

Ilza Salamunić¹
Dušanka Martinović Kaliterna²

¹Odjel za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku
Klinički bolnički centar Split

²Odjel za kliničku imunologiju i reumatologiju
Klinika za unutarnje bolesti
Klinički bolnički centar Split

Laboratorijska dijagnostika ANCA-vaskulitisa

Laboratory diagnostics of ANCA-vasculitis

Adresa za dopisivanje:

doc.dr.sc. Ilza Salamunić

Odjel za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku
Klinički bolnički centar Split
Spinčićeva 1 ♦ 21000 Split
ilza.salamunic@gmail.com

Sažetak

Vaskulitisi malih krvnih žila udruženi sa antineutrofilnim citoplazmatskim autoantitijelima (ANCA) su rijetke bolesti karakterizirane infiltracijom upalnih stanica i nekrozom stijenke krvne žile. Klasična citoplazmatska ili C-ANCA i tipična perinuklearna ili P-ANCA prepoznaju proteinazu 3 (PR3-ANCA) i mijeloperoksidazu (MPO-ANCA). Atipična ANCA prisutna su u upalnim bolestima crijeva, autoimunim bolestima jetre, raznim infek-

cijama i lijekovima izazvanim vaskulitisima. Ta atipična ANCA prepoznaju različite ciljane antigene. Važno je jasno razlikovati PR3-ANCA i MPO-ANCA kao pouzdane biomarkere pri dijagnozi i praćenju aktivnosti bolesti od "atipičnih" ANCA. Prema dogovoru se ANCA otkrivaju metodom indirektno imunofluorescencije (IIF), a za dokazivanje specifičnih autoantitijela i njihovih ciljnih antigena koriste se enzimski imunotestovi.

Ključne riječi

ANCA, vaskulitis, laboratorijska dijagnostika

Summary

The antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) are associated with distinct forms of primary small vessel vasculitides, collectively referred to as ANCA-associated vasculitis (AAV). ANCA were originally identified by IIF. Importantly, however, only ANCA directed to PR3 (PR3-ANCA) or MPO (MPO-ANCA) are relevant for

the diagnosis AAV, there is international consensus that ANCA should be detected by a combination of IIF and antigen-specific assays, i.e. detection of PR3 and MPO-ANCA. Several novel technologies have become available for antigen-specific ANCA detection.

Keywords

ANCA, vasculitis, clinical laboratory diagnosis

Uvod

Vaskulitisi su heterogena skupina kliničkih sindroma obilježenih upalom krvnih žila. Vaskulitisi malih krvnih žila su u većini slučajeva povezani s autoimunim oštećenjem krvnih žila nakon taloženja imunokompleksa u njihovoj stijenci. Povezani su s pojavom antineutrofilnih citoplazmatskih autoantitijela (eng. *anti-neutrophil cytoplasmic antibodies* - ANCA) koja se mogu vezati s aktiviranim neutrofilnim granulocitima, koji pojačano otpu-

štaju kemokine i citokine koji izazivaju upalu i oštećuju okolne krvne žila (1,2).

Laboratorijska dijagnostika vaskulitisa temelji se na otkrivanju ANCA, kao i testova kojima se utvrđuje imunološki tip reakcije i prisustvo upale: imuni kompleksi, reuma faktor (RF), krioglobulini, komplement, imunoglobulini, antinuklearna antitijela (ANA), virusi, C-reaktivni protein i dr.

Identifikacija ANCA autoantitijela

Postoji velik broj antigena koji se primjenjuju za otkrivanje autoantitijela povezanih sa specifičnim sistemskim ili organskim autoimunim bolestima. Klinička korisnost rezultata ovisi o kvaliteti laboratorijskih testova. Idealan dijagnostički test je visoko specifičan i osjetljiv. Također može prepoznati sve bolesnike koji boluju od određene bolesti te ne daje pozitivne rezultate za ispitanike koji ne boluju od bolesti.

ANCA su heterogena skupina cirkulirajućih autoantitijela koja prepoznaju proteine citoplazmatskih granula ili druge sastavnice citoplazme i jezgre neutrofilnih granulocita. Standardna metoda za otkrivanje ANCA jest indirektna imunofluorescencija (eng. *indirect-immunofluorescence* - IIF) na etanolom fiksiranim ljudskim granulocitima. Djelomična destrukcija lipidnog dvosloja citoplazmatskih granula omogućava oslobađanje sadržaja u citoplazmu. Jaki kationski enzimi uključujući i mijeloperoksidazu (MPO) vežu se za negativno nabijene nuklearne membrane, dok manje kationski enzimi, kao proteinaza 3 (PR3) ostaju u citoplazmi. Sukladno usuglašenim stajalištima ANCA pokazuju četiri različita imunofluorescentna uzorka na etanolom fiksiranim ljudskim granulocitima; klasična citoplazmatska ili C-ANCA, perinuklearna ili P-ANCA, izrazito perinuklearna ili "atipična" a/P-ANCA i atipična ANCA (3,4)

Citoplazmatski (C-ANCA) imunofluorescentni uzorak karakterizira sjajna zrnata fluorescencija citoplazme s izrazitom fluorescencijom septuma između jezgrinih segmenta. Ciljni autoantigen je PR3, enzim iz α -granula mijeloidnih stanica i granulocita te monocitnih lizosoma. Enzim se može dokazati i u ranoj fazi monomijeloidne diferencijacije. Pripada serinskim proteazama. Kationska PR3 proteolitički djeluje na elastin, fibronektin, laminin, tip IV kolagena i ima izražen antimikrobni učinak. α_1 -antitripsin je prirodni inhibitor. Enzim je kloniran, identificiran glikoprotein molekularne mase 29 kDa sa 228 aminokiselina. Aktivirani neutrofile oslobađaju PR3 nakon fuzije α -granula s plazmatskom membranom (5,6).

Perinuklearni (P-ANCA) imunofluorescentni uzorak karakterizira intenzivna fluorescencija periferije jezgre s djelomičnom fluorescencijom središnjeg dijela jezgre. Ciljni

autoantigen je MPO, a tek iznimno PR3. MPO, kationski protein iz α -granula, molekularne mase 146 kDa ima ključnu ulogu u produkciji reaktivnih oblika kisika te može potaknuti H_2O_2 na stvaranje hipoklorne kiseline, produkta snažnog mikrobicidnog učinka. Kationski naboj MPO favorizira njegovo pridruživanje anionskim strukturama kao što je glomerularna bazalna membrana (7,8).

Izrazita perinuklearna ili "atipična" a/P-ANCA, karakterizirana je izrazitom perinuklearnom fluorescencijom s minimalnom fluorescencijom unutar jezgre. Atipična a/P-ANCA protiv drugih ciljnih autoantigena se nalazi u kroničnim upalnim bolestima crijeva, autoimunim bolestima jetre, bolestima potpornih tkiva, raznim infekcijama i nekim vaskulitisima izazvanim lijekovima. Ta "atipična" a/P-ANCA prepoznaju različite ciljne antigene, kao katepsin G, laktoferin, aktin, tropomiozin, elastazu, baktericidni protein i histon 1. Neki predlažu da se ta autoantitijela ne ubrajaju u ANCA, nego da se nazovu autoantitijela specifična za neutrofile (NSE) jer se njihovi ciljni antigeni nalaze u jezgri i jezgrinoj membrani, a ne samo u citoplazmi neutrofilnih granulocita (1,5).

Atipični (a-ANCA) najčešće kombinacija citoplazmatske i perinuklearne fluorescencije (5). PR3-ANCA i MPO-ANCA su autoantitijela na kojima se temelji dijagnostika ANCA vaskulitisa, a karakteriziraju ih različita osjetljivost i specifičnost. Karakteristična su za aktivnu sistemsku bolest, u većini slučajeva a titar im korelira s aktivnosti bolesti i s uspješnosti terapije. Mogu poslužiti i u kliničkom praćenju bolesnika. Naime, ponovna pojava ili povišenje titra autoantitijela upućuje na egzacerbaciju bolesti (2).

Da se izbjegne propust u kliničkoj interpretaciji od presudne je važnosti jasno razlikovati PR3-ANCA i MPO-ANCA kao pouzdane biomarkere pri dijagnozi i praćenju aktivnosti bolesti u bolesnika s vaskulitisima od a/P-ANCA ili autoantitijela specifičnih za neutrofile (NSA) koja prepoznaju mnoge antigene u bolesnika s kroničnim upalnim bolestima crijeva, jetre i bolestima potpornih tkiva. Oko 5% seruma koji pokazuju pozitivne P-ANCA ili "atipične" P-ANCA uzorke na etanolom fiksiranim granulocitima su negativni ELISA testom (9).

Tehnike i metode za otkrivanje antitijela

Laboratoriji koji se bave dijagnostikom autoimunih bolesti, primjenjuju imunotestove kao osnovnu tehniku otkrivanja autoantitijela. Važni antigeni su dobro karakterizirani, što je bitno za razlikovanje metoda kojima se otkrivaju autoantitijela (10,11). Testovi probira za otkrivanje autoantitijela provode se za brojne sistemske i organske autoimune bolesti. Zahtjevi za provođenjem tih testova znatno su porasli, najviše zbog povećanog poznavanja prirode autoantitijela.

Imunifluorescencija

Primjenom IIF u dijagnostici ANCA autoantitijela iz bolesnikova seruma prepoznaju nedefinirane antigene te pokazuju karakterističan izgled koji se može povezati s određenom bolesti. Karakterističnim izgledom IIF pozitivnih uzoraka procjenjuje se koji specifični antigena treba tražiti u uzorku seruma bolesnika.

IIF je osjetljiva metoda, pa ipak nedovoljno specifična, a postoje i ograničenja kao što su varijacija supstrata, subjektivno tumačenje rezultata, niska ponovljivost i manjak standardizacije (10). Kako bi se prevladala ova ograničenja, nedavno su uvedeni potpuno automatizirani IIF sustavi za tumačenje rezultata testa s programima za prepoznavanje specifičnog izgleda ANCA. Analiza ANCA autoantitijela tehnikom IIF, za sada, ostaje glavnom metodom dijagnosticiranja, ali postoji konsenzus da se specifično autoantitijelo na PR3-ANCA ili MPO-ANCA u dijagnostici ANCA pridruženih vaskulitisa potvrđuje enzimskim imunotestovima (12).

Enzimski imunotest

Enzimski imunotest ELISA (eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*) u analizi koristi antigene izolirane iz ljudskih granulocita ili rekombinantne antigene. Specifičnost testa ELISA za mjerenje koncentracije autoantitije-

la jako ovisi o kvaliteti primjenjenih antigena te je važno da antigen ima identičnu sekvencu, konformaciju i posttranslacijske modifikacije kao i ljudski antigen.

Enzimski imunotest (eng. *enzyme immunoassay* - EIA) je danas u širokoj uporabi za otkrivanje specifičnih nuklearnih ili citoplazmatskih antigena kod organskih ili sistemskih imunoloških poremaćaja (1).

Višestruki imunotestovi

Višestruki imunotestovi podržavaju otkrivanje višestrukih autoantitijela u jednom pokušaju u isto vrijeme.

Imunoblot (eng. *line-blot immunoassay*) je višestruki imunotest koji može paralelno analizirati različite tipove autoantitijela. Imunoblot s trakama koristi gotovo jedino rekombinantne antigene, koji su imobilizirani na najlonskoj test traci. Kad ih se inkubira sa serumom, autoantitijela iz uzorka vežu se na linije antigena na traci, a vizualiziraju se dodatnim reakcijama.

Tehnologija mikropostroja

Tehnologija mikropostroja kod kojeg su antigeni smješteni ravno na dnu (eng. *planar*) razvijena je i primjenjuje se za istovremeno otkrivanje različitih autoantitijela korištenjem "sandwich" metode imunotesta.

Multipleks tehnologija

Kao alternativa mikropostrojima, razvijena je protočna citometrija, za testove temeljene na istovremenoj višestrukoj detekciji specifičnih antitijela (eng. *flow cytometry for multiplex bead-based assays*). Multipleks-tehnologija znači mogućnost spajanja višestrukih testova i istovremeno mjerenje više analita u jednom uzorku. Usporedba ELISA metode i multipleks-tehnologije kod bolesnika u ANCA pridruženom vaskulitisu dala je zadovoljavajuće rezultate. Osjetljivost, pouzdanost i točnost ovih testova slične su kao i kod ELISA postupaka (13).

Interpretacija rezultata

Prema usuglašenim stajalištima pozitivni ANCA IIF rezultati se izvještavaju kao, C-ANCA, P-ANCA i atipična ANCA, a kada se ne mogu odrediti zbog interferencije antinuklearnih antitijela (ANA), to treba naglasiti. Rezultat antigen specifičnog nalaza se izvještava arbitrarnim jedinicama u kombinaciji sa graničnim (eng. *cut-off*) vrijednostima. Rezultati testova koji koriste internacionalne standarde za kalibraciju se izražavaju u internacionalnim jedinicama (IU). Preporuka je da se kao rezultat pretrage izdaje objedinjen IIF ANCA i antigen specifični nalaz, te podaci o osjetljivosti i specifičnosti testa (4).

Predlaže se izražavanje rezultata pomoću omjera vjerojatnosti (eng. *likelihood ratio* - LR). Omjer vjerojatnosti za pozitivan rezultat pretrage (LR+) govori o tome koliko je puta vjerojatnije da će se pozitivan rezultat testa pojaviti u bolesnika nego u zdravog ispitanika,

ovisi o osjetljivosti i specifičnosti testa, a primjenjiv je na određenu kliničku situaciju. Pozitivan LR+ je najbolji pokazatelj za postavljanje dijagnoze što u praksi definira kliničar prema konkretnoj kliničkoj slici. Omjer vjerojatnosti za negativan rezultat (LR-) je dobar pokazatelj za odbacivanje dijagnoze. Laboratorijske metode koje se primjenjuju za otkrivanje ANCA također utječu na omjer vjerojatnosti (3). Očito je da antigen-specifični testovi za otkrivanje ANCA u dijagnostici ANCA vaskulitisa imaju prednost u odnosu na IIF, međutim i između različitih antigen-specifičnih testova može postojati razlika, pogotovo kada granične vrijednosti nisu jasno definirane.

Laboratoriji koriste različite tehnike i metode u dijagnostici ANCA autoantitijela te interpretacija rezultata pomoću omjera vjerojatnosti podrazumijeva određiva-

nje LR prema primjenjenim testovima određenog laboratorija što u konačnici poboljšava dijagnostiku. Da bi se izbjegla varijabilnost u interpretaciji rezultata za ANCA vaskulitise potrebna je bolja standardizacija klinič-

kih manifestacija koje opravdavaju zahtjeve za određivanjem ANCA autoantitijela i standardizacija testova za njihovim dokazivanjem koji se primjenjuju u laboratorijskoj dijagnostici.

Zaključak

Razvoj tehnologije i automatizacija u laboratorijskoj dijagnostici ANCA prati i porast zahtjeva za određivanjem ANCA autoantitijela. Često su zahtjevi nespecifični za određenu dijagnozu što dovodi do porasta lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata. Nadalje zbog velike vari-

jabilnosti među testovima može doći do razlike u rezultatima, što smanjuje stupanj pouzdanosti njihove primjene. Ne postoji univerzalno rješenje tih problema, međutim moguće je poboljšati zahtjeve kliničara i stupanj standardizacije tehnika i metoda u laboratorijskoj dijagnostici.

Literatura

1. Wiik A. Laboratory Diagnostics in Vasculitis Patients. *IMAJ* 2001;3:275-277.
2. Gross WL, Trabandt A, Reinhold-Keller E. Diagnosis and evaluation of vasculitis. *Rheumatology* 2000;39:245-252.
3. Damoiseaux J, Austen J, Cohen Tervaert WJ. ANCA Diagnostics in Clinical Practice: New Developments. In: Amezcua-Guerra LM, ed. *Advances in the Diagnosis and Treatment of Vasculitis*. 2011. Available from: <http://www.intechopen.com/books>.
4. Savige J, Goeken J, Pusey C. Addendum to the International Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies. *Am J Clin Pathol* 2003;120:312-318.
5. Malenica B. Laboratory standard in the diagnosis and therapy monitoring of autoimmune disease: Vasculitis. *J Int Fed Clin Chem Lab Med* 2006;17(3):1-16.
6. Flores-Suárez LF. Laboratory Investigation in the Diagnosis of Vasculitis. *Curr Rheumatology Reports* 2009;11(6):395-401.
7. Gou SJ, Xu PC, Chen M, Zhao MH. Epitope Analysis of Anti-Myeloperoxidase Antibodies in Patients with ANCA-Associated Vasculitis. *PLoS ONE* 2013; 8(4): e60530. www.plosone.org.
8. Arnhold J. Free radicals - friends or foes? *Biochemistry (Moscow)* 2004;69(1):8-15.
9. Stegeman CA. Anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) levels directed against proteinase-3 and myeloperoxidase are helpful in predicting disease relapse in ANCA-associated small-vessel vasculitis. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17:2077-2080.
10. Salamunić I. Laboratorijska dijagnostika autoimunih bolesti - nove tehnologije, stare nedoumice. *Biochemia Medica* 2010;20(1):45-56.
11. Van Der Geld YM, Limburg PC, Kallenberg CGM. Characterization of monoclonal antibodies to proteinase 3 (PR3) as candidate tools for epitope mapping of human anti-PR3 autoantibodies. *Clin Exp Immunol* 1999;118:487-496.
12. Miller A, Chan M, Wiik A, Misbah SA, Luqmani A. An approach to the diagnosis and management of systemic vasculitis. *Clin Exp Immunol* 2010;160:143-160.
13. Damoiseaux J, Vaessen M, Knapen Y, Csernok E, Stegeman CA, van Paassen P, Cohen Tervaert JW. Evaluation of the FIDIS Vasculitis Multiplex Immunoassay for Diagnosis and Follow-up of ANCA-Associated Vasculitis and Goodpasture's Disease. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1109:454-463.
14. Drooger JC, Dees A, Swaak AJG. ANCA-Positive Patients: The Influence of PR3 and MPO Antibodies on Survival Rate and The Association with Clinical and Laboratory Characteristics. *Open Rheumatol J* 2009;3:14-17.