

Az Immunológiai betegségek laboratóriumi diagnosztikája

Nagy Eszter

*Országos Reumatológiai és Fizioterápiás Intézet,
Immunológiai Laboratórium*

*Semmelweis Egyetem, Laboratóriumi Medicina Intézet,
Immunológiai Laboratórium*

Immunológiai betegségek diagnózisa

- ❖ Anamnézis, fizikális vizsgálat 30%
- ❖ Rutin laboratóriumi vizsgálatok, vérkép, gyulladáshoz kapcsolódó aktivitás (süllyedés, CRP) kémiai és vizeletvizsgálat, stb. 20%
- ❖ Képző eljárások (röntgen, ultrahang, MR, CT, EKG stb.) 20%
- ❖ Szöveti vizsgálatok 20%
- ❖ **Immunológiai laboratóriumi vizsgálatok 10 – 20%**

❖ **Immunológiai laboratóriumi vizsgálatok:**

- I. Autoantitest vizsgálatok**
- II. Komplementrendszer vizsgálata
- III. Immunglobulinok vizsgálata
- IV. Kryoglobulinok vizsgálata
- V. Allergia vizsgálatok
- VI. Egyéb

I. Autoantitest vizsgálatok

Autoantitest vizsgálatok fontossága:

- **Diagnózis** felállítása, megerősítése – „marker” autoantitestek (ACPA, dsDNS at., CL at., tTG at., TPO at.)
- Egyes **alcsoportok, rizikócsoportok** elkülönítése
- **Prognózis** felállítása – „prognosztikus” autoantitestek (pl. ACPA, anti-ds-DNS at., anti-Ribosoma at.)
- **Betegség súlyosságának megítélése**
- **Terápia eredményességének megítélése** – **terápiás hatást** mérő autoantitestek (pl. dsDNS at., ANCA, GBM at.)
- **Átfedő (overlap) kórképek fennállásának megállapítása**

A betegség egy adott időpontjában jelen lévő autoantitestek a betegség folyamatának „biológiai ujjlenyomata”

Autoantitestek kimutatása régen és ma

- Kevesebb módszer
- Kevesebb vizsgálat
- Laboratóriumok a klinikákon, klinikusok felügyeletével:

Reumatológus

- Gyakori információcsere



- Napjainkban a laboratóriumok többsége önállóan működik
- Sok az új vizsgálati módszer
- Nagy vizsgálatszám
- Az információcsere jóval ritkább

Reumatológus

Dermatológus

Belgyógyász

Nefrológus

Gasztroenterológus

Hematológus

Nőgyógyász

Az autoantitestek kimutatásának laboratóriumi módszerei

a. Indirekt immunfluoreszcencia (IIF) **autoantitestek szűrése**

- Sejtek: HEp-2
- Szövetek: rágcsáló, majom

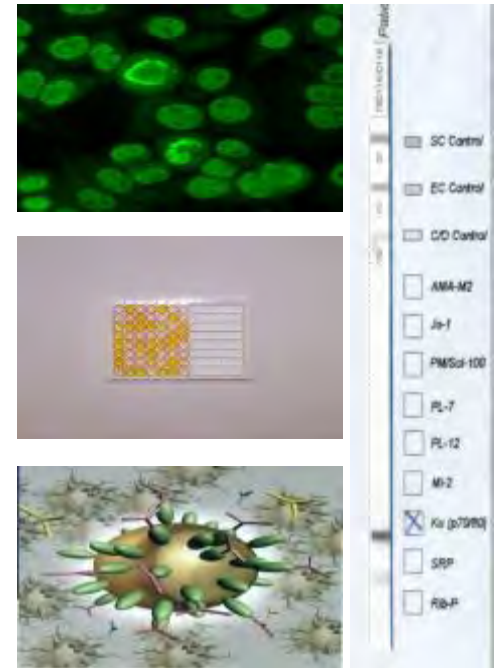
b. ELISA

c. Kemilumineszcencia

d. Immunoblot:

- **Western blot**
- **Line blot**
- **Dot blot**

**Konfirmáció
(autoantitest
specifitás)**



A módszer kiválasztása a laboratórium döntése a lehetőségek függvényében

Fontos: az autoantitest specifitás diagnosztikai értéke a módszer függvényében változik!

Egy autoantitest diagnosztikai markerként való használhatósága az alábbi paramétereiktől függ:

Szenzitivitás:
$$\frac{\text{Adott **teszttel pozitív** betegek száma (pl. 120)}}{\text{A BETEGEK száma (pl. 150)}} = 80\%$$

Specifititás:
$$\frac{\text{Adott **teszttel negatív** betegek száma (pl. 92)}}{\text{A betegségben NEM szenvedők száma (pl. 100)}} = 92\%$$

Pozitív prediktív érték (PPV) = Annak a valószínűsége, hogy a betegség fennáll pozitív teszt esetén

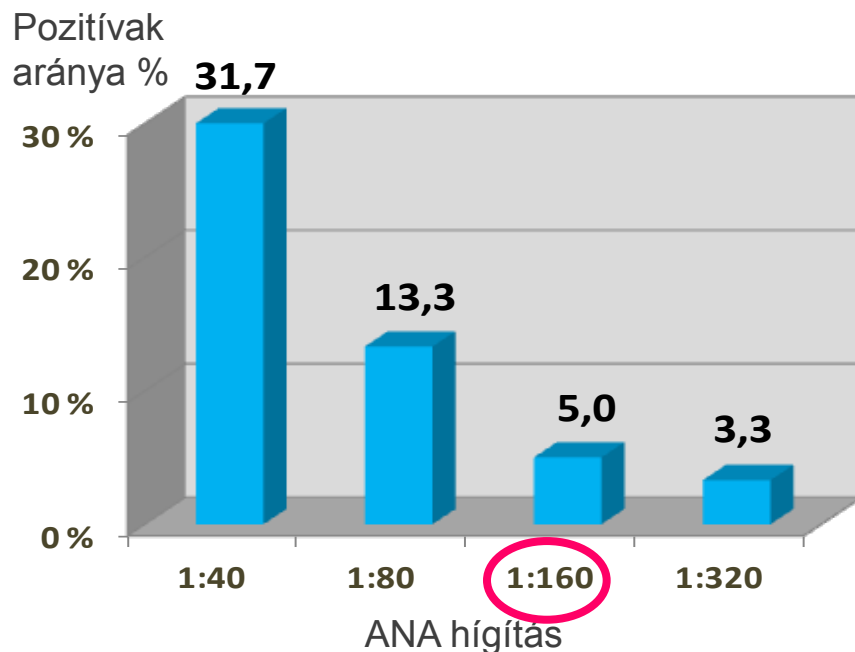
Negatív prediktív érték (NPV) = Annak a valószínűsége, hogy a betegség nem áll fenn negatív teszt esetén

IDEÁLIS: ha mind a szenzitivitás, mind a specifititás 100 %
(*diagnosztikai marker autoantitestek egyike sem teljesíti ezt a feltételt!*)

Magasabb szenzitivitás és specifititás - jobb megbízhatóság
(*de minél szenzitívebb egy teszt, annál alacsonyabb a specifitása!*)

1. Antinukleáris antitest (ANA)

- gyűjtőnév, sokféle antitest specificitást jelent
- előfordulás: szisztémás és szervspecifikus autoimmun kórképekben, tumorokban, fertőzésekben, gyulladásokban
- „Gold standard” az immunfluoreszcens teszt - jellemzője: magas szenzitivitás, alacsony specificitás



1:160 titer fölötti pozitív lelet esetén további diagnosztikai vizsgálatok!

Az ANA pozitív arányának változása a hígítás függvényében, egészséges populációban

ANA gyakorisága különböző betegségekben (%-ban)

SLE	80-100
Gyógyszer-indukálta LE	70
MCTD	100
Sjögren szindróma	70
Felty szindróma	70-100
PSS	75-85
PM/DM	30
RA	15-30
CAH	40-60
Tüdőfibrosis	20
Tuberculosis	50
Tumorok	10
Egészes kontroll	< 5

Mégis mikor kérjük ANA vizsgálatot?

- **Szisztémás autoimmun betegségek** (SLE és rokon kórképek) gyanúja
- **Autoimmun hepatitis** gyanúja
- **JIA** (differenciál diagnosztikai és prognosztikai célból)

DE monitorozásra nem alkalmas!

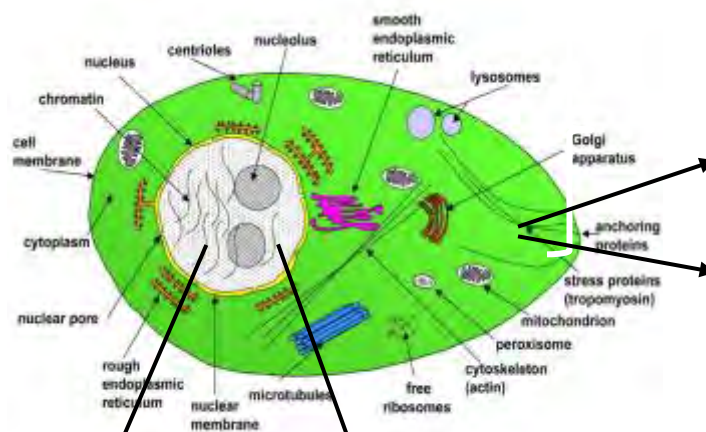
ANA vizsgálata immunfluoreszcens módszerrel – HEp-2 sejteken

A sejt különböző alkotórészei elleni antitestek:

- sejtmag
- sejtmag membrán
- nukleolusz
- citoplazma
- citoszkeleton

„mini-array” (több mint 100 Ag)

A módszer előnye: intakt HEp-2 sejtek, az antigén natív formában van jelen!

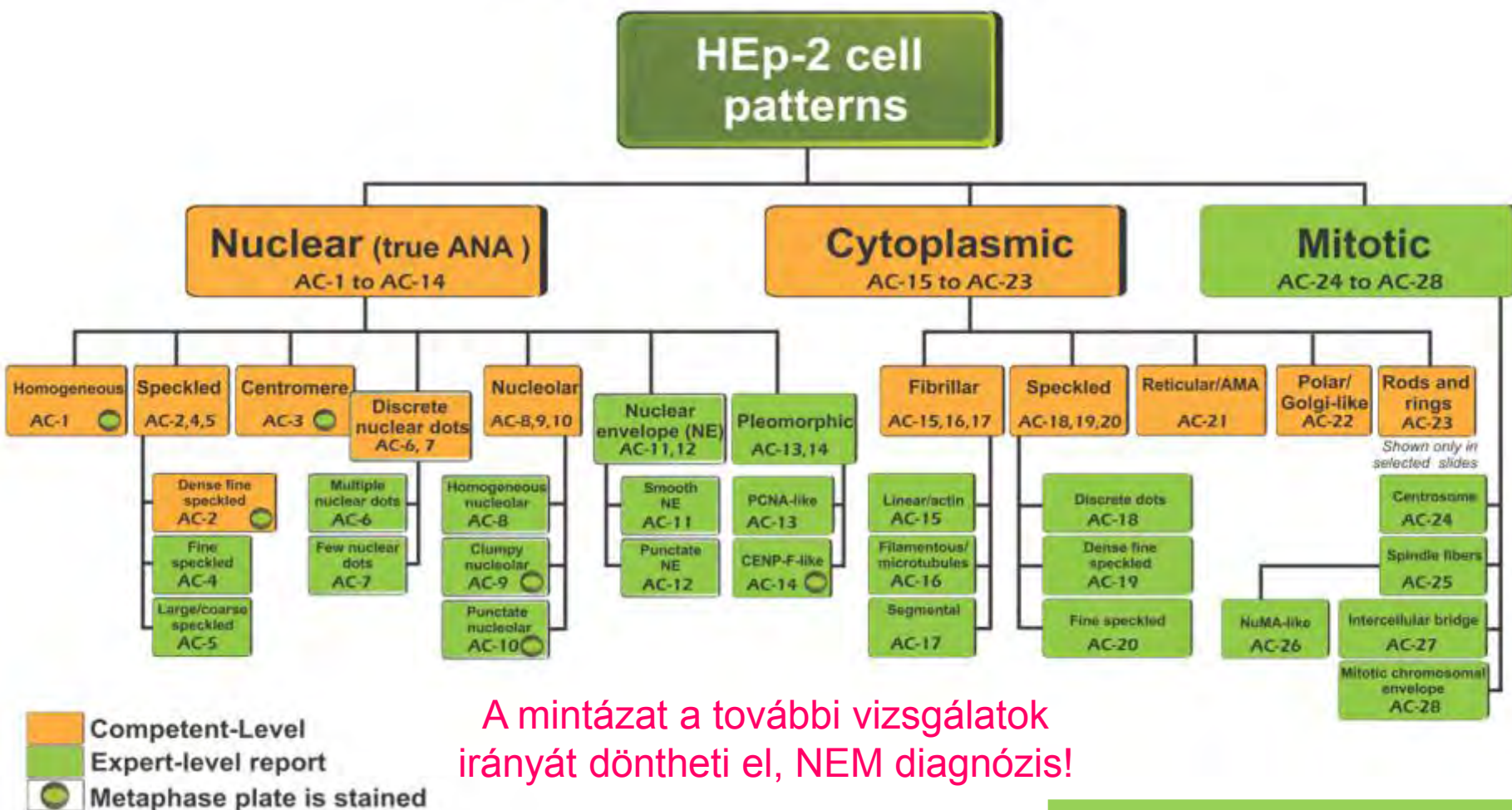


Bradwell A.E. & Hughes R.G. Atlas of Hep-2 patterns

- | | | |
|--------------|-------------|-------|
| - DNS | - SSA | } ENA |
| - Hiszton | - SSB | |
| - Nucleosoma | - Sm | |
| | - RNP | |
| | - Scl-70 | |
| | - PM-Scl | |
| | - Ku (PM) | |
| | - Mi-2 (PM) | |
| | - Sp-100 | |
| | | |

- AMA
- Ribosoma
- Jo-1, SRP, PL-7, PL-12
- Golgi, lysosoma,
- Peroxisoma
- Mitótikus orsó
- F-Actin
- Vimentin
- Midbody, CENP-F

ANA mintázatok - Nemzetközi Konszenzus (International Consensus on ANA pattern (ICAP))

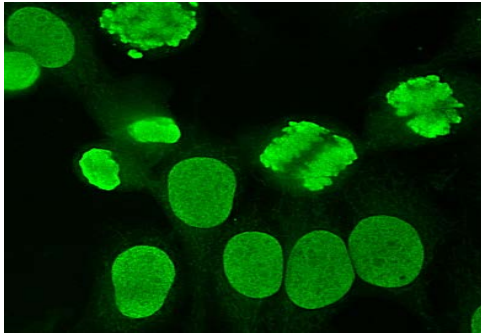


A mintázat a további vizsgálatok irányát döntheti el, NEM diagnózis!

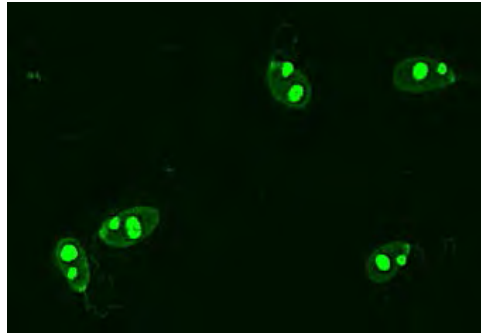
2. Anti-dsDNS antitest (nDNS at.):

- **SLE diagnosztikai markere** (ACR, SLICC kritérium), de negativitása nem zárja ki az SLE diagnózist
- **Prognosztikai marker** - jelenléte súlyosabb formára utal (legfontosabb a vese és CNS manifesztáció)
- A betegség **aktivitás markere** - monitorozása is alkalmas (de a negativitás nem zárja ki teljesen az exacerbáció fellépését)

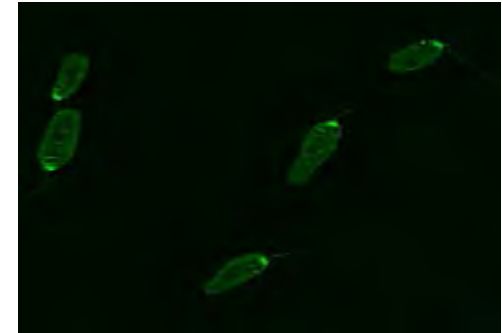
A magasabb érték SLE-re utal, negativitása nagy valószínűséggel kizárja az aktiv SLE-t



Pozitív dsDNS antitest képe HEp-2 sejteken



Pozitív dsDNS antitest képe *Crithidia luciliae*-n



Negatív dsDNS antitest képe *Crithidia luciliae*-n

3. Hiszton antitest:

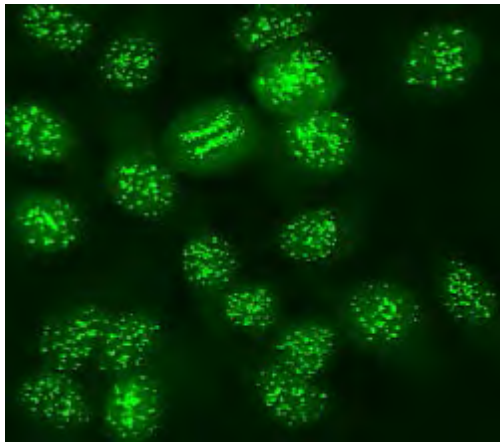
- Nagyon sok szisztémás autoimmun betegségben előfordul (SLE, DLE, RA, JIA, SSc)
- Diagnosztikai jelentősége a gyógyszer indukálta lupusban van – **DLE markere**
- Szisztémás sclerosisban az antitest jelenléte tüdő, vese, szív érintettségére utal

4. Centromer antitest:

- Az antitest leggyakoribb targetje a CENP-B (80 kDa) – az SSc és Raynaud betegek > 95%-ban
- Egyike azon antitesteknek, mely egyértelműen azonosítható IIF módszerrel (jellegzetes mintázat miatt)
- **SSc, CREST szindróma** és további **limitált kután** formák **diagnosztikai markere**
- További előfordulás:

PBC: antitest jelenléte a scleroderma egyidejű fennállására utal

Sjögren szindróma (a betegek 15%-ban) - kizárólag CENP-C (SS-A/Ro antitesttel együtt) vagy CENP-H antitest



Pozitív Centromer antitest képe HEp-2 sejteken (jellegzetes mintázat)

5. ENA - extrahálható nukleáris antigének elleni antitestek:

- **SS-A/Ro és SS-B/La antitest:**

Diagnosztikai jelentősége primer vagy szekunder **Sjögren szindrómában**, neonatalis lupus gyanúja valamint diagnózisa esetén van. A két antitest gyakran együtt fordul elő.

További előfordulás: SLE, SCLE, RA, Myositis

- **Sci-70 antitest (DNS-topoizomeráz I elleni antitest):**

Az SSc diagnosztikai markere, és rossz **prognosztikai** faktor. A Raynaud tünetes betegek egy részében szintén kimutatható, ezekben a betegekben az SSc kialakulásának nagy a kockázata.

- **Jo-1 antitest (aminoacil-tRNS szintetáz antitest):**

Idiopathiás myositis diagnosztikai markere (anti-szintetáz szindróma, ASS) -
diagnosztikai specificitás 100%

Differenciál diagnosztikai marker: myositis és fibrotizáló alveolitis a Jo-1 pozitív betegek 60%-ban

Prognosztikai marker: súlyosabb klinikai forma, a Jo-1 pozitív betegek 70%-ban intersticiális tüdőbetegség (ILD) is jelen van

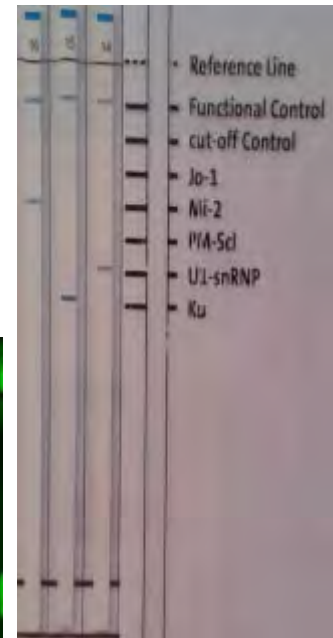
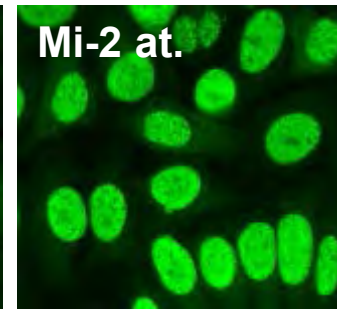
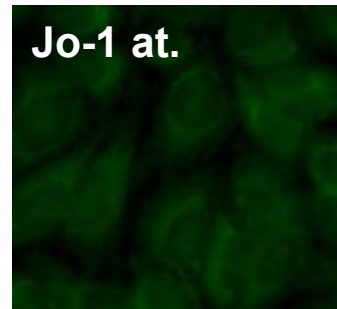
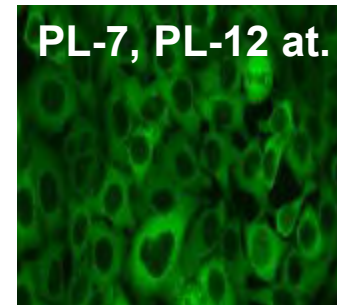
További myositis specifikus antitestek: PL-7, PL-12, SRP, Mi-2

kimutatásában a Hep-2 sejtek citoplazma vagy sejtmag mintázata diagnosztikus értékű

Myositis antitestek kimutatása IIF és Immunoblot módszerrel

Myositis specifikus antitestek:

- **Jo-1*** (ASS)
- PL-7 (ASS)
- PL-12 (ASS)
- EJ (ASS)
- OJ (ASS)
- **SRP** (Nekrotizáló Myositis)
- Mi-2 (DM)
- TIF-1g (p155/140) (DM, CDM)
- MDA-5 (C-ADM, ILD)
- SAE (DM, ILD)
- NXP2 (p140) (JDM, kalcinózis)



Myositis asszociált antitestek:

- **PM-Sci*** (PM, DM, Scleroderma overlap)
- Ku (Scleroderma overlap)
- **U1-snRNP*** (MCTD)
- **SSA (Ro-52, Ro-60)***

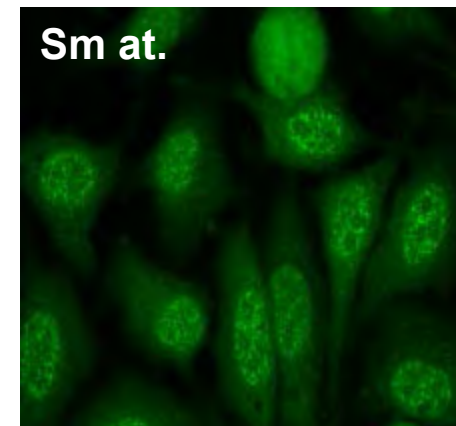
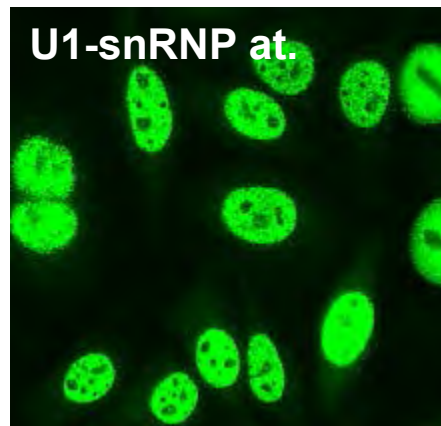
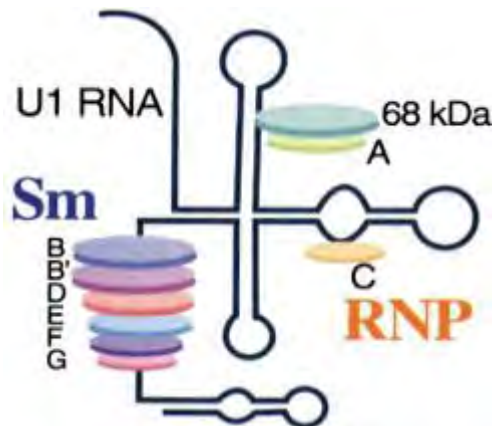
Myositis antitestek képe HEp-2 sejteken

ASS: anti-szintetáz szindróma, CDM: tumor asszociált DM, C-ADM: amyopathiás DM, ILD: interstitial lung disease, JDM: juvenilis DM

***ELISA teszt is elérhető**

5. ENA (folytatás):

- **U1-snRNP:** az Sm-RNP komplex része (target antigének: 70 kDa, A, C)
Az **MCTD diagnosztikai markere** (100% specificitás), hiánya gyakorlatilag kizárja az MCTD-t
További előfordulás:
SLE-ben (13-32 %) pozitivitása bőr és nyálkahártya léziókkal, SSc-ben (10 %) jelenléte tüdőfibrózissal függ össze
- **Sm antitest:** fő target antigén a D1 fehérje
SLE diagnosztikai markere (ACR és SLICC kritérium), 99% specificitás, de alacsony (5-10 %) szenzitivitás
Prognosztikai marker: pozitivitása szervi érintettséggel (vese, CNS), valamint bőrtünetekkel korrelál



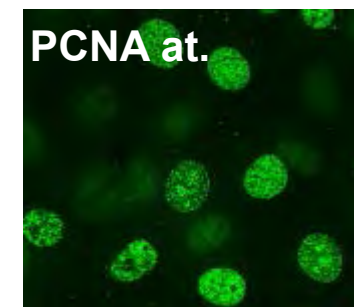
6. **P-Ribosoma antitest:** Target antigén a ribosoma-komplex fehérjei (P0, P1, P2)

- **SLE diagnosztikai markere** (10-35 %)
- **Prognosztikai marker?** Pozitívása a betegség aktivitásával, lupus nephritis elfordulásával korrelál



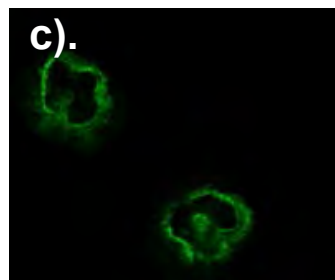
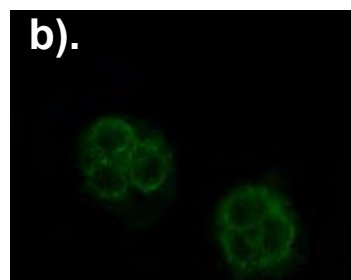
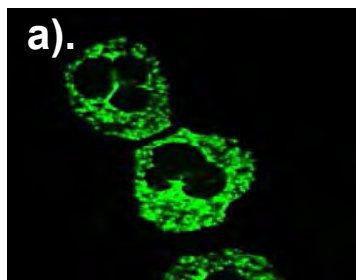
7. **PCNA antitest:**

- Nagyon specifikus SLE-re, de ritkán fordul elő (az esetek 3%-ában)
- Pozitívása vese és idegrendszeri érintettséggel, valamint thrombocytopaeniával korrelál



8. **Anti-neutrofil citoplazma antitestek (ANCA):**

- A neutrofil granulociták citoplazmájában lévő antigének elleni antitestek: **proteináz 3 (PR3)**, **myeloperoxidáz (MPO)**, elasztáz, laktoferrin, baktérium permeabilitást fokozó protein (BPI), katepszin G, lizozim



ANCA IIF képe etanollal fixált humán granulocitákon:
a) c-ANCA, b) p-ANCA,
c) atípusos-ANCA

8. Anti-neutrofil citoplazma antitestek (ANCA), folytatás:

Az ANCA vizsgálat elvégzése javasolt:

- ANCA asszociált vasculitisek gyanúja
 - Nephritisek differenciáldiagnózisa
 - Gyulladásos bélbetegségek (elősorban colitis ulcerosa)
 - Primer sclerotizáló cholangitis
 - Vérzéses alveolitis
- **PR3 antitest: Wegener granulomatózis (GPA) diagnosztikai markere** (specifitás 95-98 %). A **betegség aktivitásának**, és a **terápia hatásosságának** megítélésére is szolgál. Specifitása magas a GPA korai, valamint atípusos formáira is. Előfordul más szisztémás vasculitisekben is.
 - **MPO antitest: a mikroszkópikus polyangiitis (MPA) és a „pauci-immun” fokális nekrotizáló glomerulonephritis diagnosztikai markere.** Előfordul még gyors progressziójú glomerulonephritisben, ritkábban Churg-Strauss szindrómában. Goodpasture szindrómában a betegek 30-40 %-ban fordul elő. Az antitest titere gyakran korrelál a betegség aktivitásával.
Szisztémás autoimmun betegek egy bizonyos százalékában szintén előfordul (SLE, RA).

ANCA előfordulása gyulladáisos reumatológiai kórképekben

Kórkép	ANCA / Gyakoriság	Target Antigén
Wegener granulomatosis	c-ANCA 75-80 % p-ANCA 10-15 %	PR3 MPO
Mikroszkópikus polyangiitis	c-ANCA 25-35 % p-ANCA 50-60 %	PR3 MPO
Churg-Strauss szindróma	c-ANCA 10-15 % p-ANCA 55-60 %	PR3 MPO
SLE	p-ANCA 20-30 %	BPI, CG, LF
RA	p-ANCA 30-70 %	LF, HMG1/2, BPI , PR3
Colitis ulcerosa	p-ANCA 50-70 %	CL, BPI, HMG1/2
Crohn-betegség	p-ANCA 20-40 %	CG, LF, EL, MPO, PR3
Sclerotizáló cholangitis	p-ANCA 60-70 %	BPI, LF
Autoimmun hepatitis	p-ANCA 33-90 %, c-ANCA 45%	Actin, HMG1/2, LF
PBC	p-ANCA 30-40 %	LF, BPI, HMG1/2
<i>Krónikus infekció</i>	<i>p-ANCA , c-ANCA</i>	BPI, LF, MPO, PR3

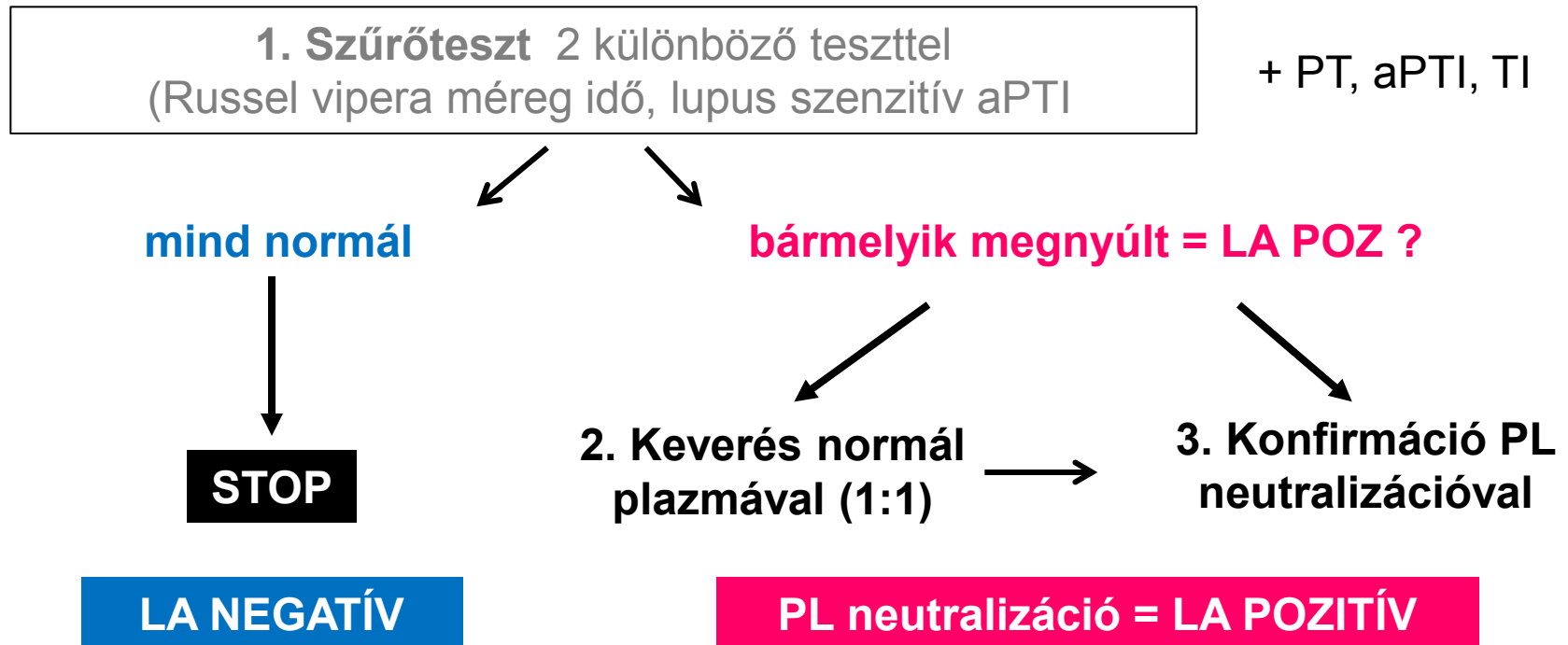
8. C1q antitest:

- Jelenléte gyakori immunkomplex (IC) mediálta betegségekben: **hypocomplementaemiás-urticaria vasculitisben** 100 %-ban pozitív (**diagnosztikai marker**)
SLE-ben (17-58 %) jelenléte veseérintettséggel korrelál (elsősorban membranoproliferatív glomerulonephritissel), **aktív lupus nephritisben** a betegek 89 %-ában pozitív. dsDNS antitesttel való együttes előfordulása lupus nephritisre utal (specifitás 90 %, szenzitivitás 91 %).

9. Antifoszfolipid (aPL) antitestek:

- Negatív (anionos) töltésű, vagy neutrális foszfolipidek, illetve a hozzájuk kötődő glikoproteinekkal alkotott komplexei elleni antitestek gyűjtőneve.
Legfontosabbak: kardiolipin (CL), béta-2-glikoprotein I, prothrombin, lupus anticoaguláns (LA)
- Az aPL antitestek vizsgálata ajánlott: **primer és szekunder antifoszfolipid szindrómában** (APS, **diagnosztikai marker**), SLE gyanúja esetén (**diagnosztikai kritérium**), SLE és más szisztémás autoimmun kórképekben a thrombózis és spontán vetélés rizikójának megítélésében, ismeretlen eredetű thrombocytopeniában, **APS-ben** a **kezelés hatékonyságának** megítélésében

LA vizsgálat algoritmus (funkcionális teszt)



Többi anti-PL antitest vizsgálata ELISA-val: target antigén tisztított foszfolipid és egy kofaktor (Béta-2-GPI, Prothrombin) komplexe

FONTOS! aPL antitestek interpretációja az ajánlásnak megfelelően:

CL (G/M) antitest, mérsékelt/magas titer, 2 vagy több alkalom (12 hét különbség)

Béta-2-GPI (G/M) antitest, 2 vagy több alkalom (12 hét különbség)

LA (meghatározás az *ISTH [2009] ajánlása szerint*), 2 vagy több alkalom (12 hét különbség)

SLE-ben a CL IgA és Béta-2-GPI IgA antitest is diagnosztikus értékű (SLICC krit.)!

10. Rheumatoid Faktor (RF):

- Az IgG immunglobulin Fc részének CH2 és CH3 doménjei ellen termelt autoantitest (elsősorban IgM izotípusú, de lehet IgG és IgA is)
- Rheumatoid arthritises betegek (RA) 70-80 %-ban pozitív (**diagnosztikai kritérium**, ACR/EULAR), de az RA korai stádiumában gyakran negatív!
- Az RF titere nem korrelál a betegség aktivitásával, de a magas titer agresszívebb betegségre utal
- Igen gyakori **esszenciális kevert kryoglobulinaemiában** (II. típusban 100 %)
- Sok más autoimmun betegségben (SjS, SLE, SSc, MCTD, PM, JIA), infekciót követően, de akár egészségesekben is pozitív lehet – specificitása nagyon alacsony

RF előfordulása különböző betegségekben (%-ban)

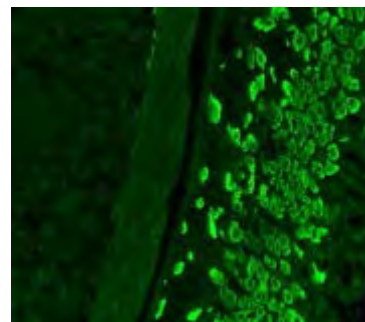
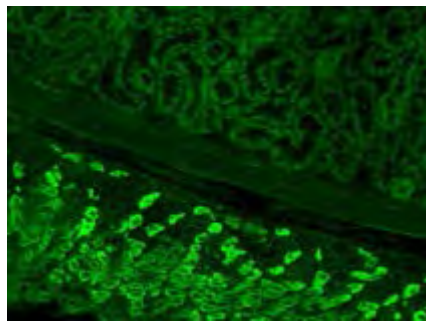
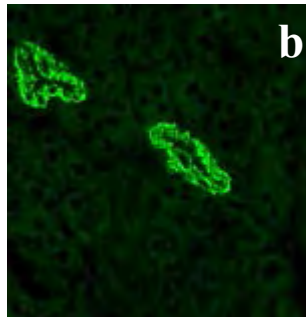
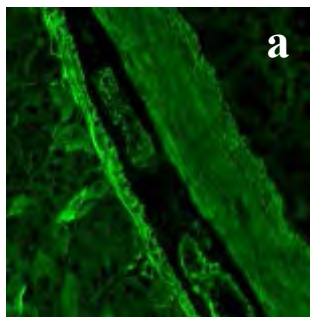
RA	50-90
SjS	75-95
SLE	15-35
SSc	20-30
Kryoglobulinaemia	40-100
MCTD	50-60
Endocarditis	25-50
Májcirrhosis	15-40
Sarcoidosis	3-33
Tüdőfibrosis	10-50
Silicosis	30-50
Vírus infekciók	15-65
Tumorok	5-25
Kontroll	< 5

11. Citrullinált proteinek / peptidek elleni antitestek (ACPA):

- Gyűjtőnév: Ciklikus citrullinált peptid antitest (CCP), citrullinált vimentin antitest (MCV), citrullinált fillagrin antitest
- **RA diagnosztikai markere**, az RA korai stádiumában gyakran pozitív, diagnosztikai specificitása meghaladja az RF-ét (RF negatív RA-s betegek 60 %-ban pozitív)
- Erozív arthritis **prognosztikai markere**
- **JIA**-ban a jelenléte poliartikuláris manifesztációval korrelál
- Más autoimmun betegségben jóval kisebb arányban (0-10 %), infekciót követően ritkán fordul elő (0-2 %, kivétel: aktív tuberkulózis)

12. SZERVSPECIFIKUS autoantitestek:

- **Anti-mitokondriális antitestek (AMA, M1 – M9):** leggyakrabban előforduló és legnagyobb klinikai jelentőségű a piruvát-dehidrogenáz komplex alegységei elleni antitest (**AMA-M2**). Az AMA antitest pozitivitás **primer biliáris cirrhosisban (PBC) diagnosztikus** értékű. Jelenléte tünetek hiányában a PBC későbbi kialakulására utal. Az antitest kimutatása IIF módszerrel történik. **PBC-re** specifikus további antitestek: ***sp100, gp210, centromer-antitest, símaizom elleni antitest (SMA)***.
- **Símaizom elleni antitest (SMA):** több target antigén (**F-aktin**, myosin, tropomyosin, vimentin, tubulin). Gyakran pozitív I-es típusú autoimmun hepatitisben (AIH) és PBC-ben, de krónikus vírusos hepatitisben, alkoholos májcirrhosisban, néha egészségesegekben is előfordul, ezért diagnosztikai értéke alacsony. I-es típusú AIH-ben a betegek 60%-ban ANA-val társul. **I-es típusú AIH-re** specifikus további antitestek: **szolubilis máj antigén / máj-pankreász elleni antitest (SLA/LP)**.
- **Anti-mikroszomális antitest (LKM):** citokróm P4502D elleni antitestek (LKM 1-3). Az LKM1 antitest a II-es típusú AIH-re jellemző (a betegek 80-95 %-ban pozitív), ritkán krónikus hepatitiszekben is előfordul. **II-es típusú AIH-re** specifikus további antitest: **máj citoszol antitest (LC1)**.



SMA antitest képe egér gyomor (a) és vese meszeten (b)

AMA képe egér gyomor / vese meszeten

PCA képe egér gyomor meszeten

Pozitív EMA képe majom nyelőcső metszeten
(R.G.Hughes et. Al., Atlas of tissue autoantibodies)

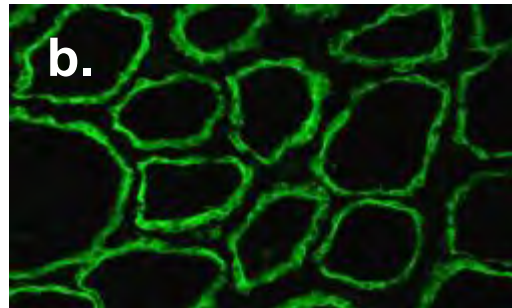
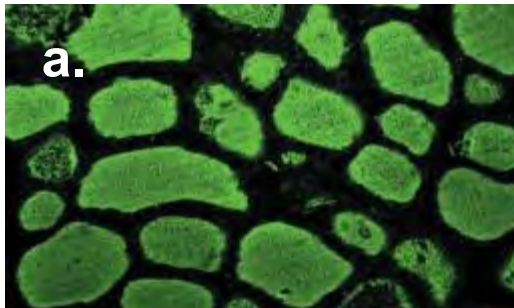
- **Parietális sejt elleni antitest (PCA):** gyomor K^+/Na^+ ATP-áz α és β alegysége elleni antitest. Előfordulása **krónikus atrophias gastritisre**, valamint **anaemia perniciosára** jellemző (az esetek 90 %-ban pozitív). Anaemia perniciosa gyanúja esetén **intrinsic faktor** elleni antitest vizsgálat elvégzése is javasolt – a két antitest együttes jelenléte szoros korrelációt mutat a betegséggel.
- **Szöveti transzglutamináz (tTG) / endomysium (EMA) / gliadin elleni antitestek:** coeliakiában és dermatitis herpetiformisban diagnosztikus értékű antitestek (elsősorban az IgA izotípus). Az alacsonyabb szenzitivitású IgG antitestnek az IgA hiányos coeliakiás betegekben van jelentősége. A deamidált gliadin peptid elleni antitestnek (**DGP**) gyerekeknél (< 5 év alatt) tTG / EMA antitest hiányában van diagnosztikai jelentősége. Az antitestek a **betegség monitorozására** is alkalmasak (terápiás hatást mérő – diéta követése, esetleges glutén szennyezés).

- **Pajzsmirigy elleni antitestek:** a pajzsmirigy különböző enzimjei és fehérjéi elleni antitestek (anti-thyroglobulin-TG, anti-thyroid-peroxidáz-TPO, anti-TSH-Receptor elleni antitest-TRAK).

TG antitest: általában a TPO antitestek előtt jelennek meg, előfordulása: - Hashimoto thyreoiditis (75 %), autoimmun hyperthyreosis (30 %), pajzsmirigy adenoma és carcinoma (10-50 %)

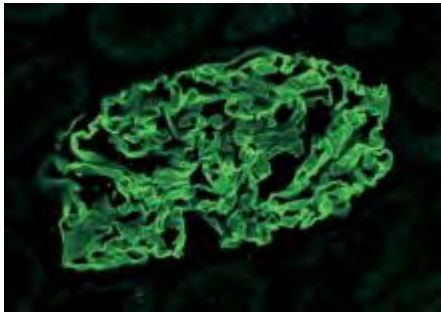
TPO antitest: pajzsmirigy szövetkárosodást követően jelenik meg. Előfordulás: Hashimoto thyreoiditis (100 % - titere korrelál a betegség aktivitásával), postpartum thyroiditis (66 %), Basedow Graves kór (75 %), primer és secunder SjS (11-17 %), gyakori asszociáció vetéléssel és infertilitással!

TRAK: előfordulás: Basedow-Graves kórban (TSI – thyroid stimulating immunoglobulin – titere korrelál a betegség aktivitásával), Hashimoto thyroiditisben (TBII – thyroid binding inhibitory immunoglobulins), autoimmun thyrotoxicosisban, nem pajzsmirigy betegségekben (pl. SLE, SSc).

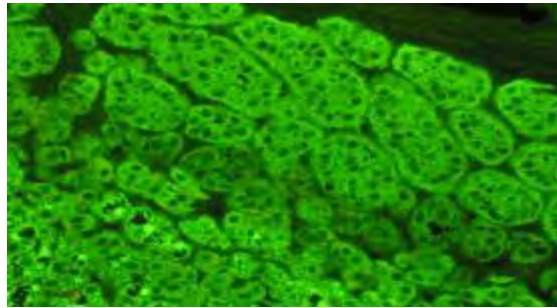


TG (a.) és TPO (b.) elleni antitest képe majom pajzsmirigy metszeten (*R.G.Hughes et. Al., Atlas of tissue autoantibodies*)

- **Anti-GBM antitest:** target antigénje a IV-es típusú kollagén $\alpha 3$ láncának globuláris doménje (NC1) . **GBM nepritisben és Goodpasture szindrómában diagnosztikus értékű** (definíció szerint mindig jelen van). Az antitest titere a betegség aktivitásával változik. A betegek 20-35 %-ban **ANCA**-val társul (elsősorban MPO), mely a GBM-antitest előtt megjelenhet (*jobb prognózis?*)



GBM antitest képe majom vese metszeten



Mellékvesekéreg elleni antitest IF képe majom mellékvese metszeten

(*R.G.Hughes et. Al., Atlas of tissue autoantibodies*)

- **Mellékvesekéreg elleni antitestek:** targetjei a szteroid dehydrogenázok (21 β -hidroxiláz-P450c21; 17 α -hidroxiláz P450c17). Az antitestek Addison kórra jellemzőek (21 β -hidroxiláz elleni antitest az esetek 90 %-ban).
- **Anti-Saccharomyces cerevisiae antitest (ASCA):** idült gyulladásos bélbetegségekben fordul (IBD) elő (az antitest pozitivitása ANCA hiányában Crohn betegségre, negativitása ANCA jelenlétében colitis ulcerosára utal)

- **Diabetesre jellemző antitestek:** a pancreas szigetsejt elleni antitestek (**ICA**) megjelenése az 1-es típusú diabetes korai markere (akár 8 évvel megelőzheti a betegséget):

Glutaminsav dekarboxiláz antitest (GAD65) a betegek 65-85 %-ban, LADA-ban 70-95 %

Tirozin foszfatáz elleni antitest (ICA512/IA-2) a betegek 50-75%-ban, LADA 11%-ban

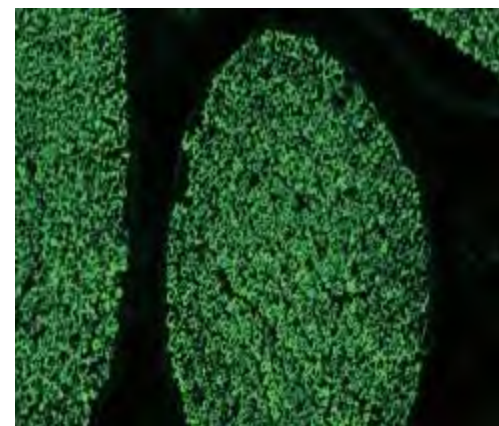
Inzulin elleni antitest a betegek 40-80%-ban fordul elő.

Zinc T18 transzporter (ZnT18) elleni antitest predikciója a többi antitest negativitása esetén kb. 26 %.

Az 1-es típusú diabeteses betegek rokonai körében 2 vagy több antitest együttes jelenlétének PPV értéke > 90% (ez a általános populációra is igaz), míg egy antitest pozitívitás esetén a betegség kialakulásának rizikója 20%.

- **Neurológiai betegségekre jellemző antitestek:** **Gangliozid és glycoprotein-saccharidok elleni antitestek** multifokális motoros neuropathiákban (GM1 antitest), Guillain-Barre szindrómában (GM1 és GD1a antitest) és Miller - Fisher szindrómában (GQ1a) fordulnak elő. Kimutatásuk immunoblot módszerrel történik.

Myelin asszociált glikoprotein (MAG) antitest perifériás neuropathiával asszociált IgM monoklonális gammopathiákra (Waldenström makroglobulinémia és MGUS) jellemző (az esetek 50 %-ban pozitív). Kimutatása immunfluoreszcens módszerrel történik.



Anti-MAG antitest képe majom ülőideg metszeten (*R.G.Hughes et. Al., Atlas of tissue autoantibodies*)

Acetilcolin Receptor (AChR) elleni antitest: Myasthenia gravis-ra jellemző antitest, a betegek 85 %-ban fordul elő. Más neurológiai betegségben és egészségesekben nem mutatható ki (magas specificitás). Az antitest koncentrációja a betegség súlyosságával korrelál. Kimutatása ELISA módszerrel történik.

Aquaporin-4 (AQP4) elleni antitest Neuromyelitis opticanban (NMO, Devic szindróma) **diagnosztikus értékű**, a betegek 75%-ban kimutatható (de a negativitás nem zárja ki az NMO-t!). Kimutatása majom cerebellum metszeten immunfluoreszcens módszerrel történik.

II. A komplementrendszer vizsgálata

Indikációja_elsősorban a **veleszületett komplement defektusok** kimutatása, valamint a különböző betegségekben (elsősorban szisztémás autoimmun kórképek) fellépő **szerzett komplement** rendellenességek szűrése, a betegség aktivitásának monitorozása

1. Összkomplement (CH50) meghatározása:

Leggyakoribb a klasszikus út aktivációjának vizsgálata ellenanyaggal kezelt birka vörösvérsejtek (bvvt), Ca^{2+} és Mg^{2+} ionok jelenlétében. Az enzimatis kaszkád végeredményeként a bvvt-k feloldódnak, a kiszabaduló hemoglobin mennyisége a minta komplement tartalmával arányos. Mértékegysége: CH_{50}/ml (a vizsgált minta 1 ml-e hány 50%-os hemolitikus egységet tartalmaz).

2. Komplement komponensek (C3, C4) meghatározása:

A C3 és C4 meghatározása nefelometriával vagy turbidimetriával történik. A betegség aktivitásra a CH_{50} -nél érzékenyebb (elsősorban C4).

3. Komplement aktivációs termékek vizsgálata: (ELISA, RIA módszerrel)

4. Keringő immunkomplex (IC) meghatározása:

Gyakran pozitív immunkomplex betegségekben (pl. SLE), de infekciókat követően is, ezért diagnosztikus értéke csekély

III. Immunglobulinok vizsgálata

1. Immunglobulinok (IgG, IgA, IgM) mennyiségi meghatározása:

Legfontosabb indikációja a **primer és szekunder humorális immundefektus diagnózisa, monitorozása**, valamint a malignus **paraproteinaemiák és benignus monoklonális gammopathiák (MGUS) elkülönítése**. A meghatározás nefelometriával vagy turbidimetriával történik.

2. Immunelektroforézis:

Legfontosabb indikációja a **paraproteinaemiák diagnózisa** (myeloma, Waldenström macroglobulinaemia, nehézlánc betegség, amyloidosis), valamint a **hypergammaglobulinaemiák differenciáldiagnózisa**. Az ehhez szükséges paraprotein analízis az utóbbi években immunelektroforézis helyett immunfixációval vagy kapilláris elektroforézissel történik.

3. Vizelet fehérje analízis:

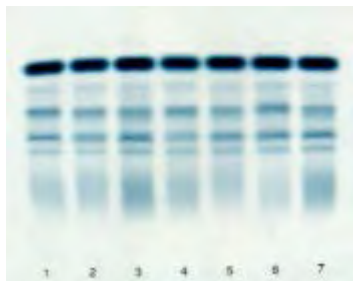
Az esetlegesen ürített könnyűlánc azonosítására, illetve a proteinúria szelektivitásának eldöntésére szolgál.

Paraproteinek kimutatásának algoritmus

Se ELFO / Se Ig G/A/M / Se protein koncentráció

vizuális értékelés

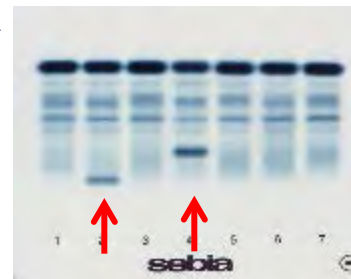
Normál ELFO kép /
Poliklonális Ig. szap.



nincs további
klinikai indikáció

STOP

Kóros / Kétes
M komponens



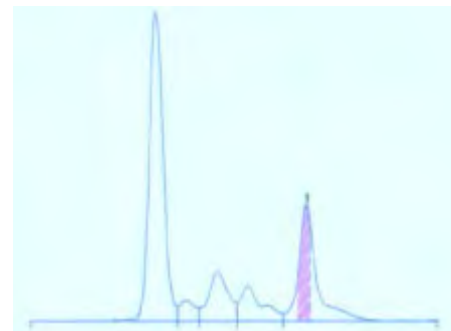
új beteg

IF, mennyiségi
meghatározás,
szérum κ/λ

Vélemény

ismert beteg

követés
(mennyiségi
meghat.)



IV. Kryoglobulinok vizsgálata

Legfontosabb indikációja: a **primer és szekunder kryoglobulinaemiák** diagnózisa. A vizsgálat esszenciális kevert kryoglobulinaemiában elengedhetetlen. A kryoglobulin típusa (monoklonális vagy kevert) a kryocsapadék immunkémiai analízisével állapítható meg immunfixációs módszerrel, monospecifikus immunszérumok segítségével.

Osztály	Komponens	Asszociáció
I. Típus (szimpla)	Monoklonális Ig (G,A,M) Bence-Jones fehérje	Waldenström macroglobulinaemia Myeloma Limfoproliferatív betegséggel asszociált MG
II. Típus (kevert)	Monoklonális Ig (G,A,M) és Poliklonális Ig (főleg IgG)	Hepatitis C Esszenciális kryoglobulinaemia SjS, RA, CLL
III. Típus (kevert)	Poliklonális Ig (bármelyik izotípus)	Esszenciális kryoglobulinaemia SjS, SLE Vírusinfekciók (HCV, HBV, CMV, EBV, HIV) Endocarditis, bakteriális infekciók, PBC

Kryoglobulinaemiák laboratóriumi vonatkozásai

Laboratóriumi paraméter	I. Típus	II. Típus	III. Típus
Kryocrit	> 5 %	< 5 % (1-2)	< 5 % (1-2)
C3	Norm	↓	↓
C4	Norm	↓↓	↓↓
CH₅₀	++	↓	↓
RF	+	++	++
Autoantitestek (ANA, ENA, AMA)	-	++	++
HBV	-	+	+
HCV	-	+++	+++

Kryoglobulinok vizsgálatának algoritmus

Mintavételi csövek előmelegítve (37°C)!!!

Mintavétel és szállítás $\geq 37^\circ\text{C}$ -on

KRITIKUS!

Inkubálás 37°C -on minimum 1 óra

Szérum elválasztása 37°C -on !!!

Inkubálás 4°C -on 3 – 7 nap

Precipitátum képződés ellenőrzése naponta !!!

Nincs precipitáció

NEGATÍV

Van precipitáció

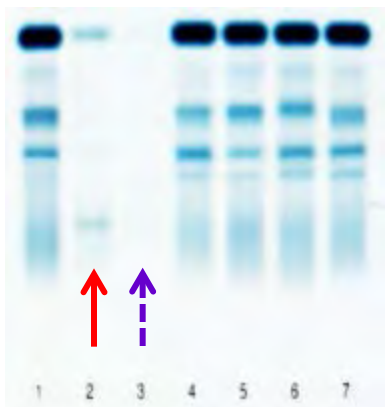
**nem oldható
vissza 37°C -on**

**visszaoldható
 37°C -on**

POZITÍV

Klinikai gyanú esetén ismétlés

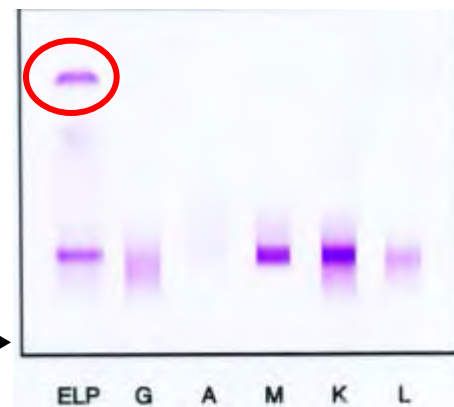
Kryoglobulinok laboratóriumi vizsgálata - folytatás



Kryo-csapadék ELFO képe

37°C-on visszaoldható precipitátum

Pozitív teszt kryocrit



Kryo-csapadék IF képe - mosás!!!

Precipitátum mosása 3x fiziológias sóoldatban (4°C)
centrifugálás 4°C-on (5-10 perc, 1800-7500 rcf) !!!
visszaoldás 37°C-on (overnight)

Qualitatív analízis
Se ELFO
Kapilláris ELFO
Immunfixáció

Quantitatív analízis
Összfehérje,
Se Ig-ok

IV. Allergia vizsgálatok

1. Az IgE (össz-IgE, totál-IgE) mennyiségi meghatározása:

Indikációja:

allergiás bronchopulmonáris aspergillosisban: extrém magas IgE szint (diagnosztikai kritérium)

Jób szindróma (hyper IgE szindróma) gyanúja esetén a magas IgE szint diagnosztikai jelentőségű.

IgE-myelomában mennyisége szintén nagyon magas, de előfordulása ritka.

Gyermekkorban az atópiás betegségek diagnózisában fontos lehet: a korban egyeztetett normál értéknél jelentősen magasabb IgE szint az **atópiás hajlamra** utalhat (idővel igazi atópiás betegség léphet fel). *De emelkedett szintje utalhat bélférgességre is!*

Felnőttkori atópiás betegek esetében a diagnosztikai értéke **kérdéses** (szintje a betegek 50 %-ban normál értékű). A monoszenzibilizált egyének között a normál IgE szint gyakoribb a poliszenzibilizált egyénekhez képest.

IgE szint monitorozás **Omalizumab terápia** hatékonyságának megítélése céljából (különbség a tesztek teljesítménye között - az IgE-anti-IgE zavarja a mérést!)

Az össz-IgE szint **emelkedése** tapasztalható HIV-fertőzésben, bélférgességben, candidiasisban és bizonyos daganatokban is.

1. IgE meghatározása (folytatás):

Az IgE **szintjét** egyedi jellemzők és környezeti tényezők is befolyásolják. Normál értéke az életkorral változik (**korfüggő**), és **földrajzi területenként** is eltérő lehet.

Mivel szérum koncentrációja a többi immunglobulinhoz képest alacsony (ng/ml), meghatározása elsősorban immunoassay-el (ELISA) történik, nemzetközi standardhoz (WHO) kalibrálva: IU/ml vagy kU/l vagy ng/ml (1 IU/ml = 1 kU / l = 2,4 ng/ml)

2. Allergén specifikus IgE (sIgE) meghatározása:

A teszt az **allergén azonosítására**, és nem az allergiás betegség megállapítására szolgál - gyakran diagnosztikai tesztként értelmezik, DE valójában az allergénnel való szenzibilizációt jelzi.

Az eredmények értékelése az anamnézis és a klinikai tünetekkel együtt ajánlott!

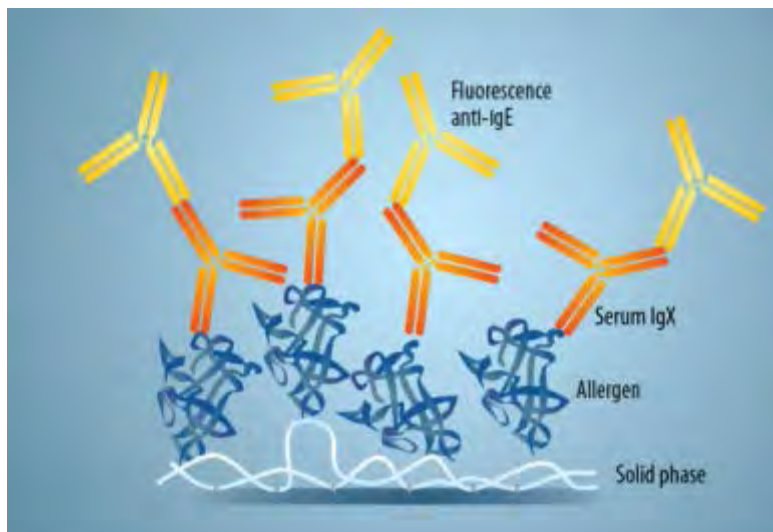
A sIgE meghatározása **elsősorban olyan esetekben ajánlott, ha az „in vivo” vizsgálatok nem értékelhetőek**, vagy különböző okok miatt **nem végezhetőek** (magas kockázat - anafilaxiás reakció, gyógyszeres kezelés, pl. antihisztamin, szteroid, bőrbetegség, pl. krónikus urticaria).

slgE meghatározása:

Legelterjedtebb módszerek: enzim- vagy fluoreszcens immunoassay (ELISA, FEIA). Az eredeti izotópos módszert (RAST) ma már nem használjuk, de a szemikvantitatív értékelés RAST egységben történik. A kvantitatív értékelés kU/l vagy ng/ml.

A slgE meghatározását számos tényező befolyásolja:

- alacsony IgE koncentráció (ng/ml)
- az allergén epitópok sokfélesége
- az epitóp konformációjának megváltozása az előállítás során
- keresztreakció a szénhidrát tartalmú epitópok miatt (keresztreakciót okozó szénhidrát determinánsok - CCD) - klinikailag irreleváns álpozitivitás, minden „in vitro” tesztre jellemző



A specifikus IgE mérés elve:

1. A szilárd-fázisú polimerbe (cellulóz vagy avidin) beágyazott allergént a beteg mintájával inkubáljuk
2. A mintában lévő specifikus IgE az allergénhez kötődik
3. Az allergénre nem specifikus többi antitestet mosással eltávolítjuk
4. Az allergénhez kötött slgE-t fluoreszcens vagy enzimmel jelölt anti-IgE segítségével detektáljuk a fluoreszcens jel vagy színreakció alapján

Fontos a vizsgáló módszer megnevezése!

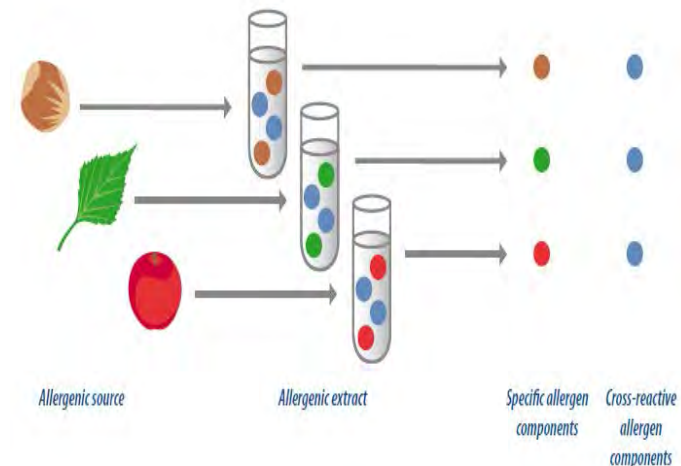
A specifikus IgE tesztekben használt allergének:

- **Allergén mixek:** pollen keverékek (fű, fa, virág), házipor (Dermatophagoides, Aspergillus), állati antigének (macskaszőr, stb), táplálék allergének, gyógyszerek, penészgombák, méh / darázsmeleg
- **Egyedi allergének**
- Előállításuk függvényében: **tisztított**, vagy **rekombináns** allergének

A tisztított, de több allergént tartalmazó (több komponensű) tesztek gyakran adnak álpozitív reakciót. A **komponensekre bontott diagnosztika (CRD: Component Resolved Diagnostics)** az allergia vizsgálatok újabb lehetősége, melyben a monokomponensű allergének segítségével elkülöníthetők a valódi szenzibilizáló és keresztreakáló antigének.

A CRD néhány gyakorlati haszna:

- High risk / Low risk allergének megkülönböztetése (hasznos tanácsok a beteg számára)
- Keresztreakciók feltárása (elkerülhető a fölösleges terápia / diéta)
- Allergén specifikus immunterápia (SIT) tervezése



IV. Egyéb vizsgálatok

1. Akut-fázis fehérjék - CRP:

Gyulladásos betegségekben sokféle akut-fázis fehérje termelődik, ezek közül leggyakrabban a CRP-t használjuk - stabil fehérje, melynek koncentrációja a gyulladás során a süllyedéshez képest gyorsabban változik.

Bár a legtöbb autoimmun betegségben a CRP szintje és a betegség aktivitása között szoros korreláció van, a mindennapi gyakorlatban elsősorban az RA aktivitásának megítélésére használjuk.

SLE-ben a CRP szintjének megemelkedése inkább infekcióra utal.

2. Limfocita blasztos transzformáció (LTT):

A teszt elsősorban **primer immundefektusok** gyanúja esetén ajánlott (T-, vagy kombinált T- és B-sejt defektusok, B-sejt defektusok), ritkábban **szekunder immunhiányos** állapotok esetén (pl. HIV fertőzést követően). A módszer a **késői típusú túlérzékenységi** reakció vizsgálatára is alkalmas.

A módszer lényege: a vérből izolált sejtek (PBMC) növényi mitogénekkal, vagy specifikus antigénekkal stimuláljuk, mely a sejtek proliferációját eredményezi. A proliferáció mértékét az osztódó sejtek DNS-be beépülő DNS-jelző segítségével határozzuk meg (3H-timidin vagy bromdeoxiuridin, BrdU). Az értékelés a sejtek spontán (nem stimulált) proliferációjához való viszonyításon alapul.

A mitogén indukálta proliferáció elmaradása súlyos kombinált immundefektusra (**SCID**) jellemző. Más celluláris defektus esetén igen változó (normális vagy teljesen elmarad).

Késői típusú túlérzékenységi reakció megállapításához a vérből izolált sejteket a vizsgált gyógyszer jelenlétében tenyésztjük. A gyógyszerrel specifikusan reagáló T-sejtek proliferációja a késői típusú túlérzékenységet támasztja alá (a proliferáció elmaradása viszont nem zárja ki azt).

2. Genetikai vizsgálatok:

HLA-B27 hordozásának a szeronegatív spondarthritisek diagnózisában van jelentősége. Az SPA-ban szenvedő betegek 95 %-a HLA-B27 pozitív, egyéb SNSA-ban (reaktív arthritisz, arthritisz psoriatica) 25 – 50 %-ban fordul elő. Reaktív arthritiszben való előfordulása rosszabb prognózist jelent.

HLA-DRB1 meghatározásának RA-ban van jelentősége, a „shared epitópot” tartalmazó HLA-DRB1 allélek (*0101, *0401 *0404, *0408) hordozása rosszabb prognózisra utal.

HLA-DQ2 / DQ8 hordozásának coeliakiában van jelentősége, a szeronegatív formákban vagy kérdéses esetekben mindkettő negativitása gyakorlatilag kizárja a coeliakiát.

HLA-DR3 és DR4 haplotípusok az 1-es típusú diabetes kialakulásában jelentenek magas rizikót.

Javasolt vizsgálatok szisztémás autoimmun kórképekben

Betegség	Diagnózist megerősítő vizsgálatok	Prognózist / Aktivitást jelző vizsgálatok	Kiegészítő vizsgálatok
SLE	ANA, dsDNS, Sm(ENA), C3/C4/CH50, CL/anti-β2-GPI (G/A/M)/LA (Lupus Anticoagulans), DAT (Direkt Antiglobulin Teszt)	DNS, C3/ C4, C1q, nucleosoma (kromatin), ribosoma, PCNA, RNP/ SSA/SSB (ENA)	CRP, RF
SS	SSA/SSB (ENA)	ANA, RF, Immunglobulinok (G/A/M), elektroforézis/ IF (paraprotein), kryoglobulin, C3/C4/CH50	TG/TPO, PCA/AMA/SMA
RA	ACPA (anti-CCP, anti-Vimentin), RF	CRP, C3, C4, ACPA (CCP, vimentin), HLA	ANA, ENA, dsDNS, CL
PSS	Scl-70, Centromer, RNS polimeráz I	ANA	anti-U1-RNP
MCTD	ANA, U1-RNP (ENA)	Scl-70	

Javasolt vizsgálatok szisztémás és szervspecifikus autoimmun kórképekben

Betegség	Diagnózist megerősítő vizsgálatok	Prognózist / Aktivitást jelző vizsgálatok	Kiegészítő vizsgálatok
PM/DM	ANA, ENA (Jo-1, Scl-70, anti-U1-RNP)	Egyéb myositis specifikus, vagy asszociált antitestek (SRP, PL-7, PL-12, PM/Scl, Mi-2, Ku)	
APS	CL/B2GPI (G/M)/LA		Thrombophilia kivizsgálás, ANA
Vasculitis	ANCA (MPO,PR3), CRP, RF, Kryoglobulin, C3/C4/CH50, ANA		HCV, HBV
JIA	RF, ACPA (CCP, Vimentin), ANA	CRP	
Autoimmun hepatitis	Immunglobulinok (G/A/M), ANA, AMA, SMA, LKM, LPS, Kryoglobulin	elektroforézis/ IF (paraprotein)	
Hashimoto thyreoiditis	anti-TPO, anti-TG		PCA, RF
PBC	AMA, Sp-100, gp210	ANA (Centromer)	
Coeliakia	tTG (IgA, IgA hiányban IgG is), endomysium (IgA, IgA hiányban IgG is)		



**Köszönöm a
figyelmet!**