

576.8.097.5.006.2:576.8.077:543.061

DETEKCE ANTINUKLEÁRNÍCH PROTILÁTEK V RUTINNÍ DIAGNOSTICE IMUNOLOGICKÉ LABORATOŘE

Mjr. MUDr. Miroslav PRŮCHA, pplk. MUDr. Přemysl RÁKOSNÍK
Oddělení klinické a experimentální imunologie
Vojenský ústav hygieny epidemiologie a mikrobiologie, Praha
(náčelník: plk. MUDr. V. Kotlář, CSc.)

Detekce autoprotilátek se stala jednou ze široce používaných metod v lékařské imunologii. Skupina autoimunitních onemocnění tvoří poměrně početnou skupinu chorob, se kterými se setkáváme prakticky ve všech klinických oborech. Vyšetření přítomnosti autoprotilátek dnes představuje rutinní vyšetřovací metodu, která však sama o sobě nemůže přinést rozhodující diagnostické a terapeutické závěry. Množství detekovaných autoprotilátek je nesmírně široké a neustále se rozrůstá. Podle jejich výskytu se vydělily dvě hlavní skupiny, a to orgánově nespecifické a orgánově specifické autoprotilátky. Orgánově specifické autoprotilátky se vyskytují u celé řady chorob – onemocnění štítné žlázy, žaludku, střeva, pankreatu – a jsou namířeny proti cytoplazmatickým komponentám buněk příslušných orgánů. Orgánově nespecifické autoprotilátky – antinukleární (ANA), antimitochondriální, protilátky proti hladkému svalstvu – nacházíme u autoimunitních onemocnění, systémových onemocnění pojivové tkáně, u akutních virových a bakteriálních onemocnění, některých polékových poškození (1, 2, 3).

V naší práci jsme se zaměřili na detekci antinukleárních protilátek. Jednu z nejpočetnějších skupin onemocnění s autoimunitní složkou tvoří skupina difúzních onemocnění pojivové tkáně. Výskyt ANA u těchto chorob je zaznamenán v tab. 1. Vedle výskytu u autoimunitních onemocnění byla jejich přítomnost zaznamenána i za fyziologického stavu (4). Autoantigenů, proti kterým vznikají antinukleární

protilátky, je dnes charakterizována celá řada (tab. 2, 3, 4). Dosud se nepodařilo zcela objasnit jejich patogenetický význam a mechanismy jejich vzniku. Předkládáme naše výsledky při detekci ANA v rutinní diagnostice imunologické laboratoře.

Materiál a metody

V roce 1988 bylo vyšetřeno 618 vzorků od pacientů ve věku 15–70 let. Všichni pacienti byli z lůžkových oddělení a ambulancí Ústřední vojenské nemocnice. Průkaz ANA byl prováděn na tkáňových řezech kryších jater metodou nepřímé imunofluorescence (NIF). Po usmrcení zvířete byla jaterní tkáň zmrazena a na kryostatu z ní byly připraveny řezy o tloušťce 5 μ m. Na takto připravené řezy byla nanesena séra pacientů v ředění 1:5 a inkubována 30 minut ve vlhké komůrce při pokojové teplotě. Poté byly preparáty 3krát promyty v pufrovaném fosfátovém roztoku a následovala inkubace s polyklonálním prasečím imunoglobulinem značeným fluoresceinizoithiocyanátem-SwAHu/Ig/FITC. Inkubace probíhala po dobu 30 minut ve vlhké komůrce při pokojové teplotě. Při pozitivním nálezu ANA byl celý postup opakován s navázáním prasečí protilátky v jednotlivých imunoglobulinových třídách – SwAHu/IgG/FITC, SwAHu/IgA/FITC a SwAHu/IgM/FITC.

U pacientů s diagnózou systémový lupus erythematosus a pozitivním nálezem ANA jsme provedli de-

Tabulka 1

Výskyt ANA u difúzních chorob pojivové tkáně

Systémový lupus erythematosus	více než 95 %
MCTD-Sharpův sy	více než 95 %
Sklerodermie	70–90 %
CREST sy	70–90 %
Sjögrenův sy	75–90 %
Dermatomyositida/Polymyositida	40–60 %
Revmatoidní artritida	40–50 %

Tabulka 2

Autoantigeny u SLE, MCTD a Sjögrenova sy

Klinicko-imunologické označení	Charakteristika
Nativní DNA	Dvouvláknová DNA
Denaturovaná DNA	Jednovláknová DNA
Histony	H1, H2 A, H2 B, H3, H4
Jaderný RNP ¹	Proteiny 33KD(A), 22KD(C) Protein 68/70KD
Sm	Proteiny 28KD(B), 29KD(B) 16KD(D), 13KD(E)
SS-A/Ro ²	Protein 55/61KD
SS-B/La ²	Fosfoprotein 46/48KD
Ku	Proteiny 66KD a 86KD
Ribosomální RNP	Fosfoprotein 38KD Fosfoproteiny 16KD a 15KD
PCNA/Cyklin	Protein 36KD

¹ Autoantigen u MCTD
² Autoantigeny také u Sjögrenova sy

Tabulka 3

Autoantigeny u sklerodermie

Klinicko-imunologické označení	Charakteristika
Scl-70	Původně identifikován jako 70KD protein
Centromera/kinetochor	Proteiny 19KD, 80KD a 140KD
RNA Pol I	RNA polymeráza I: Komplex 13 proteinů
PM-Scl	Komplex 11 proteinů
Fibrillarin	34KD protein bohatý na dimetyl arginin a glycín
To	7–2 jadéřková RNA

Tabulka 4

Autoantigeny u dermatomyositidy a polymyositidy

Klinicko-imunologické označení	Charakteristika
Jo-1	Histidyl t-RNA syntetáza
PL-7	Threonyl t-RNA syntetáza
PL-12	Alanyl t-RNA syntetáza
Mi-1	Protein 72KD
Mi-2	Proteiny 53 a 61KD
t-RNA	t-RNA

tekci protilátek proti dvouvláknové deoxyribonukleové kyselině (ds-DNA) metodou nepřímé imunofluorescence na prvku Trypanozoma Danilewskyi, jehož kinetoplast je zdrojem nativní dvouvláknové DNA. Detekci jsme prováděli na komerčně vyráběných se-tech ÚSOL.

Výsledky a diskuse

Pozitivitu ANA jsme zjistili u 17 pacientů, z toho největší skupinu tvořili pacienti se systémovým onemocněním pojivové tkáně. Jednotlivé klinické diagnózy a výskyt ANA v jednotlivých imunoglobulinových třídách je zaznamenán v tab. 5. Ve skupině pacientů s postižením pojivové tkáně převažoval výskyt ANA v široké heterogenitě prakticky ve všech imunoglobulinových třídách. Nebyl zjištěn vztah mezi výší titru a průběhem onemocnění. V obou případech pacientů se SLE jsme zaznamenali pozitivní nález protilátek anti-ds DNA. Výše jejich titru v závislosti na zlepšení klinického stavu při intenzivní terapii klesala. Pozitivita těchto protilátek nevymizela ani při terapii kortikoidy. U obou nemocných byly závažným způsobem postiženy ledviny.

Vedle těchto nemocných jsme výskyt ANA zaznamenali u pacientů s postižením jater klasifikovaných jako chronická aktivní hepatitida. Protilátky anti-ds DNA jsme u těchto nemocných nezjistili.

Tabulka 5

Pohlaví, věk	Dg	Titr ANA	IgG	IgA	IgM
♂ 55	RA, hepatopatie	1:40	+	+	+
♂ 25	M. Bechtěrev	1:20	+	+	+
♀ 66	Hepatopatie s přestavbou	1:80	+		+
♂ 20	SLE s postižením ledvin	1:160	+		+
			titr anti-ds DNA 1:80		
♀ 65	Sjögrenův sy	1:20	+		+
♀ 42	Sharpův sy	1:40	+		+
♂ 24	SLE s postižením ledvin	1:160	+	+	+
			titr anti-ds DNA 1:160		
♀ 55	Chron. akt. hepatitida	1:20	+	+	+
♀ 50	RA, Sjögrenův sy	1:40	+	+	+
♂ 63	Chron. hepatopatie	1:20	+	+	+
♀ 55	Sjögrenův sy	1:20	+		+
♂ 21	Chron. glomerulonefritida	1:40	+		+
♂ 22	Postinfekční polyartralgie	1:20			+
♂ 21	Postinfekční polyartralgie	1:20			+
♀ 44	Urticaria solaris	1:20			+
♀ 41	Urticaria chron.	1:10			+
♂ 43	RA	1:80	+	+	+

Dva pacienti s pozitivitou ANA ve třídě IgM měli diagnózu postinfekčních polyartralií. V čase vyšetření se u těchto nemocných neprokázaly jiné známky svědčící pro autoimunitní onemocnění.

Výskyt ANA ve třídě IgM v nízkém titru jsme zjistili u 2 pacientů kožního oddělení s diagnózou „urticaria“.

V roce 1981 WHO vydala seznam indikací, při kterých se má obligatorně přistupovat k průkazu ANA (5). Vzhledem k poměrně snadné a dostupné metodice průkazu jsme přistoupili k širší indikaci tohoto vyšetření bez praktického omezování. Největší záchytnost positivity ANA se širokou heterogenitou v jednotlivých imunoglobulinových třídách jsme zaznamenali u pacientů s postižením pojivové tkáně. V případech pacientů se SLE jsme detekovali protilátky anti-ds DNA, jejichž výše titru korelovala s aktivitou onemocnění.

U 2 pacientů s postinfekčními reaktivními polyartraliemi jsme zaznamenali výskyt ANA pouze přechodně ve třídě IgM. Podobné výsledky byly zaznamenány u dětí s poststreptokokovou reaktivní artritidou (6). Rovněž nízký a přechodný titr ANA ve třídě IgM u pacientů s diagnózou „urticaria“ nás vede k domněnce, zda by se v těchto případech nemohlo jednat o tzv. přirozené autoprotilátky.

Ve srovnání s prací Fučíkové aj. (7) jsme nezaznamenali pozitivitu ANA v tak širokém spektru diagnóz a poměrně vysokém procentuálním počtu.

Úloha autoprotilátek za fyziologických podmínek stejně jako při patologických stavech není dosud vyřešena, a proto je předmětem spekulací a hypotéz (8, 9, 10).

Smith a Steinberg formulovali obecnou koncepci vzniku chorob z autoimunity jako kvantitativní abnormality v tzv. kontrolovaných reakcích vůči vlastní tkáni probíhající za přítomnosti znaků MHC na povrchu reagujících buněk, které mají celou řadu příčin. Individuální geny pouze jedince predisponují k rozvoji určitých abnormalit, na jejichž podkladě vznikají autoimunitní choroby (11).

V současné době se průkaz autoprotilátek jako jedné z pomocných diagnostických metod u autoimunitních onemocnění ubírá směrem k podrobné biochemické charakteristice jednotlivých antigenů, zejména pomocí imunoblotingu, a k použití co možná nej přesněji definovaných systémů antigen-protilátka. Průkaz ANA metodou nepřímé imunofluorescence je nejdostupnější screeningovou metodou. Volbou zůstává použití vhodného substrátu, kde se jako senzitivnější než tkáňové řezy ukazuje použití tkáňových kultur, např. HEp-2 buněk.

Přes všechny obecně známé nedostatky a problémy, se kterými se průkaz ANA metodou nepřímé imunofluorescence spojuje, je možno celkově kladně hodnotit jeho přínos v diagnostice a při terapeutickém rozhodování. Je doplňujícím vyšetřením u klinicky a laboratorně atypických nebo ne zcela rozvinutých systémových onemocnění či jiných syndromů s podezřením na autoimunitní složku. Stejně jako pozitivní výsledek i negativní nález může významně přispět k rozhodování klinika, zejména v souvislosti s dalšími parametry imunitního systému nemocného.

Souhrn

Výskyt antinukleárních protilátek je významně spjat s diagnostikou autoimunitních onemocnění. Jejich průkaz metodou nepřímé imunofluorescence na tkáňových řezech krysích jater je vhodnou screeningovou metodou. Autoři předkládají výsledky získané při rutinní práci imunologické laboratoře ve vztahu ke klinickým diagnózám.

Literatura

1. TAN, E. M.: Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): Their immunobiology and medicine. *Adv. Immunol.*, 33, 1982, s. 167-240.
2. ISENBERG, D. A. et al.: Profile of autoantibodies in the serum of patients with tuberculosis, klebsiell, and other Gram negative infections. *Clin. exp. Immunol.*, 67, 1987, č. 10, s. 516-523.
3. TAN, E. M. – PORTANOVA, J. P.: The role of histones as nuclear autoantigens in drug-related lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*, 24, 1981, č. 9, s. 1064-1069.
4. GOODWIN, J. S. – HARLES, R. D. – TUNG, K. K.: Immunological responses of a healthy elderly population. *Clin. exp. Immunol.*, 48, 1982, č. 3, s. 403-410.
5. Use and abuse of eight widely-used diagnostic procedures in clinical immunology: a WHO memorandum. *Bulletin of the WHO*, 59, 1981, č. 5, s. 717-728.
6. DE CUNTO, C. L. et al.: Prognosis of children with post-streptococcal reactive arthritis. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 7, 1988, č. 10, s. 683-686.
7. FUČÍKOVÁ, T. – POCH, T. – KRUPÍČKA, J.: K otázce vyšetřování orgánově nespecifických autoprotilátek. *Čas. Lék. čes.*, 123, 1984, č. 38-39, s. 1169-1174.
8. COHEN, I. R. – COOKE, A.: Natural autoantibodies might prevent autoimmune disease. *Immunology Today*, 7, 1986, č. 12, s. 363-364.
9. EL-ROEY, A. – GLEICHER, N.: Definition of normal autoantibody levels in an apparently healthy population. *Obstet. Gynecol.*, 72, 1988, č. 4, s. 596-602.
10. GRABBAR, P.: Autoantibodies and the physiologic role of immunoglobulins. *Immunol. Today*, 4, 1983, s. 337-340.

Klíčová slova: Antinukleární protilátky; Autoimunita; Diagnostika.