

Imunologické laboratorní testy v diagnostice a sledování pacientů s revmatoidní artritidou

Z. Heřmanová, P. Horák,
H. Ciferská

Revmatoidní artritida (RA) patří k nejčastějším systémovým autoimunitním onemocněním postihujícím především klouby. Vyskytuje se u 0,5-1 % dospělé populace, ženy bývají 2 - 3 x častěji postiženy než muži. V posledních 10 letech byl zaznamenán pokles incidence u žen, spekuluje se o protektivním působení antikoncepce. RA vede ke zkrácení a zhoršení kvality života, cca o 5 - 10 let.

IMUNOPATOGENEZE

Etiologie onemocnění není plně objasněna, zvažuje se genetická predispozice, kde by 40 % připadalo na HLA komplex.

Terčem imunoreaktivity se stává u RA synoviální membrána, která je hyperplastická, silně vaskularizovaná a infiltrovaná zánětlivými buňkami. Předpokládá se, že u geneticky predisponovaného jedince spouští onemocnění několik faktorů jak vnějšího tak vnitřního prostředí. Zvažuje se bakteriální nebo virová infekce (způsobí počáteční aktivaci imunitního systému), stresové proteiny, pohlavní hormony, kouření cigaret, stravovací návyky. V počáteční fázi onemocnění dochází k aktivaci makrofágů v synovii. Uvolněné cytokiny se podílí na diferenciaci dendritických buněk, které jako „antigen prezentující buňky“ migrují do sekundárních lymfatických orgánů, kde předkládají T lymfocytům zpracované antigeny. Klonálně expandované T a B lymfocyty se vrací do kloubu a amplifikují zánět. Ke klíčovým cytokinům patří TNF alfa, který spolu s IL 1 a IL 6 odpovídá za lokální i systémové příznaky onemocnění a indukuje v játrech syntézu proteinů akutní fáze.

Th lymfocyty se podílí na indukcii apoptózy, aktivované makrofágy jsou odpovědné za akumulaci granulocytů, syntézu metaloproteináz a produkci dusíkatých mediátorů. B lymfocyty se diferencují do plasmatických buněk, které produkují autoprotilátky. Ty po vazbě se svými autoantigeny tvoří imunokomplexy, které se ukládají v tkáních a aktivují komplement, fagocytózu a rozvíjí se poškozující

zánět. Chronický zánět vede k proliferaci synoviální výstelky a k přeměně na pannus. Th1 ly podporují neovaskularizaci vlivem na fibroblasty a endotelové buňky, působením na osteoklasty dochází k destrukci kostní hmoty.

KLINICKÝ OBRAZ RA

Onemocnění začíná nejčastěji mezi 30. – 50. rokem života, objevují se bolesti a ranní ztuhlost drobných kloubů. Chronický zánět v oblasti synoviální výstelky je následován vznikem erozí chrupavky a kosti, které vedou k vážným ireverzibilním kloubním deformitám. Systémové příznaky se mohou vyskytnout jen u části pacientů a patří k nim postižení kůže ve formě podkožních uzlíků, vaskulitidy, postižení svalů, nervů, očí, srdce a plic.

KRITÉRIA PRO RA

Ke kritériím pro stanovení diagnózy RA podle Americké revmatologické asociace (ACR) z r. 1988 patří: ranní ztuhlost (alespoň 1 hod.), artritida 3 nebo více kloubů, artritida ručních kloubů, symetrická artritida, revmatické uzle, revmatoidní faktory, RTG změny (kloubní eroze).

LABORATORNÍ VYŠETŘENÍ

Zvýšená sedimentace červených krvinek odráží aktivitu onemocnění, dlouhodobě zvýšená FW je považována za nepříznivý faktor. Častějším markerem aktivity zánětu je stanovení C- reaktivního proteinu, který může být u RA středně zvýšen. U pacientů se objevuje postupná anemizace, méně často trombocytóza a leukocytóza. Mohou být zvýšené Ig i CIK, při atakách se hladina složek komplementu snižuje. Závažnější průběh onemocnění bývá asociován s výskytem HLA antigenů druhé třídy HLA-DR4 (alel HLA-DRB1*0401, DRB1*0404) a HLA-DR1 (alely DRB1*0101). Relativní riziko vzniku onemocnění se u HLA-DR4 udává 6.

Vyšetření autoprotilátek:

Antinukleární protilátky bývají pozitivní až v 50 % případů, ale pro svoji nízkou specifičnost nemají větší význam.

Revmatoidní faktory (RF) patří k nejčastěji se vyskytujícím autoprotilátkám. RF můžeme detekovat v séru, v synoviální tekutině a v tkáních. Reagují s modifikovanou konfigurací Fc fragmentu IgG, které jsou tvořeny synoviálními lymfocyty. K modifikaci fragmentu může dojít např. po vazbě IgG na antigen, tepelnou denaturací, vlivem kyslíkatých radikálů uvolněných z polymorfonukleárů, polyklonální stimulací EB viry. RF se vyskytují u řady chorob a jejich přechodný výskyt může být i reakcí imunitního systému na dlouhotrvající nefyziologič-

ky podnět. Z revmatických chorob se RF vyskytují u RA (přibližně ve 70 - 80 %, RA s výskytem RF je označována jako séropozitivní a mává horší prognózu), JRA, psoriatické artritidy, SLE, Sjögrenova syndromu, systémové sklerodermie, dermatomyozitidy, smíšené choroby pojiva, ankylozující spondylitidy, osteoartrózy. RF se mohou dále detekovat i u nerevmatických onemocnění, např. u chronických hepatopatií, idiopatické intersticiální plicní fibrózy, lues, TBC plic, artritidy u lymfské boreliózy, subakutní bakteriální endokarditidy. Přechodný výskyt RF můžeme stanovit u akutních infekcí, chřipky, infekční mononukleózy, akutní hepatitidy, ojediněle po vakcinaci nebo u nemocných v hemodialyzačním programu. RF můžeme nalézt i u zdravých osob, ve věku do 30 let ve 2 %, u 30 - 60ti letých ve 4 %, nad 60 let až ve 24 %. RF se v minulosti stanovoval zejména latex fixačním testem, který byl nahrazen nefelometrickými nebo turbidimetrickými screeningovými metodami. ELISA metoda umožňuje stanovení RF v izotypech IgG, IgA, IgM. Pacienti mohou mít RF pozitivní ve všech třídách nebo jen jednotlivě. RF IgA je spojován s kostní erozí a s horší prognózou onemocnění. Hladina RF IgG by měla korelovat s aktivitou onemocnění. Pozitivita ve všech třídách společně zvyšuje specifčnost pro RA.

*Anti*perinukleární a *antikeratinové* protilátky se mohou detekovat metodou nepřímé imunofluorescence. Vzhledem k obtížné standardizaci a poměrně nízké senzitivitě vyšetření nebyla tato stanovení výrazně rozšířena.

Protilátky proti cyklickým citrulinovaným peptidům (anti-CCP) jsou v současné době široce využívané vyšetření u pacientů s RA. U jiných systémových autoimunitních onemocnění či infekčních stavů se vyskytují jen ojediněle. Anti-CCP se v séru pacientů mohou objevit řadu roků před vzplanutím příznaků RA. Přítomnost vyšších hladin auto-*protilátek* na počátku onemocnění znamená větší riziko závažnějšího průběhu RA s rychlejší progresí onemocnění. K testování se používá druhá generace ELISA testů, která obsahuje patentovaný antigen (tj. citrulinované peptidy identifikované v peptidové knihovně pomocí sér pacientů s RA). Senzitivita anti-CCP protilátek se udává 68 - 75 %, specifcita 90 - 98 %. Proces citrulinace probíhá posttranslačními úpravami argininových zbytků na citrulinové. Při porušení buněčné stěny (např. během odumírání a smrti buňky) dochází k difuzi Ca iontů do nitra buněk a k aktivaci enzymu peptidylarginin deiminázy (PAD). PAD difunduje vně buňky a umožňuje citrulinaci extracelulárních proteinů. Týká se to zejména filaggrinu, ale i další proteiny mohou podléhat procesu citrulinace: histony, vimentin (Sa antigen),

fibronektin, kolagen (typ I, II), fibrin, fibrinogen, myelinový bazický protein. Citrulinace proteinů obecně doprovází zánět, ale tvorba autoprotilátek anti-CCP je typická pro RA.

Anti-Ra33 protilátky jsou namířeny proti heterogennímu nukleárnímu ribonukleoproteinu A2 (hn RNP A2) s molekulární hmotností 33 kDa. Poprvé byly popsány v roce 1989 Hassfeldem, a to u pacientů s RA. hn RNP A2 je multifunkční protein zapojený do zpracování, transportu a translace mRNA. Vyskytuje se ve většině tkání a orgánů, ale vyšší exprese proteinu je sledována především u zánětů synoviální tkáně a u tumorózních stavů. Anti-RA33 se vyskytují u zhruba třetiny případů RA, u pacientů s SLE a s MCTD je prevalence podobná. Anti-RA33 lze detekovat již ve velmi časných stádiích RA. V případě, že v séru detekujeme pouze anti-RA33 a další protilátky jsou negativní (RF a anti-CCP), má pacient lepší prognózu. Role anti-RA33 v patogenezi RA není plně objasněna.

NAŠE ZKUŠENOSTI S VYŠETŘOVÁNÍM AUTOPROTILÁTEK

V roce 2007 bylo celkem vyšetřeno 1023 vzorků sér u pacientů z revmatologické ambulance III. interní kliniky FN Olomouc na přítomnost anti-CCP protilátek a RF. K vyhodnocení byly použity výsledky prvního stanovení těchto protilátek (n = 577).

Anticitrulinové protilátky byly stanovovány metodou ELISA za použití setu Immunoscan RA firmy EURO-DIAGNOSTICA. Podle doporučení výrobce soupravy hodnoty nad 25 U/ml byly považovány za pozitivní. Revmatoidní faktor byl stanovován nefelometricky na analyzátoru BN II s použitím diagnostik firmy Dade Behring. Výrobce udává hranici pozitivity 15 IU/ml.

Tabulka 1 znázorňuje počty pacientů s jednotlivými diagnózami a zastoupení v jednotlivých skupinách: anti-CCP+/RF+, anti-CCP+/RF-, anti-CCP-/RF+, anti-CCP-/RF-.

V tabulce 2 je uvedena senzitivita, specifcita, pozitivní a negativní prediktivní hodnota (PPH, NPH) porovnávaných testů. Relativní přínos metody anti-CCP v senzitivitě oproti RF činí 1,403, atributivní přínos činí 0,226.

Můžeme konstatovat, že senzitivita a specifcita v uvedeném souboru pacientů a ojedinělý výskyt anti CCP protilátek i u jiných diagnóz jsou v souladu s literárními údaji. Anti-CCP protilátky mají vysokou pozitivní a negativní prediktivní hodnotu, slouží jako diagnostický a prognostický nástroj u RA.

Ve druhé studii jsme porovnávali přítomnost autoprotilátek anti-RA33, RF a anti-CCP ve vzorcích u pacientů z revmatologické poradny FN Olomouc a v kontrolních vzorcích.

Vyšetřili jsme 147 krevních vzorků pacientů (u 101 žen a 46 mužů) a 20 kontrolních sér. Tabulka 3 znázorňuje počet pacientů v jednotlivých skupinách onemocnění. Protilátky anti-RA33 ve třídě IgG byly stanoveny metodou ELISA za použití komerčního kitu IMTEC (Germany) s navázaným rekombinantním antigenem, RF byl stanoven na nefelometru BN II a anti-CCP protilátky metodou ELISA se soupravou Euro-Diagnostica.

Ze 147 vzorků pacientů bylo 28 pozitivních nálezů na anti-RA33. Z tohoto počtu u pacientů s RA (n = 95) bylo 18 pozitivních výsledků, u pacientů se systémovým onemocněním pojiva (n = 13) byl 8 x pozitivní nález (2x Sharpův syndrom, 6x nediferencované onemocnění pojiva) a 2 x pozitivní nález u nespecifikované artritidy (n = 11, hodnoty jen těsně nad hranicí positivity). Kontrolní vzorky byly všechny negativní.

Tabulka 4 znázorňuje zastoupení počtu vzorků s různými kombinacemi pozitivních výsledků autoprotilátek (anti-CCP, RF a anti-RA33) u pacientů s RA (n = 95).

Podle literárních údajů (Y. Shoenfeld, M. E. Gershwin, P. I. Meroni: Autoantibodies) se anti-RA33 vyskytují u 30 – 35 % pacientů s RA, v 20 – 25 % u SLE a v 35 – 40 % u Sharpova syndromu. V našem souboru pacientů s RA byla specifická anti-RA33 80,8% a senzitivita anti-RA33 18,9 %. Anti-RA33 představují možný dodatkový marker u pacientů s RA, s Sharpovým syndromem a s SLE, i když jejich výskyt je limitovaný.

ZÁVĚR

Revmatoidní artritida je závažné onemocnění silně ovlivňující kvalitu života pacientů. Včasné stanovení diagnózy a zahájení vhodné terapie zabraňuje rozvoji destruktivních erosivních kostních změn. Kromě anamnestických údajů, klinického vyšetření, RTG snímků i laboratorní výsledky pomáhají při stanovení diagnózy RA. Revmatoidní faktor, anticitrulinové protilátky a anti-RA33 představují laboratorní screening, i když v případě anti-RA33 protilátek není senzitivita vyšetření vysoká.

(Literatura u autorů)

Tabulka 1: Výsledky vyšetření autoprotilátek anti-CCP a RF v jednotlivých skupinách onemocnění.

Diagnóza	Počet	aCCP+/RF+	aCCP+/RF-	aCCP-/RF+	aCCP-/RF-
Revmatoid. artritida	164	87	42	5	30
Osteoartróza	129	0	2	18	109
Systémová onem.	94	0	2	14	78
Jiná onemocnění	64	0	1	2	61
M. Bechtěrev	42	0	0	1	41
Reaktivní artritida	27	0	0	2	25
Nediferen. artritida	16	0	3	0	13
JRA	15	3	0	1	11
Psoriatická artritida	14	0	0	0	14
Osteoporóza	12	0	0	0	12

Tabulka 2: Senzitivita, specifická, pozitivní a negativní prediktivní hodnota (PPH, NPH) porovnávaných testů: RF a anti-CCP.

	senzitivita	specifická	PPH	NPH
RF	0,561	0,901	0,692	0,838
CCP	0,787	0,976	0,921	0,92

Tabulka 3: Počty pacientů ve skupinách ve druhé studii

Diagnóza	Počet
Revmatoidní artritida	95
Polyartróza	11
Systémové onemocnění pojiva	13
Jiná artritida	11
Ostatní dg (dna, M. Bechtěrev, osteoporóza, myalgie, flebitida)	17
Kontrolní vzorky	20

Tabulka 4: Zastoupení pozitivních autoprotilátek u pacientů s RA ve druhé studii

CCP+ RF+ RA33+	CCP+ RF+ RA33-	CCP+ RF- RA33-	CCP- RF- RA33-	CCP+ RF- RA33+	CCP- RF- RA33+	CCP- RF+ RA33+	CCP- RF+ RA33-
9 (9,47%)	36 (37,9 %)	15 (15,8 %)	23 (24,2 %)	5 (5,3 %)	3 (3,15 %)	1 (1,05 %)	3 (3,15 %)