ALPHA MEDICAL

Diagnostika autoprotilátok z pohľadu patológa

J. Rajčáni, M. Benčat, L. Kořínková, O. Ďurinková, J. Papanová

Patológia s.r.o.

Diagnostické centrum, Martin

DKNEX

Historické východiská: diagnostika autoprotilátok na Ústave patologickej anatómie v Hradci Králové

- **Známy český patológ prof. Z. Nožička z Ústavu patologickej anatómie v Hradci Králové uverejnil v roku 1991 článok, ktorý bol výsledkom jeho 20 ročného bádania v oblasti, ktorú nazval „histoserógiou“.**
- **Na kryostatových rezoch rozličných orgánov pochádzajúcich z pitiev ako aj od králikov sa nepriamej IF zistila pozitívna reakcia so sérami pacientov s niektorými autoimunitnými chorobami.**
- **Výber orgánov a tkanív bol mnohotvárny a výsledky impozantné: reagoval medzibunkový tmel dlaždicového epitelu kože a slizníc (ezofagus), parietálne bunky sliznice žalúdka, myocyty priečne pruhovaného ako aj srdcového svalu, bunky hladkých svalov ako aj väzivo v stene zažívacieho traktu, koloid ako aj folikulárne bunky štítnej žľazy, epitelové bunky acinov pankreatu a slinných žliaz ale aj beta-bunky Langerhansových ostrovčekov pankreasu, epitelové bunky trámcov kôry nadobličky, epitelové bunky trámcov pečene, epitel tubulov obličiek ale aj bazálna membrána kapilár glomerulov obličiek.**
- **Napokon sa preukázala aj existencia tzv. anti-nukleárneho faktora v sérach osôb s *lupus erythematosus*.**

DEMO

ALPHA MEDICAL

ALPHA MEDICAL

Postup pri diagnostike autoprotilátok (IF na bunkách a rezoch, IB, biočipy)

- Nepriama imunofluorescencia (IF) na bunkách Hep-2 (najmä antinukleárne ANA)
- Nepriama IF na náteroch leukocytov: anti-neutrofilné cytoplazmové ANCA
- Nátery buniek spermií (ASA)

  Prvá fáza: skríning (vyradenie negatívnych sér) .

  U pozitívnych sér druhá fáza (spresnenie)
- Pri pozitívnej IF ANA titrácia autoprotilátok (riedenie od 1:100 a vyššie; určenie triedy: IgG, IgM, IgA).
- Pri primárnej membránovej nefropatii (PMN) bunky HEK-293 (PLA-2R1)
- Pri dsDNA: nátery prvoka *Crithidium lucilae*
- Imunoblot (IB):pri spresnení profilu ANA, pri odlíšení sklerodermie od systémovej sklerózy aj pri dg autoprotilátok voči bunkám orgánov (pečeň, mozog, svaly ap)

Rezy orgánov: skríningy (nepriama IF) a potom spresnenie (IB alebo biočipy)

- pri poškodeniach pečene (autoimunitnych hepatitídach, AIH), myokardu (myokarditídy, kardiomyopatia s dilatáciou, DCM – dilated cardiomyopathy), pri myozitídach, encefalopatiách ap.
- „Farbenie“ mikročastíc (biočipy) s nadviazaným antigénom (pri ANCA, protilátky proti gliadínu ap.)
- Metódy IB a biočipové mozaiky sú vysoko citlivé a špecifické; používame pri pozitívnych alebo pri nejasne pozitívnych sérach.

DEMO

Autoprotilátky, ktoré sa vyšetrujú v Diagnostickom centre Patológia s.r.o., Alphamedical a.s., Martin

Autoprotilátky proti bunkám

- ANA – anti-nuclear antibodies (proti antigénom bunkového jadra v užšom zmysle slova), Hep-2 bunky
- Proti antigénom cytoplazmy a mitotickým štrukúram: Golgiho aparát, mitochondrie, lyzozómy, vlákna aktínu, vlákna vimentínu, centrozómy, ribozómy, keratín, centrioly, vretenové vlákna deliacich telieseok ap). Obvykle súčasť ANA.
- ANCA - anti-neutrophil cytoplasm antibodies (proti granulocytom): cANCA, pANCA alebo xANCA)
- ASA – anti-sperm antibodies (proti antigénom spermií).

Skríning: nepriama imunofluorescencia (nadväzuje titrácia, určenie triedy Ig)

Spresnenie: imunoblot (IB) alebo biočipy (antigény sú „čisté“)
strip Euroline Systemic sclerosis profile;
strip Euroline ANA profile 3
1. Mozog: strip Euroline antigenic profile 2
2. Pečeň: Euroline Profile Autoimmune Liver Dis
3. Svaly: strip Euroline Myositis Profile 3

Biočipy:
pri ANCA Europlus Mosaics,
pri celiakii gliadin (Europlus GAF-3X),
dermatologická mozaika (dezmogleín 1 a 3, BP180 a BP230)

Proti tkanivám a orgánom

- Pečeň (ABBA, ASMA, ANA, ANCA; nadväzuje IB strip: AMA-M2, M2-3E/BPO, Sp100, PML, gp210, LKM-1, LC1, SLA/LP, Ro52)
- Obličky: glomeruly (BM), bunky kanálikov – (LKM liver/kidney microsomes), bunky HEK-293 (PLA-2R1)
- Žalúdok – proti parietálnym bunkám žliazok (APCA), stanovenie intrinsic faktoru (biočip)
- Mozoček: neróny (Hu, Yo, GAD), myelín (gangliozidy), IB: Amphiphysin, CV2, MA2/TA, Ri, Yo a Hu
- Ezofagus a koža: (dezmogelíny, BP180 a BP230, biočip)
- Štítna žľaza: receptory TSH, mikrozómy (bunky folikov) alebo tyreoglobulín-(anti-TAb – koloid folikulov)
- Hladký sval: anti-aktínové protilátky, ASMA – anti-smooth muscle antibody
- Priečne pruhovaný (kostrový) sval, IB pri dif. dg. myozitíd: Mi-2, Ku, PM-Scl100, PM-Scl75, SRP, Jo-1, PL-7, PL-12, OJ, EJ, Ro-52 .
- Myokard: svalové vlákna (myozín, troponín), sarkolemma – myolemma).
- Pankreas: beta-bunky Langerhansovýcb ostrovčekov, bunky žliazok (zymogénne granulá acinov)
- Tenké črevo – endomýzium, antiretikulárne protilátky (ARA), ANCA, ASCA (pri dif. UC a Crohnovej choroby)
- Koža a ezofagus (bazálna membrána epidermy, medzibunkový tmel)
- Ováriá (interštícium, tekálne bunky folikulov)
- Kôra nadobličiek (rezy, SCA)

DEMO

Medzinárodné klasifikácie obrazov ANA v porovnaní s nomenklatúrou Dynex/Časomil (1. časť)

ALPHA MEDICAL

Taxonómia CANTOR*	Prevecal (Biosystems) Eular**	Dynex/Časomil
Nuclear membrane fluorescence		
Membraneous nuclear patterns (smooth and/or punctate)	1.1.Smooth membraneous 1.2. Punctate membraneous	2. Homogénní jaderná membrána 3. Póry v jaderné membráne
Nucleolasmic fluorescence patterns		
Homogeneous nucleoplasmic	2.1. Homogenous nuclear	1. Homogénní jaderný typ
Speckled patterns: Large speckled nucleoplasmic Coarse speckled nucleoplasmic Fine speckled nucleoplasmic Pleomorphic speckled (PCNA)	Speckled patterns: 2.2.1. Large speckled 2.2.2. Coarse speckled 2.2.3. Fine speckled 2.2.5. Pleomorphic speckled (PCNA)	Skvrnité formy: 7. Jaderná s velkými skvrnami 6. Hrubá skvrnitá 5. Jemne zrnitá 20. Ruznorodá zrnitá (anti- PCNA) 4. Skvrnitá (zrnitá) jadérní fluor.
Centromere	2.2.6. Centromere (CENP-B)	12. Centromérová fluorescencia
Multiple nuclear dots	2.2.7. Multiple nuclear dots	10. Četné jaderní tečky
Few nuclear dots (coiled bodies)	2.2.8. Coiled body pattern	11. Ojedinelé jaderné tečky
Fine grainy Scl-70-like	2.2.4. Grainy Scl-70-like	9. Zrnitá fl. jádra podobná Scl-70
		8. Fluor. jádra podobná Ku
Nucleolar fluoresecnce patterns		
Homogeneous nucleolar	3.1. Homogenous nucleolar	13. Homogénní jadérka
Clumpy nucleolar	3.2. Clumpy nucleolear	14. Chuchvalcová jadérka
Punctate nucleolar	3.3. Punctate nucleolar	15. Tečková jadérka

DEMO VERZE

*na základe údajov Wiik et al, J Autoimmunity 35, 276-290, 2010 **European League Association of Rheumatology

ALPHA MEDICAL

Medzinárodné klasifikácie obrazov ANA v porovnaní s nomenklatúrou Dynex/Časomil (2.časť)

Taxonómia CANTOR*	Prevecal Biosystems Eular**	Dynex/Časomil
Cytoplasmic fluoresecence pattern		
Diffuse cytoplasmic	5.2. Diffuse cytoplasmic	26. Difúzní cytoplazmatický obraz
Fine speckled cytoplasmic	5.1. Fine speckled cytoplasmic	25. Jemne zrnitý cytoplazmatický obr.
Mitochondrial like	5.3. Mitochondrial like	23. Mitochondriální obraz
Lysosomal like	5.4. Lysosomal like	27. Lysozomální obraz
Golgi like	5.5. Golgi like	29. Golgiho aparát
Vimentin like	5.7. Vimentin like	32. Vimentin
	5.6. Actin like	30. Aktin
Contact proteins		
		28. Peroxizómy
		31. Tropomyosin
		33. Cytokeratin
		26. Anti-SRP
Spindle apparatus		
Centriole (centrosome)	4.1. Centriole	16. Centrioly
Spindle pole (NuMa) (MSA-1)	4.2. Spindle pole (NuMa)	18. Póly delícího vreténka
Spindle fibre	4.3. Spindle fibre	17. Vlákna delícího vreténka
Midbody (MSA-2)	4.4. Midbody	19. Delící telésko (MSA-2)
CENP-F (MSA-3)	4.5. CENP-F (MSA-3)	21. Centroméra F (MSA-3)
		22. Fluor. chromatínové deštičky

DYNEX

ALPHA MEDICAL

Zjednodušené vzory* IF obrazov ANA a im zodpovedajúce antigény detegované metódou IB**

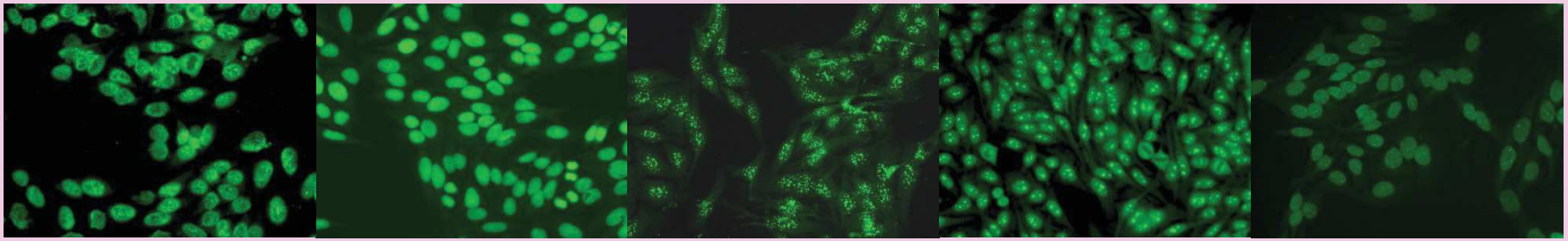
*porovnaj: Rigon A. et al., Cytometry Part B (Clinical Cytometry) 72B:472–477 (2007)

PORADIE	DRUH FLUORESCENCIE	POČET	PODIEL	ANTIGÉNY
1	Škvrnitá (zrnitá) IF nukleoplazmy	56/127	44,1 %	SSA/Ro, SSB/La, nRNP/Sm a Sm
2	Difúzne homogénna IF nukleoplazmy	30/127	23,7 %	dsDNA, históny, Scl-70 *** (aj iné)
3	Mnohopočetné bodky v nukleoplazme	22/127	17,3 %	CENP-B, Sp100
4	Bodková IF jadierok	13/127	10,2 %	RNApoly, fibrilarín
5	Ojedinelé bodky v jadre	6/127	4,7 %	
Spolu		127/127	100 %	

** vybrané z celkového počtu 5518 sér vyšetrených v priebehu roka 2011 (2,3 % sér bolo pozitívnych metódou nepriamej IF)

***zriedkavo až splývajúca inokedy jemne zrnitá fluorescencia (Scl-like)

DYNEX



1 2 3 4 5

Štatistické porovnanie frekvencie ANA pri detekcii metódami IF a IB

ALPHA MEDICAL

Výsledky testu nepriamej IF v porovnaní s testom imunoblot (IB)

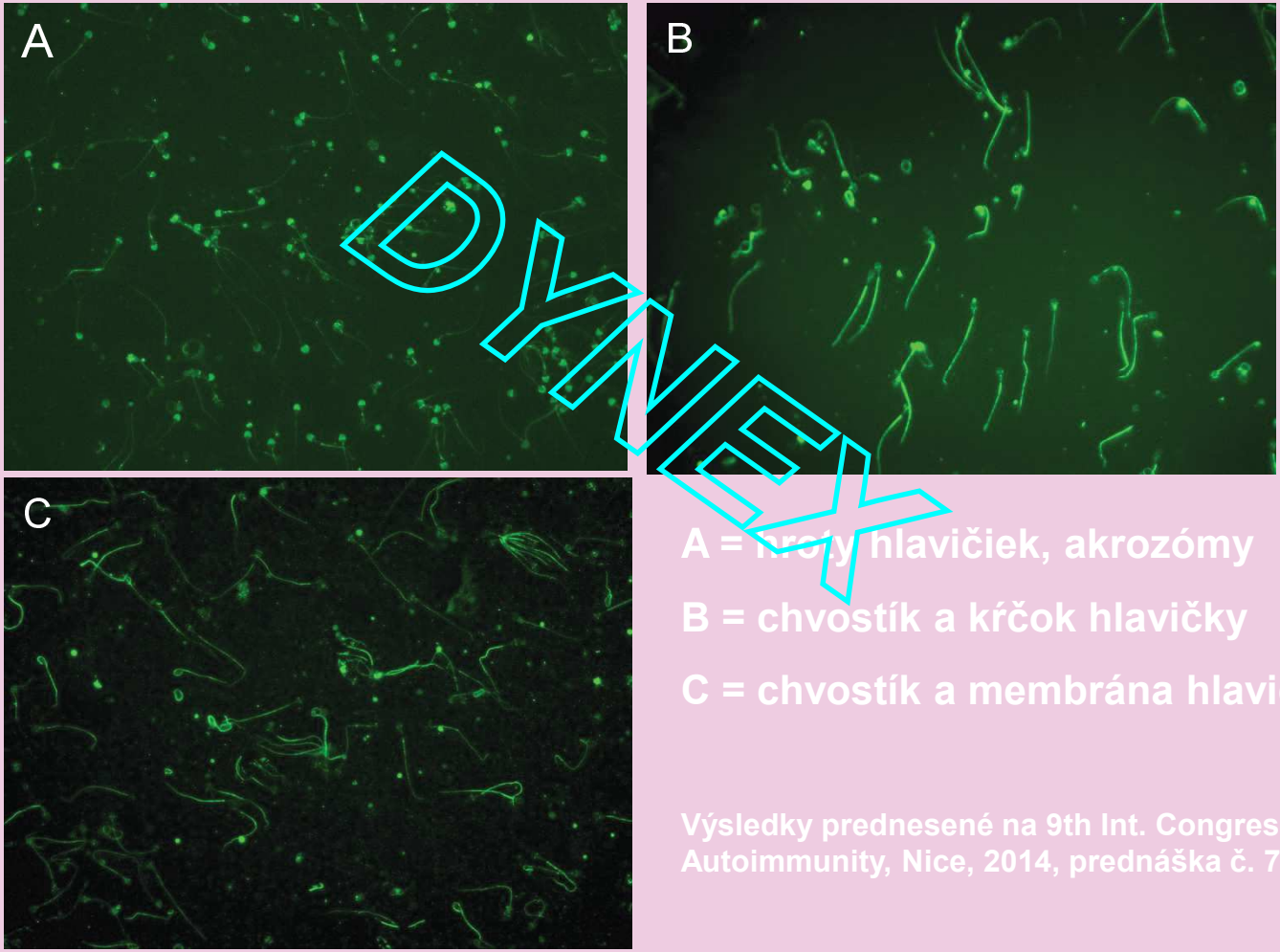
IF test negatívny <1:100	*Typ IF*	*IF test pozitívny*	Imunoblot pri pozitívnom IF teste			
			pozitívny	negatívny	spolu	nerobený
	1	56	42	3	45	11
	2	30	9	7	16	14
	3	22	15	2	17	5
	4	13	2	3	5	8
	5	6	0	3	3	3
	Spolu	127	68	18	86	41
Celkom 407	IB test pozitívny pri negatívnom alebo spornom výsledku IF testu					

DUNEX

Porovnanie výsledkov testovania ANA oboma metódami pri dvoch súboroch sér

* rovnaký pomer vzhľadom na dĺžku sledovaného obdobia
** pokles relatívneho počtu sér, ktoré neboli vyšetrené testom IB
***relatívny vzostup počtu

Základné IF obrazy pri detekcii ASA (anti-sperm antibody)



DYNEX

A = kroty hlavičiek, akrozómy

B = chvostík a krčok hlavičky

C = chvostík a membrána hlavičky

Výsledky prednesené na 9th Int. Congress on Autoimmunity, Nice, 2014, prednáška č. 753)

Štatistika ASA na základe archívneho materiálu*

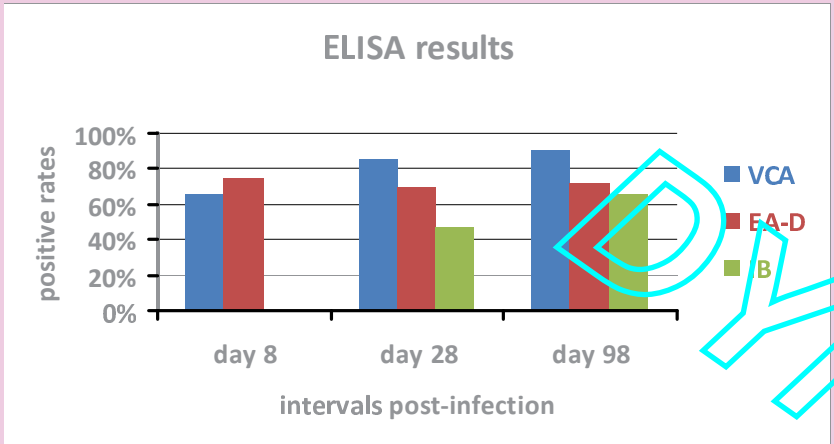
ALPHA MEDICAL

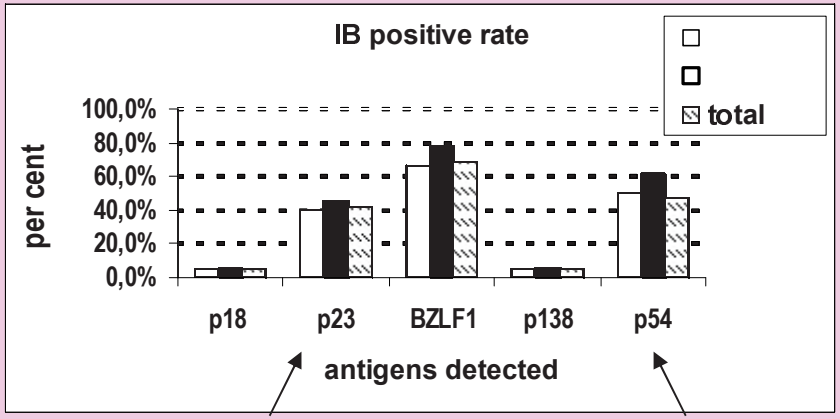
	18.565			
	4 258		22,9 %	
	281		1,52 %	6,6 %
Výrazná fluorescencia ASA spolu	160		0,86 %	3,76 %

DYNEX

1. Membrána hlavičky	3 %	1+4 (13 %); 1+3+4 (8%)	24 %
2. Akrozóm hlavičky	18 %		18 %
3. Chvostík	13 %	3+4 (26%), [1+4 (13 %)], [1+3+4 (8%)]	39 %
4. Krčok a prech. oblasť	18 %	[1+3+4 (8%)], [3+4 (26%)]	18 %

Porovnanie vysledkov IB a ELISA (za praxe virológa)





- EA-D je protilátka ku skorej bielkovine p54, ktorá je kofaktorom DNA polymerázy a je indukovaná vírusom (v blote posedný stĺpček).
- VCA je protilátka ku kapsidovému proteínu, ktorý je súčasťou častice (v blote 2 stĺpček). ELISA je síce mierne citlivejšia ale súčasne môže byť menej špecifická (vidno najmä pri antigéne VCA)
- Príklad ukazuje výsledky stanovenia protilátok proti 5 antigénom vírusu EBV (pri metóde IB) alebo 2 antigénom EBV (pri metóde ELISA). Dva antigény sa zhodujú (šípky).

DYNEX