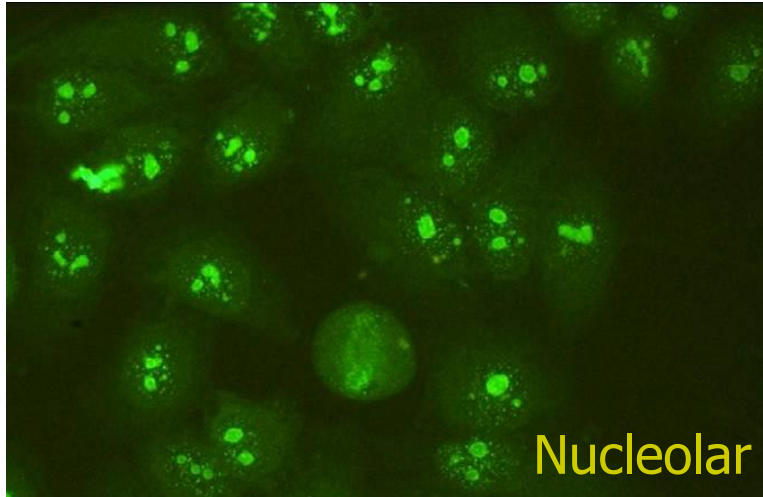


ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ

Μη-Ειδικοί τύποι (Χρειάζεται επιπλέον έλεγχος)

- Διάχυτος
- Στικτός
- Πυρηνισκικός

Μη-ειδικοί τύποι



ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΤΙΠΥΡΗΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

- Αραίωση 1:160 (ευαισθησία-ειδικότητα περίπου 90%)
- Μικρότερες αραιώσεις: απώλεια της ειδικότητας
- Υποκλινικές μορφές νόσων
- Υγιείς υπερήλικες, ιογενείς λοιμώξεις, κá

Συστημικά αυτοάνοσα νοσήματα:

Τα ενδοκυττάρια αυτοαντιγόνα είναι σημαντικά μόρια για την κυτταρική λειτουργία

Κυτταρική εντόπιση

Αυτοαντιγόνο

Νουκλεόσωμα

dsDNA.

Histones,

topoisomerase I

Ματίσωμα

Sm, U1RNP

Ριβονουκλεοπρωτείνες

Ro/SSA, LaSSB

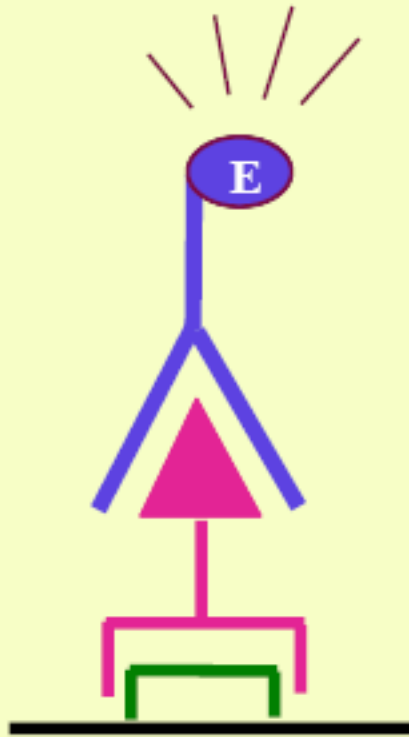
Σύνθεση
πρωτεϊνών/μετάφραση

Ribosomal P, t-RNA synthetases

Μέθοδοι ανίχνευσης αυτοαντισωμάτων

- Μέθοδοι ανοσοκαθίξεσης
- Ανοσοενζυμικές μέθοδοι
- Ραδιοανοσομέθοδοι
- Ανοσοποτύπωση

Ανοσοπροσροφητική ενζυμική μέθοδος στερεάς φάσης(ELISA)



Substrate

**Enzyme-
conjugate**

**Anti-DNA
topoisomerase
1 antibody**

DNA-Topoisomerase 1

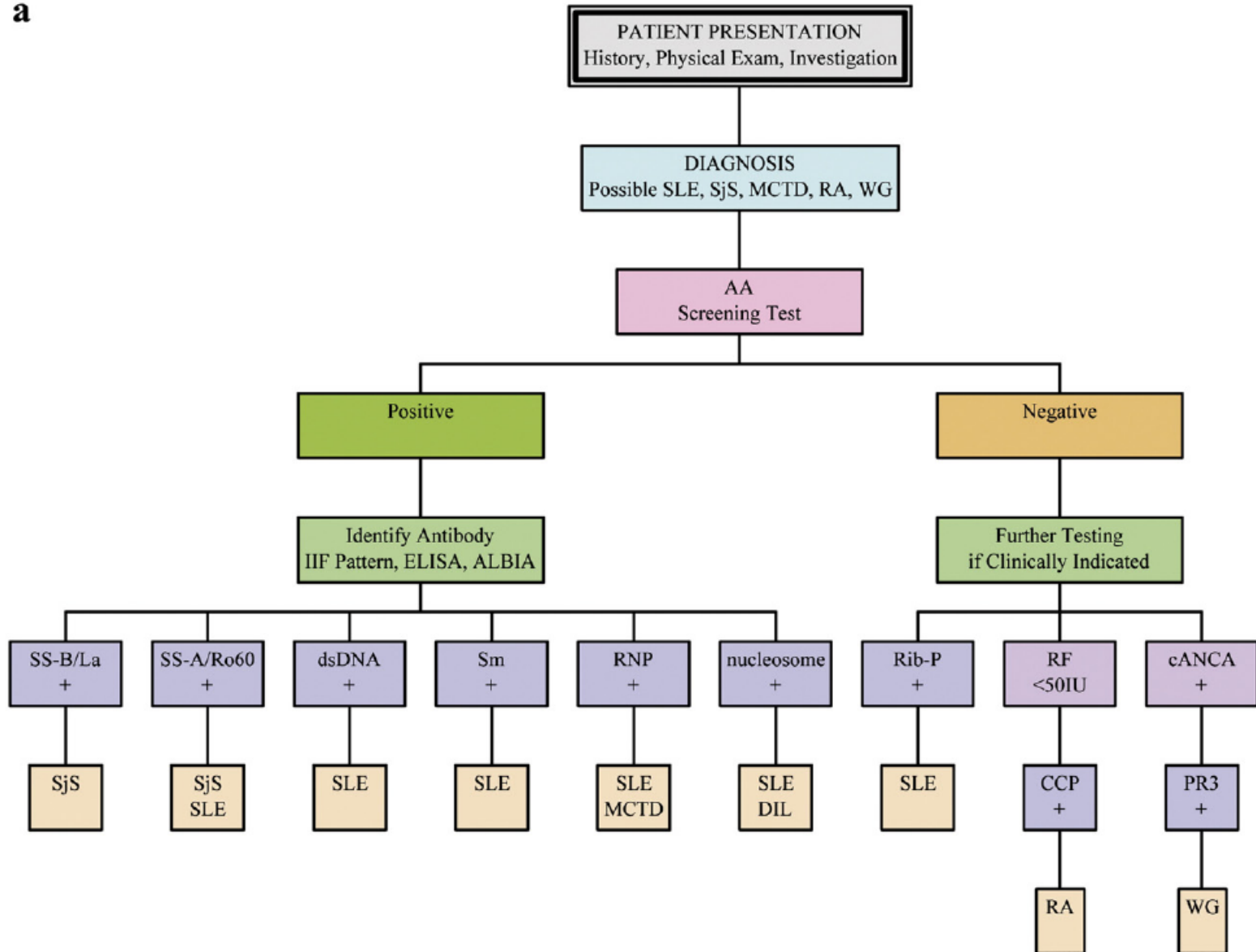
Η «ιδανική» μέθοδος

- ✓ Υψηλή ειδικότητα/ευαισθησία
- ✓ Επαναληψιμότητα (CV <5%)
- ✓ Εύκολη εφαρμογή στην κλινική πράξη
- ✓ Φθηνή

**Πότε ζητάμε ειδικά
αυτοαντισώματα κατά
ενδοκυττάρια
αυτοαντιγόνων ?**

**Κλινικοεργαστηριακοί
αλγόριθμοι**

a



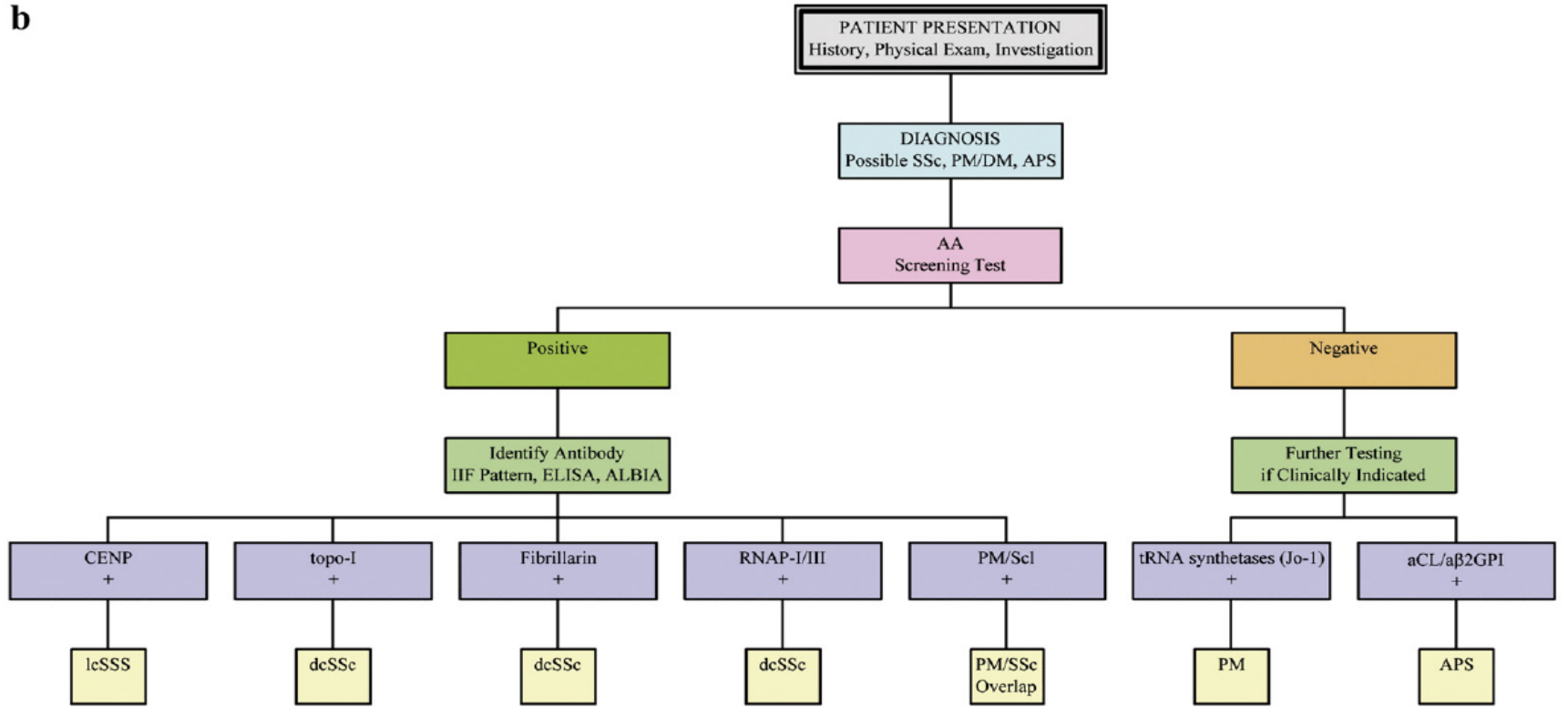
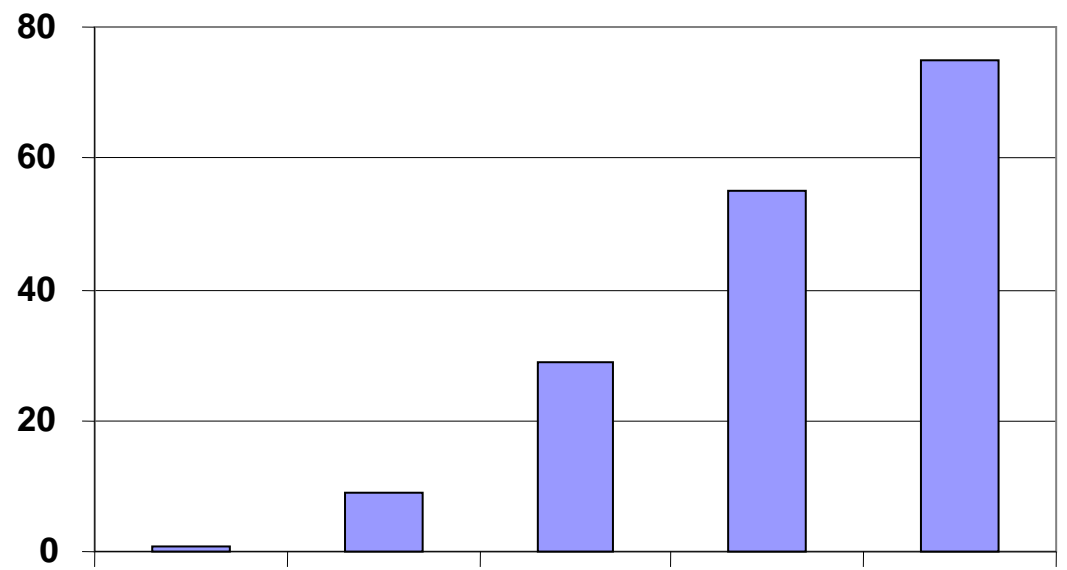


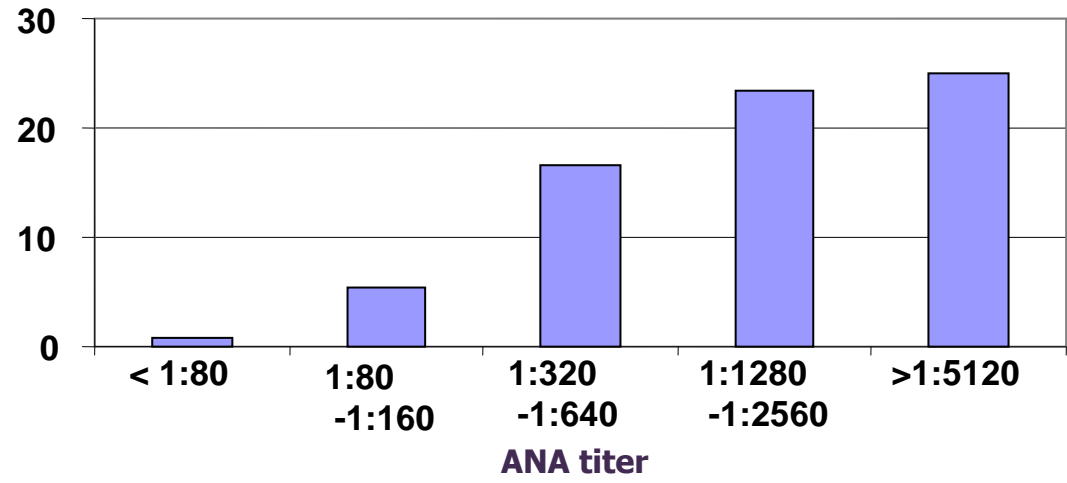
Fig. 1 (continued).

FANA test: screening test for the detection of ENA & anti-dsDNA

Samples positive for ENA (%)



Samples positive for anti-dsDNA (%)



Manoussakis et al., Clin. Rheum., 1988

Αυτοαντισώματα, ανεξάρτητες παράμετροι σε διαγνωστικά κριτήρια αυτοανόσων νοσημάτων

Systemic Lupus Erythematosus	ANA, Sm, dsDNA, Coombs
Sjögren's Syndrome	Ro/SSA, La/SSB
Rheumatoid arthritis	RF
Antiphospholipid Syndrome	aCL
Wegener's Granulomatosis	c-ANCA, PR3
Microscopic vasculitis	p-ANCA, MPO
Antisynthetase syndrome	Jo-1

Αυτοαντισώματα: Ειδικότητα σύμφωνα με τη μέθοδο

Disease specificity >75%

ds DNA	SLE	ELISA, Farr Assay
Sm	SLE	CIE, DD, Immunoblot
Ro/SSA	SCLE, Neonatal lupus	CIE, DD
La/SSB	Sjogren's syndrome	CIE, DD, Immunoblot
Topoisomerase I	Systemic sclerosis	Immunoblot
tRNA synthetase	Polymyositis	CIE, Immunoblot
Centromere	Limited scleroderma	IIF
PDH	Primary Billiary Cirrhosis	IIF
C-ANCA	Wegener's	IIF

Ειδικά αυτοαντισώματα-δείκτες νόσου

- Υψηλής διαγνωστικής αξίας

Anti-dsDNA, - B2 GPI, -
La, -πρωτεϊνάση 3, -
τοποισομεράσης, -
tRNA συνθετασών,
Sm κλπ

- Χαμηλής διαγνωστικής αξίας

Ρευματοειδής παράγων,
Anti-Ro, -
μυελουπεροξειδάση,
κλπ

**ΕΝΑΙ ΠΑΝΤΑ ΑΥΤΟΣ Ο
ΚΑΝΟΝΑΣ ;**

Η ετερογένεια των αντι - Ro/SSA

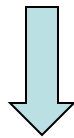
Νόσος	Ποσοστό (%)	Σχόλια
Sjögren's syndrome	60	• Διαγνωστικό κριτήριο
SLE	30	• Ατυπα ευρήματα στο ΚΝΣ • 20-30% ασθενών με Devic • Πνευμονική υπέρταση?
SCLE	90-100	• Παθογενετικό
NLS	100	• Παθογενετικό
RA	3-14	• Παρενέργειες στη D-pen
Scleroderma	2	
Vasculitis	5	
APS	3	
Healthy	1-2	

ΠΑΘΟΓΕΝΕΤΙΚΑ ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Συσχέτιση με νόσο

Αντι-Ro/SSA

Σ. Sjogren



Όχι νόσος

Νεογνικός λύκος



Νόσος

ΝΕΟΓΝΙΚΟΣ ΛΥΚΟΣ

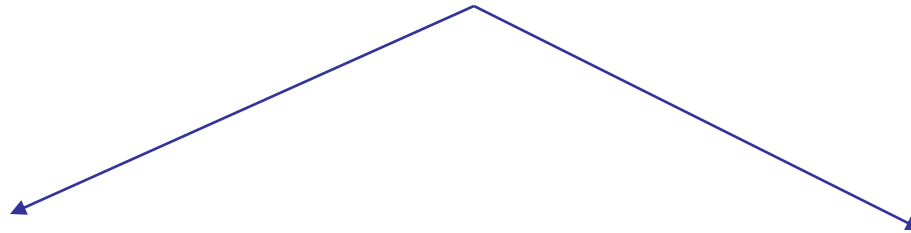
- Δέρμα
- Αυτοάνοσες κυτταροπενίες
- Αυτοάνοση ηπατίτιδα
- Καρδιακή προσβολή



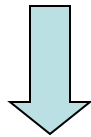
ΠΑΘΟΓΕΝΕΤΙΚΑ ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Συσχέτιση με νόσο

Ρευματοειδής παράγοντας

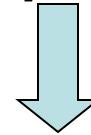


Ρευματοειδής αρθρίτιδα



Όχι νόσος

Μεικτή
κρυοσφαιριναιμία



Νόσος

ΚΡΥΟΣΦΑΙΡΙΝΕΣ



**ΘΕΤΙΚΕΣ
(4°C)**



**Αρνητικές
(4°C)**

Τύποι κρυοσφαιριναιμίας

3 τύποι σύμφωνα με την σύνθεση της κρυοσφαιρίνης

**Τύπος I Μονοκλωνική IgM ή IgG.
Συγκέντρωση κρυοσφαιρίνης > 5
mg/ml.**

Μακροσφαιριναιμία Waldenstrom,
πολλαπλό μυέλωμα

ΚΡΥΟΣΦΑΙΡΙΝΑΙΜΙΑ ΤΥΠΟΥ ΙΙ

- Πορφύρα
- Αδυναμία, καταβολή, πυρέτιο
- Ηπατομεγαλία
- Σπληνομεγαλία, λεμφαδενοπάθεια
- Σπειραματονεφρίτιδα
- Περιφερική νευρίτιδα

Τύποι κρυοσφαιριναιμίας

Τύπος ΙΙ Μεικτή μονοκλωνική κρυοσφαιριναιμία

**Μονοκλωνικός ΡΠ IgMκ -πολυκλωνική
IgG. Συγκέντρωση > 1 mg/ml.**

Ηπατίτιδα C, σ. Sjogren λεμφουπερπλαστικά
νοσήματα

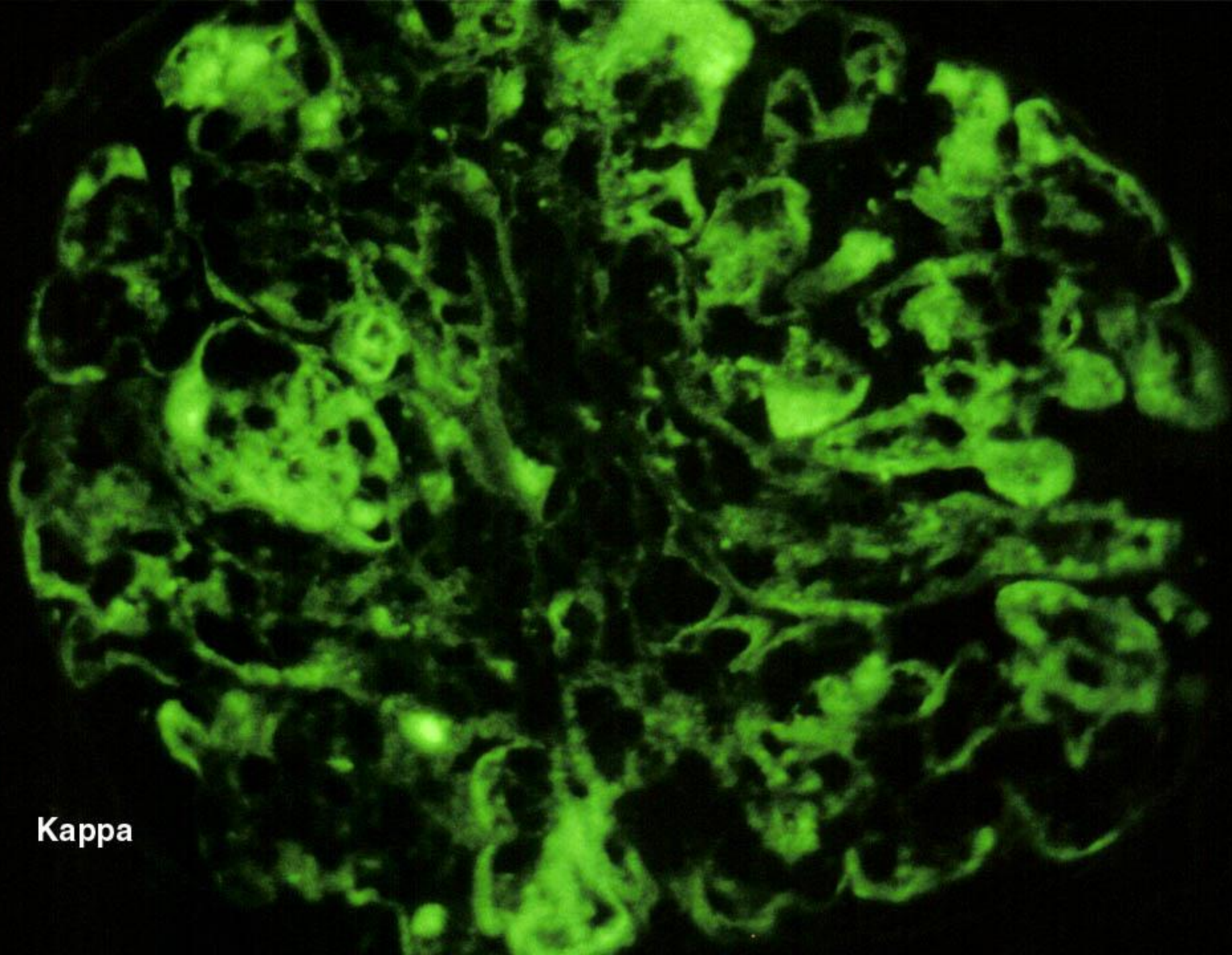
Τύποι κρυοσφαιριναιμίας

**Τύπος ΙΙΙ πολυκλωνικές
ανοσοσφαιρίνες**

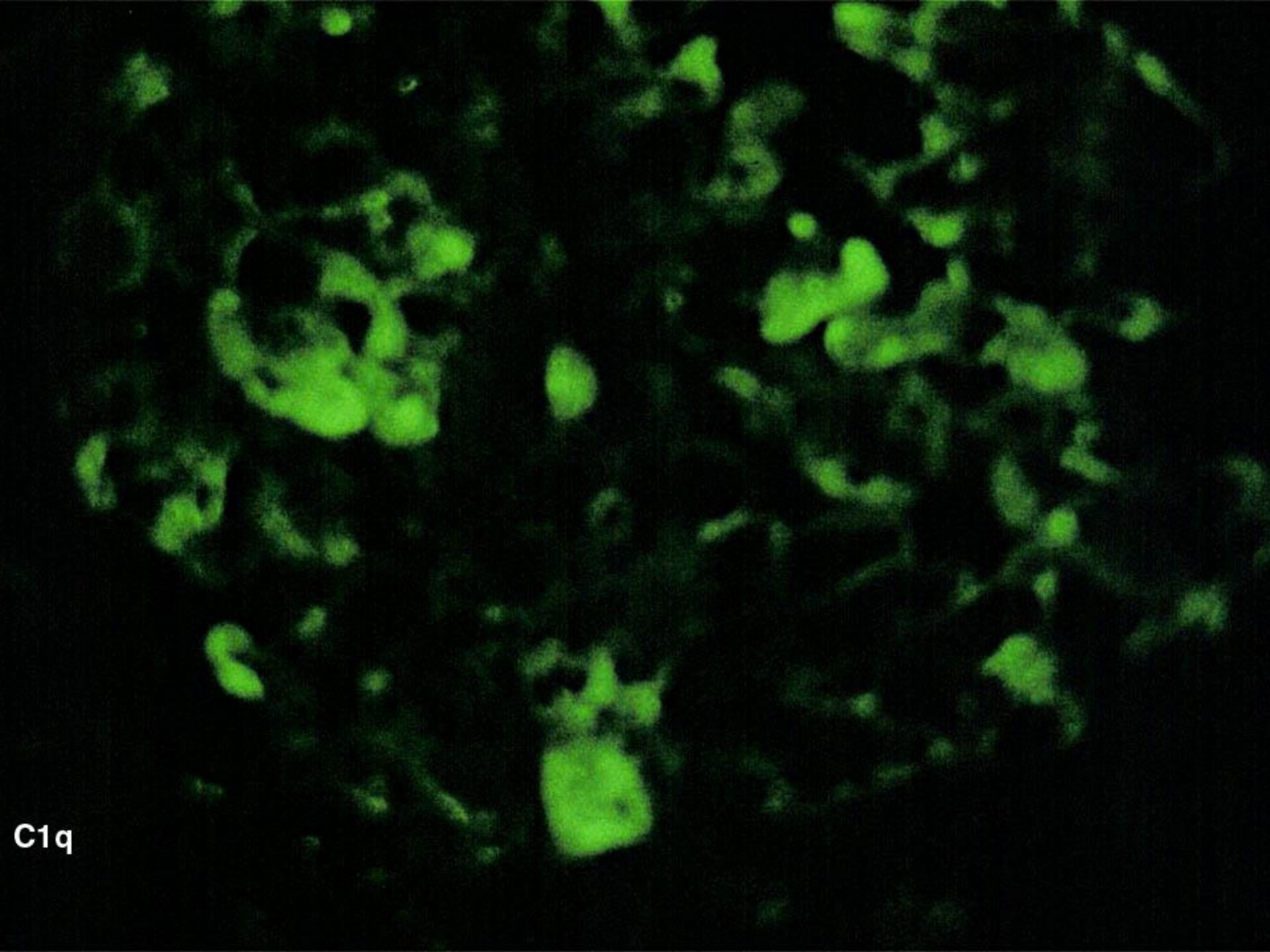
Συγκέντρωση < 1mg/ml.

Μη ειδικό εύρημα

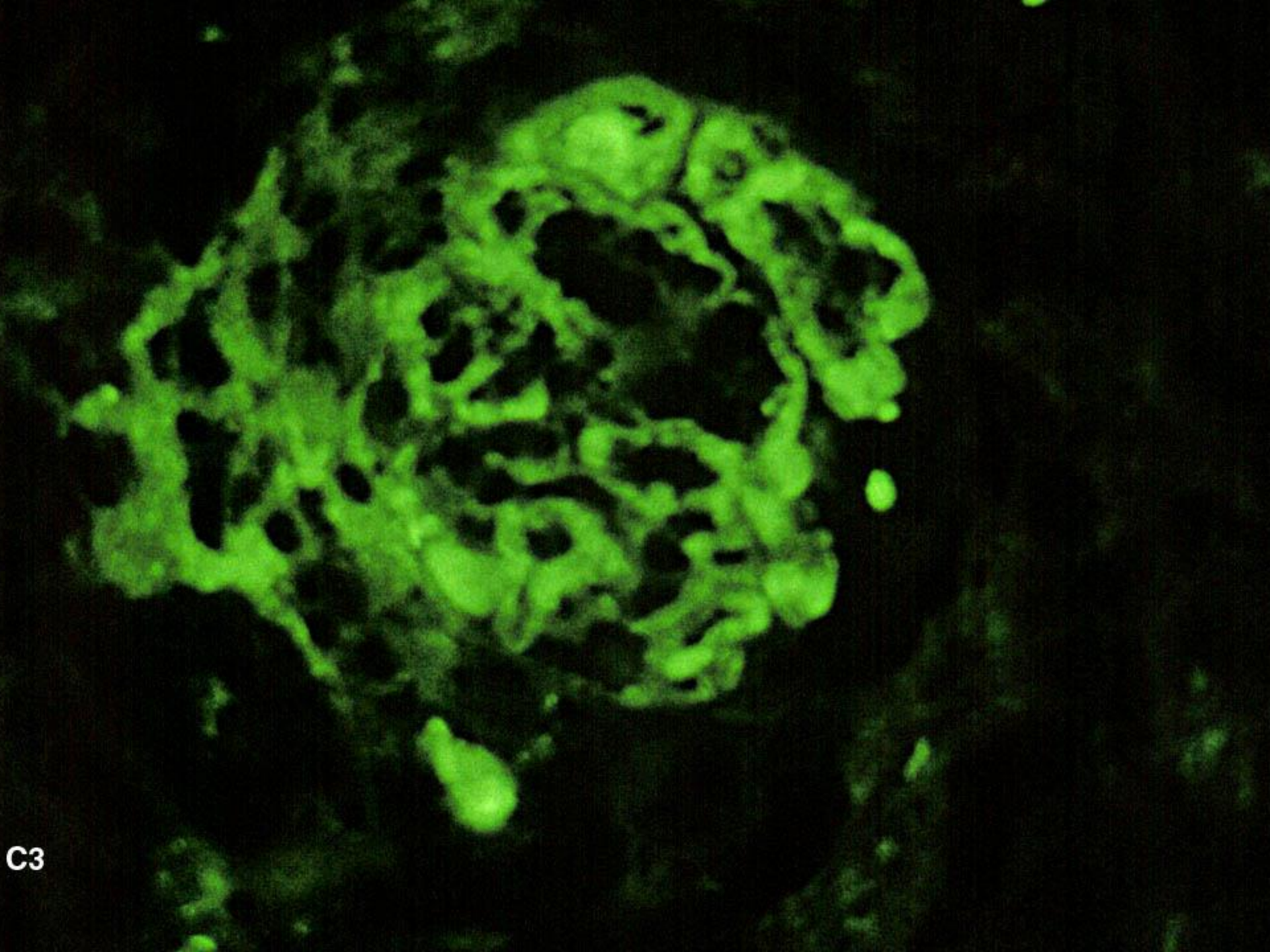
**Λοιμώξεις, αυτοάνοσα νοσήματα,
νεοπλασίες**



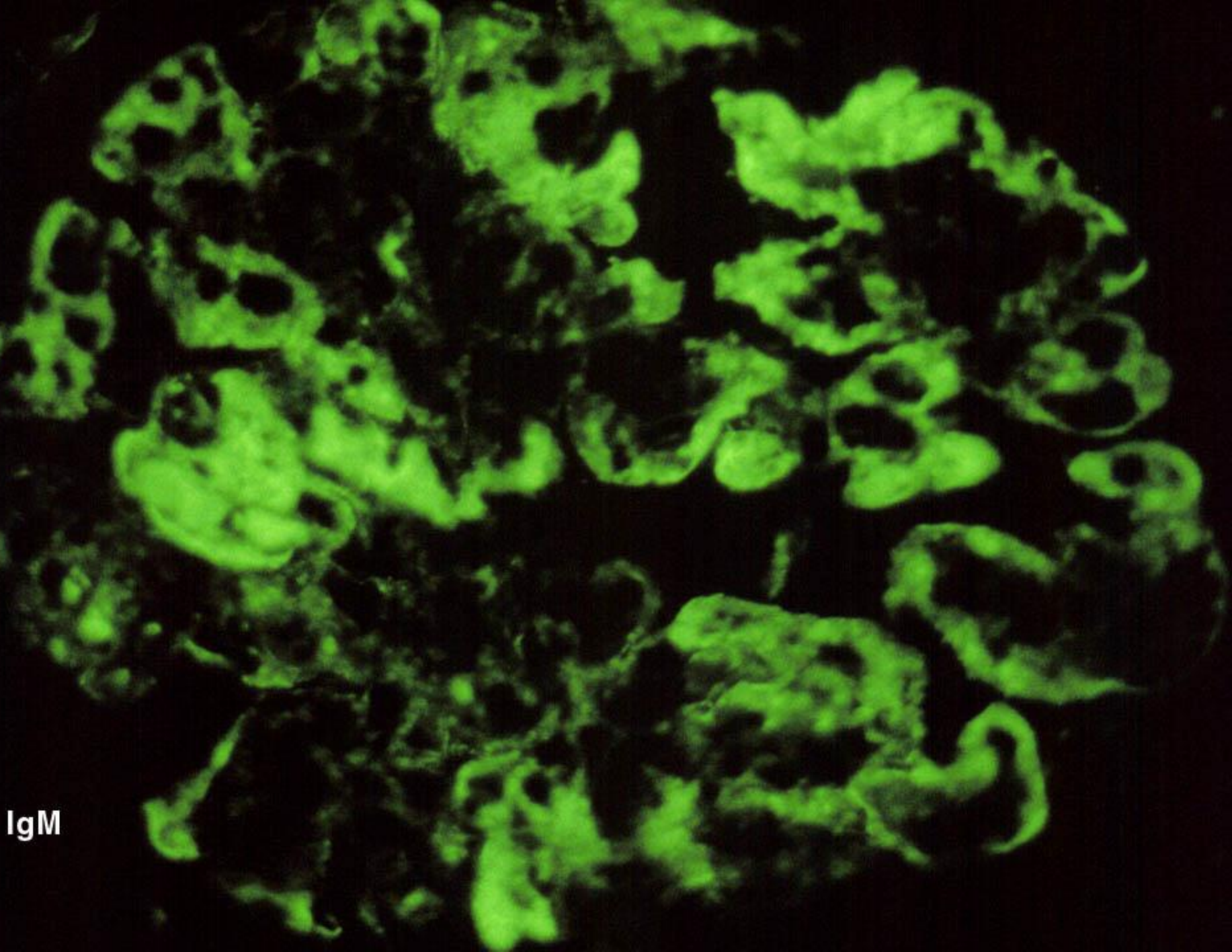
Kappa



C1q



C3



IgM

Αυτοαντισώματα – δείκτες έξαρσης νόσου

- Εξατομίκευση ανα ασθενή
- Αντι-dsDNA, -πρωτεϊνάση 3 ????
- κρυοσφαιρίνες
- Θεραπεία με βάση την κλινική εικόνα

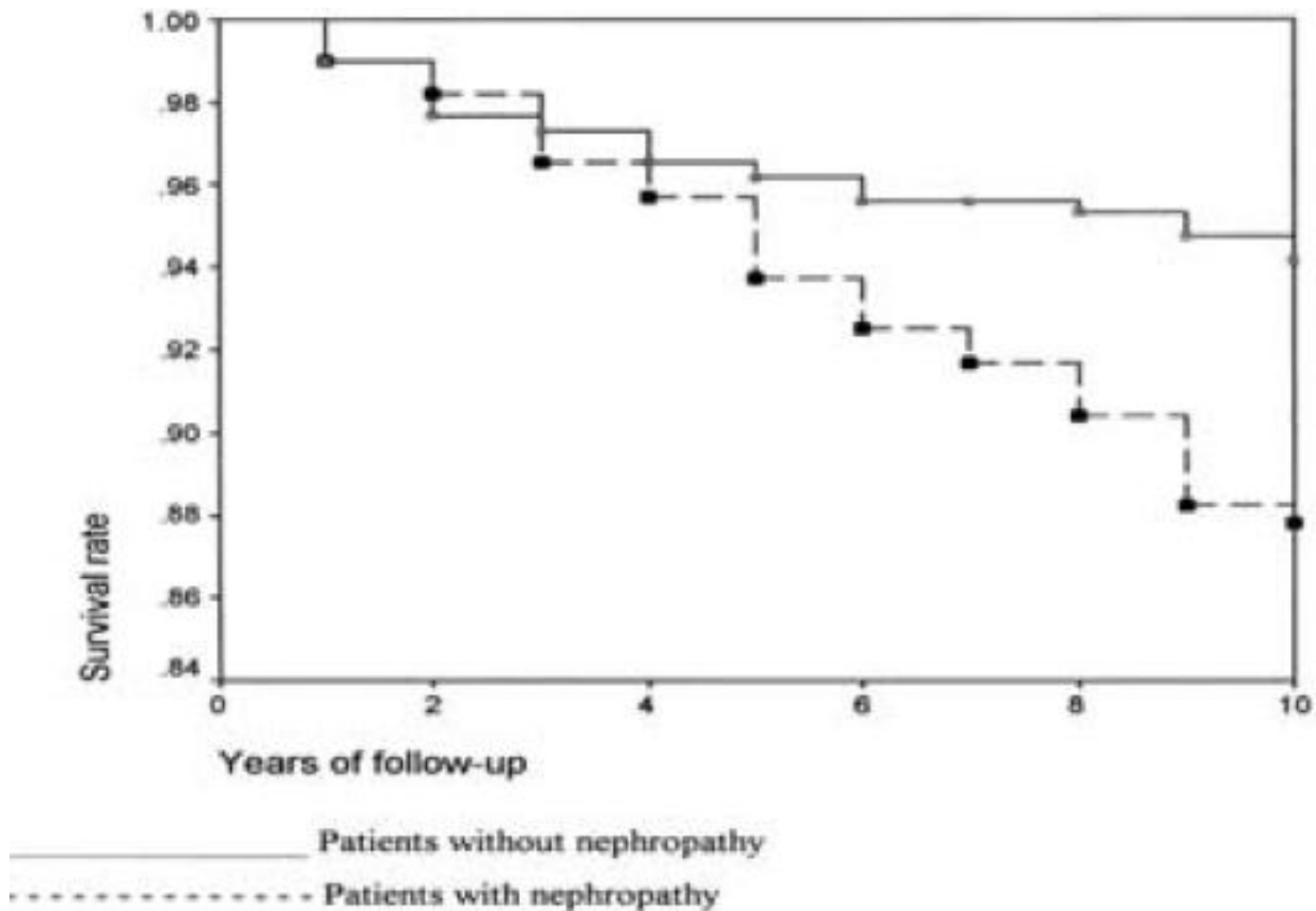
Περιοδικός έλεγχος αυτοαντισωμάτων

- ✓ Ετήσιο κόστος > 5.000.000 Ευρώ
- ✓ Στην πλειονότητα η εικόνα των ειδικών αυτοαντισωμάτων δεν αλλάζει.
- ✓ Στην πλειονότητα ο τίτλος δεν έχει κλινική σημασία

ΕΞΑΙΡΕΣΕΙΣ

- ✓ Υποκατηγορία ασθενών με ΣΕΛ και νεφρίτιδα (αντι-DNA)
- ✓ Αλλαγή κλινικής εικόνας (πχ νέο εξάνθημα σε ασθενή με ΣΕΛ)

ΣΕΛ- νεφρική προσβολή



ΑΝΤΙ-DNA

✓ **Anti ss- DNA:**

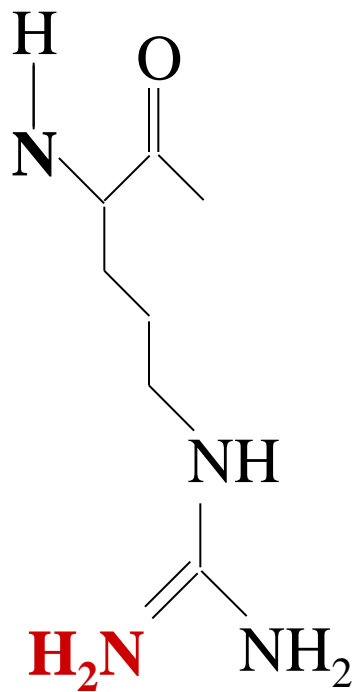
Μη ειδικά

✓ **Anti-ds DNA:** ειδικά για τον ΣΕΛ

Κλινική σημασία:

- Διάγνωση
- Συσχέτιση με νεφρίτιδα (+ χαμηλό C3)
- Πρόβλεψη έξαρσης (αυξανόμενοι τίτλοι+ χαμηλό C3)

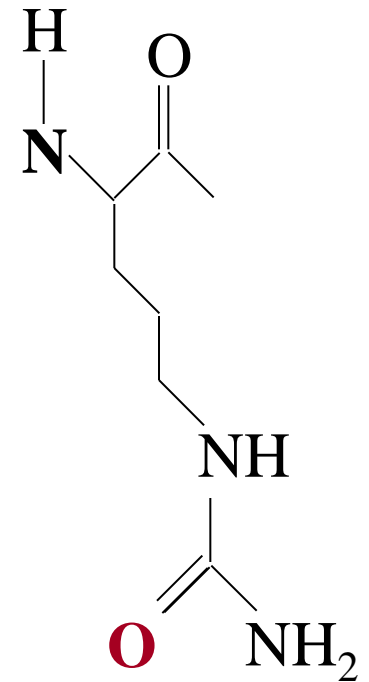
Αντισώματα κατά κιτρουλινοποιημένων πεπτιδίων (CCP)



L-Arginine

Peptidyl-arginine deiminase (PAD)

Ca^{++}



L-citrulline

ΑΝΤΙ-CCP. Συσχέτιση με ΡΑ

Anti-CCP2 diagnostic data

Patient group	<i>n</i>	CCP2+	%
RA total	7769	5465	70
Early	2936	1752	60
Established	4833	3713	77
Controls	10,833	446	4
Non-RA	7978	420	5
Healthy	2855	26	1

These are the combined data of 66 independent reports published in 2002–2005 dealing with the sensitivity and specificity of the CCP2 test. The selection for early RA was adopted from the original reports.

Meta-analysis:

Diagnostic Accuracy of Anti-CCP Antibody and RF for Rheumatoid Arthritis

Ann Intern Med. 2007;146:797-808.

- × 37 studies of anti-CCP antibody and 50 studies of RF
- × pooled sensitivity, specificity, and (+) and (-) LR's

	Anti-CCP	RF
Sens.	67%	69%
Spec.	95%	85%
(+) LR	12.46	4.86
(-) LR	0.36	0.38

Αντι-CCP: Συνεισφορά στη διάγνωση της πρώιμης RA σε ασθενείς με αδιαφοροποίητη αρθρίτιδας

Table 4 Predictive value of anti-CCP in early undifferentiated arthritis

Test	References	EA (No)	Follow up (months)†	RA (n) diagnosis after follow up	DD at baseline (months)‡	CCP at baseline (%)†	CCP at diagnosis of RA (%)†	Odds ratio* (95% CI)
Anti-CCP1	21, 53, 59, 62	1327	15 (5) 12 (12–24)	603	<16 (12)	23 (6) 22 (16–32)	46 (6) 44.5 (41–53)	20 (14 to 31)
Anti-CCP2	12, 20, 21, 24, 25, 29, 44, 48	2017	18 (9) 12 (12–36)	1026	<5 (3)	23 (5) 21.5 (16–33)	51 (8) 53 (39–62)	25 (18 to 35)

CI, confidence interval; EA, early arthritis; RA, rheumatoid arthritis; DD, disease duration.

*Odds ratios were calculated by dividing the odds of the RA group by the odds of the non-RA group; †results shown as mean (SD) and median (range); ‡results shown as mean (SD).

Αυτοαντισώματα και διαβρώσεις στη ΡΑ

	Radiographic progressors (n=49)	Radiographic non-progressors (n=55)	Significance (p value)	OR (95% CI)
Anti-CCP+	32 (65)	12 (22)	<0.001	6.7 (2.8 to 16.1)
IgM RF+	29 (59)	21 (38)	0.05	2.4 (1.1 to 5.7)
IgA RF+	30 (61)	17 (30)	0.003	3.5 (1.6 to 7.9)
IgG RF+	27 (55)	11 (20)	<0.001	4.9 (2.1 to 11.7)
APF+	25 (51)	13 (24)	0.005	3.4 (1.5 to 7.8)
AKA+	29 (59)	10 (18)	<0.001	6.5 (2.7 to 15.9)
Anti-CCP+ and IgM RF+	23 (47)	7 (13)	0.002	4.8 (1.8 to 12.8)
Anti-CCP+ and/or IgM RF+	39 (80)	25 (45)	<0.001	4.7 (2.0 to 11.2)
Anti-CCP (units), mean (SD)	217.2 (248)	72.7 (141)	<0.001	–
IgM RF (index), mean (SD)	3.7 (3.1)	2.2 (2.1)	0.002	–
IgA RF (index), mean (SD)	3.2 (2.7)	2.0 (2.5)	<0.001	–
IgG RF (index), mean (SD)	3.5 (3.0)	1.9 (2.5)	<0.001	–

Συστημικά αυτοάνοσα ρευματικά νοσήματα

Αυτοαντισώματα

✓ Διαγνωστικά

× Νόσος

× Υποκατηγορίες νόσου

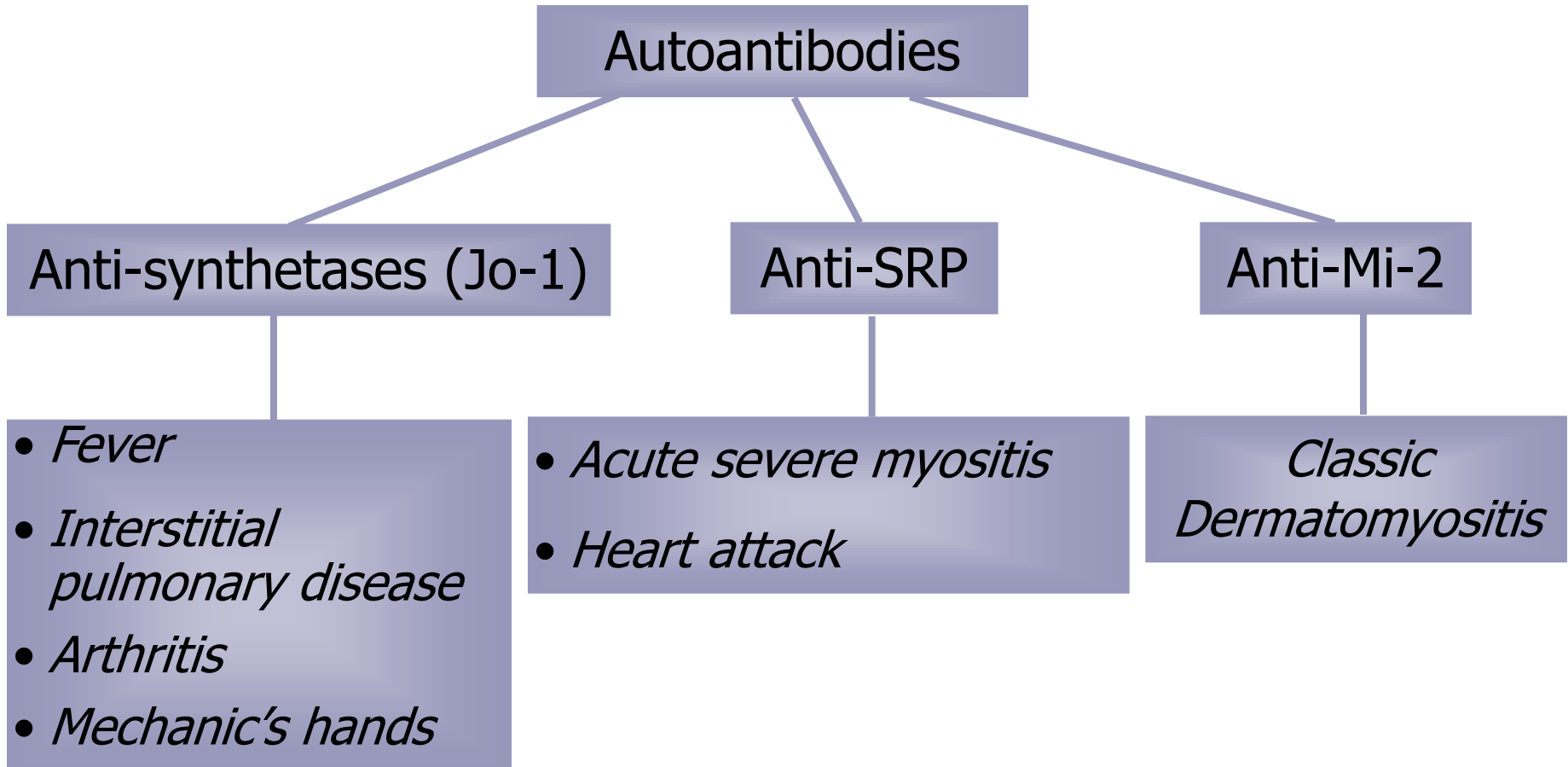
✓ Πρόβλεψη ανάπτυξης νόσου ή έξαρσης

Αυτοαντισώματα-υποκατηγορίες νόσου

- ✓ ΣΕΛ-Ψυχιατρικές εκδηλώσεις
- ✓ Περιορισμένο σκληρόδερμα
- ✓ Διάχυτο σκληρόδερμα
- ✓ Φλεγμονώδεις νόσοι των μυών

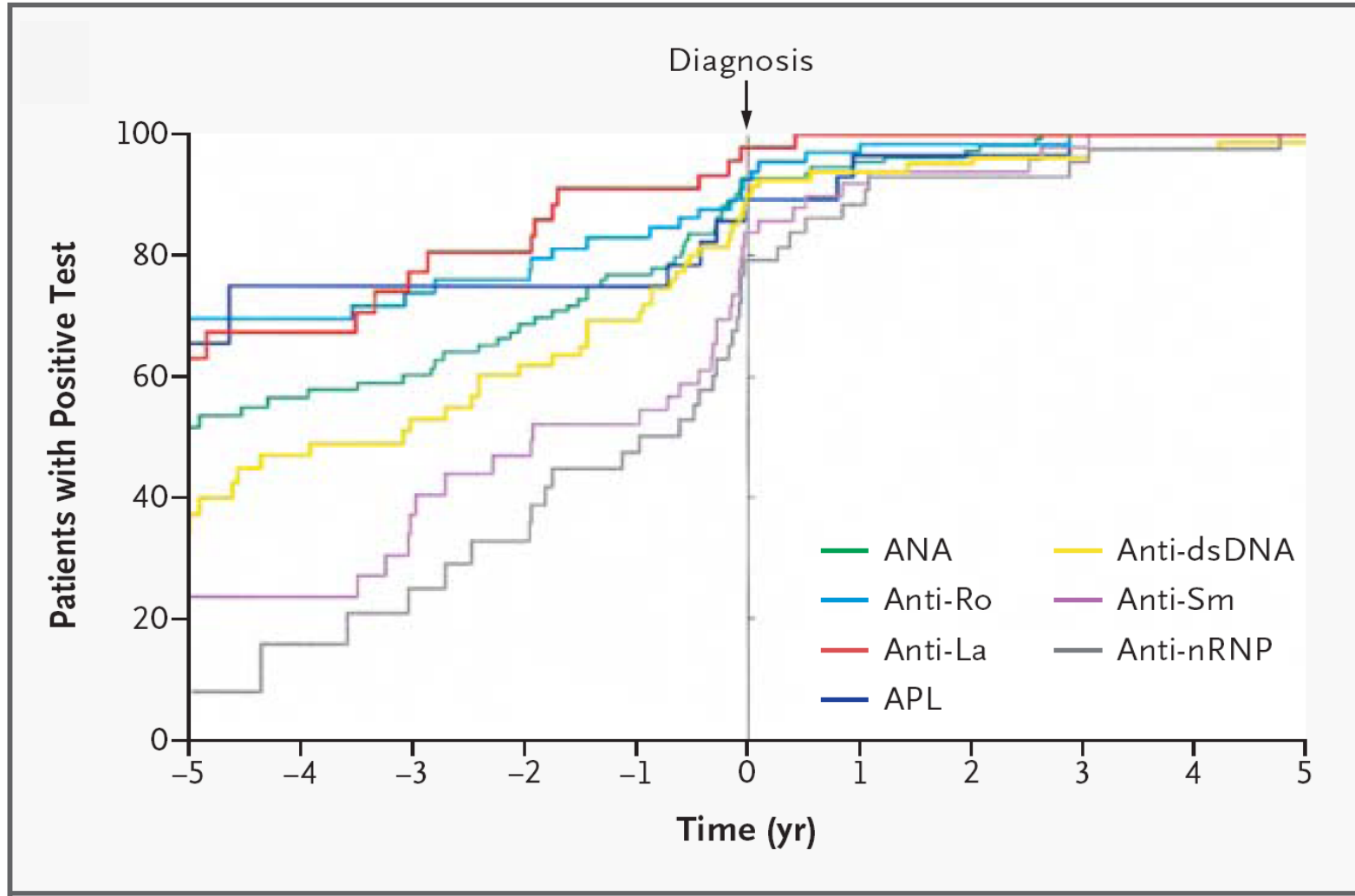
Μυοσίτιδα

Ειδικά αυτοαντισώματα-κλινικά σύνδρομα



Systemic Lupus Erythematosus

Autoantibodies development before the onset of the disease



ΑΝΤΙ-CCP: Πρόβλεψη εμφάνισης ΡΑ σε υγιείς

Table 5 Predictive value of anti-CCP in healthy blood donors

Author (date)	Nature of the test	Sample/design	Follow up	Cohort	Sensitivity* (%)	Specificity (%)	Odds ratio† (95% CI)
Rantapaa-Dahlqvist (2003) ⁷³	Anti-CCP2	Case-control study	Retrospective analysis of blood samples collected at onset	83 Blood donors (before RA)	4 (9 y before) 25 (> 1.5 y before) 52 (< 1.5 y before)	98	28 (8 to 95)
Berglin (2004) ⁷⁴	Anti-CCP2	Same group as above	Same as above	59 Blood donors (before RA)	37 (< 2 y before)	98	15.9
Nielen (2004) ⁷⁵	Anti-CCP1	Case-control study	Retrospective analysis of blood samples collected at onset	79	29 (< 5 y before)	99.5	64.5 (8.5 to 489)

CI, confidence interval; RA, rheumatoid arthritis.

*Sensitivity was defined by the proportion of people with RA who had a positive anti-CCP test result before symptom onset; †odds ratio was defined by the ratio of the probability of developing RA in the group of blood donors with positive anti-CCP to the probability of developing RA in the group of blood donors with negative anti-CCP antibodies.

Συμπερασματικά....

- Το εργαστήριο είναι πολύτιμος σύμμαχος για την διάγνωση και παρακολούθηση.
- Δεν θεραπεύουμε το εργαστήριο αλλά τον ασθενή.
- Η επιλογή των εξετάσεων με βάση την κλινικά εικόνα και συγκεκριμένα ερωτήματα.
- Περιοδικός έλεγχος όταν χρειάζεται