ΕΠΕΜΥ
Επιστημονική Εταιρεία για τη Μυοσκελετική Υγεία

Αυτοαντισώματα στη Ρευματολογία
Από το μικροσκόπιο και την ELISA, στο τελικό αποτέλεσμα του ανοσολογικού εργαστηρίου

Χρήστος Λιάσκος
Βιολόγος - Παθολόγος, Ακαδημαϊκός Υπότροφος, Υπεύθυνος Εργαστηρίου Ρευματολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας, Λάρισα

Σύγκρουση Συμφερόντων

ΚΑΜΙΑ

Εισαγωγή

- Η ανίχνευση των αυτοαντισωμάτων έχει κυρίως διαγνωστική αξία στα αυτοάνοσα ρευματικά νοσήματα
- Κανένα από αυτά τα αυτοαντισώματα δεν έχει 100% ειδικότητα ή 100% ευαισθησία
- Ένα από τα κυριότερα προβλήματα στον έλεγχο των αυτοαντισωμάτων (πχ των ANA) είναι τα «ψευδώς» θετικά ή τα «ψευδώς» αρνητικά.
- Η αξιοπιστία του εργαστηρίου είναι ο κυριότερος λόγος για να αποφεύγονται διαγνωστικά λάθη στην ανίχνευσή τους.

Εισαγωγή ΙΙ

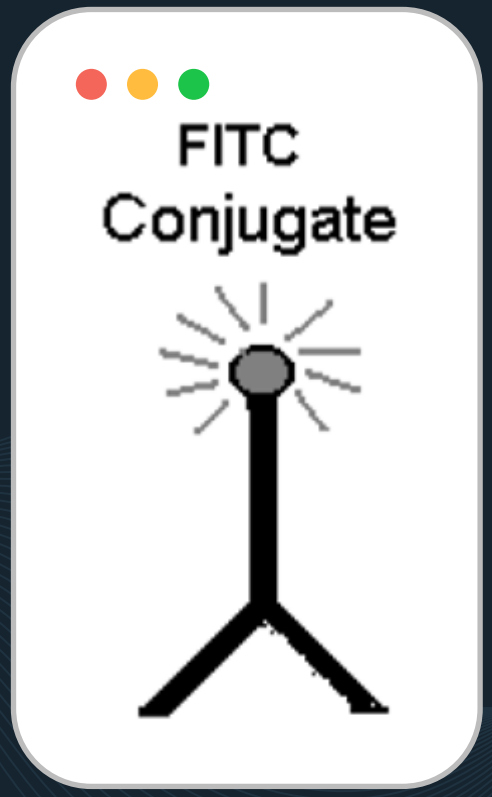
- Δεν θεραπεύουμε τα αυτοαντισώματα αλλά τον ασθενή
- Στην συντριπτική τους πλειοψηφία δεν τα ελέγχουμε παρά μόνο στη διάγνωση (1 τέστ ανά ασθενή εφόρου ζωής)
- Δεν μας ενδιαφέρει ο πολύ υψηλός ή ο υψηλός ή ο μέτριος τίτλος/συγκέντρωση τους (όλοι οι «αξιόπιστοι» θετικοί τίτλοι έχουν την ίδια διαγνωστική αξία
- Μόνο αν ΔΕΝ μας «κολλάει» κάτι με τη διαφορική διάγνωση τα επανελέγχουμε (ψευδώς θετικό ή ψευδώς αρνητικό)

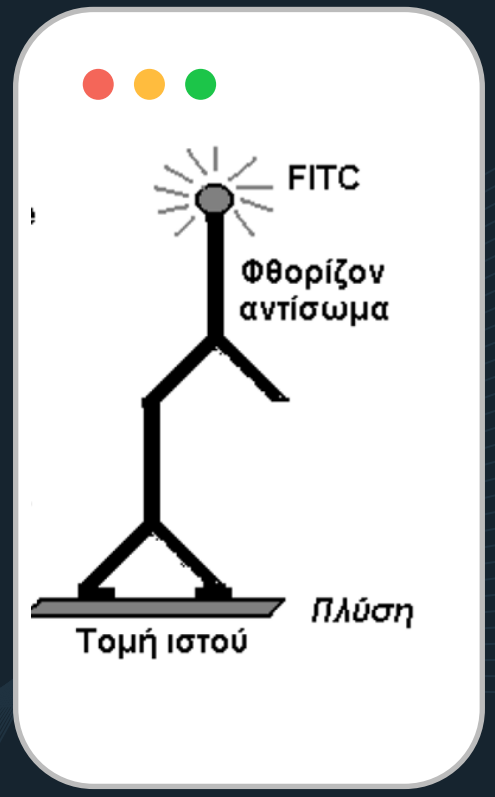
Οι δυο κλασικές μέθοδοι που παραδοσιακά χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των αυτοαντισωμάτων αυτών είναι:

- ο έμμεσος ανοσοφθορισμός (IIF) και
- η τεχνική της ενζυμο-συζευγμένης ανοσοαπορρόφησης (ELISA)

ΒΑΣΙΚΗ ΑΡΧΗ IIF

Ανοσοϊστοχημική τεχνική, όπου ένα σύμπλεγμα Ag-Ab γίνεται ορατό με την βοήθεια άλλου Ab σημασμένου με φθοριόχρωμα και παρατήρηση με μικροσκόπιο φθορισμού





Φθοριοχρώματα ή φθορίζουσες χρωστικές

Φθορισμός: εκπομπή φωτός μεγαλύτερου μήκους κύματος από μια ουσία όταν αυτή ακτινοβοληθεί από φως μικρότερου μήκους κύματος

Φθοριοχρώματα ή φθορίζουσες χρωστικές

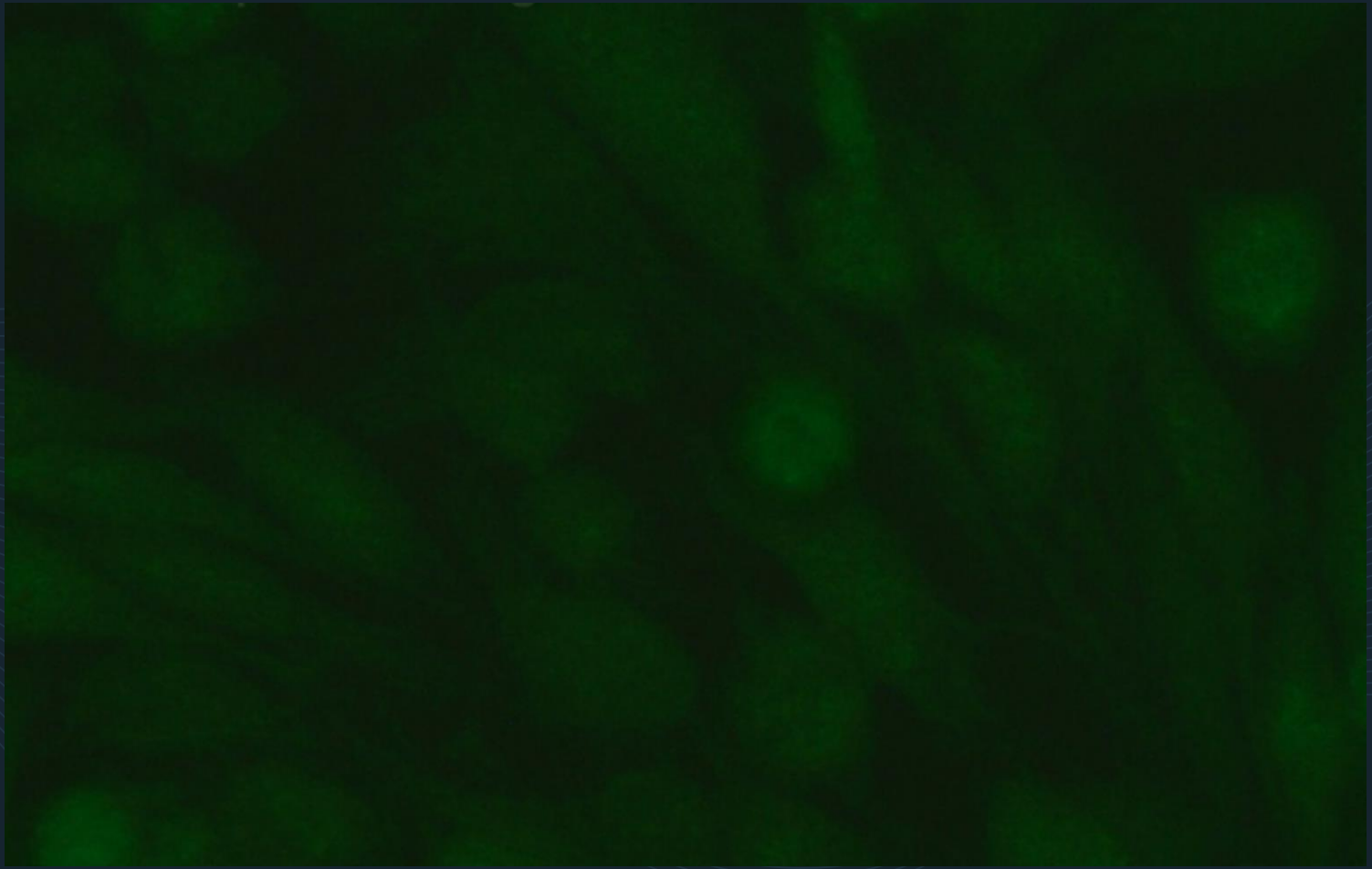
Fluorescent Label	Color	Abs (nm)	Em (nm)	MW (daltons)
DyLight™ 405	Blue	400	420	793
ATTO 425	Blue	436	484	498
Cy2™	Blue Green	489	505	897
DyLight™ 488	Blue Green	493	518	1,011
ATTO 488	Green	501	523	981
Fluorescein (FITC)	Green	495	528	390
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
Cy3™	Yellow Green	552	565	949
DyLight™ 549	Yellow Green	550	568	982
Rhodamine (TRITC)	Orange	550	570	444
R-Phycoerythrin (RPE)	Orange	488	575	240,000
ATTO 550	Orange	554	576	791
Cy3.5™	Orange Red	581	596	1,286
Texas Red®	Red	596	620	625
ATTO 594	Red	601	627	1389
Allophycocyanin	Far-Red	650	660	100,000
Cy5™	Far-Red	650	667	975
ATTO 647N	Far-Red	644	669	843
DyLight™ 649	Far-Red	646	674	1,008
ATTO 655	Far-Red	663	684	887
Cy5.5™	Near Infra-Red	678	703	1,312
DyLight™ 680	Near Infra-Red	682	715	950
DyLight™ 800	Infra-Red	770	794	1,050

Απορρόφηση: 495 nm (μπλε)

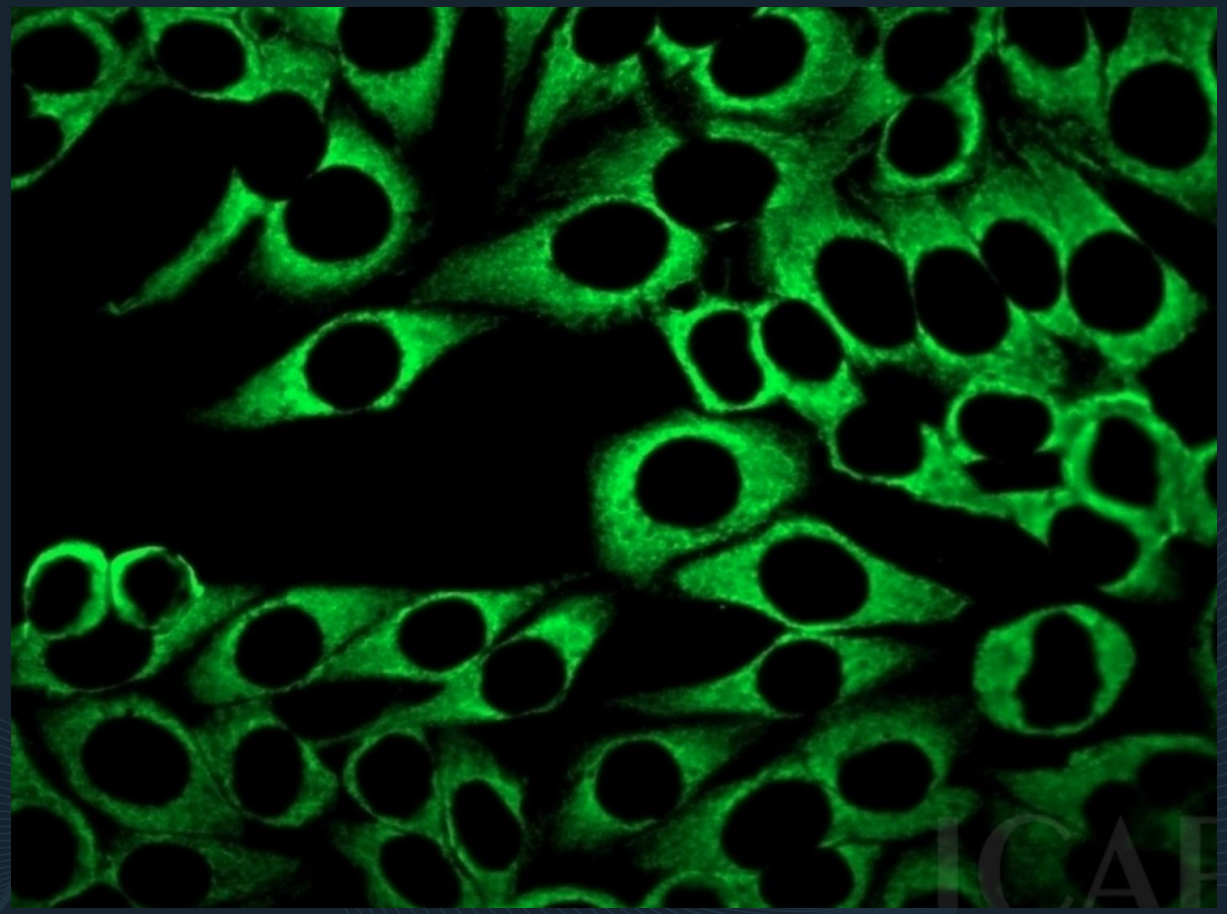
Εκπομπή: 528 nm (πράσινο)

FITC (ισοθυοκυανική φλουορεσκείνη)

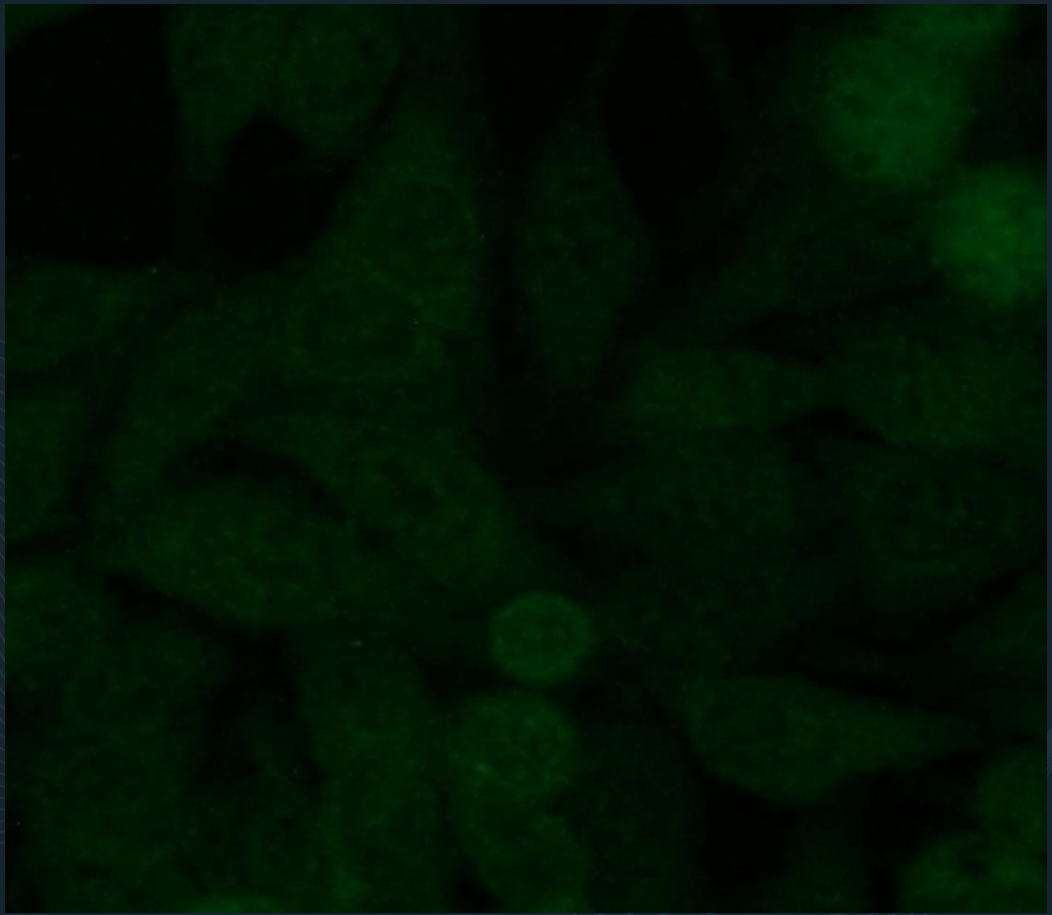
Έλεγχος- Έμμεσος Ανοσοφθορισμός Αρνητικό Τεστ



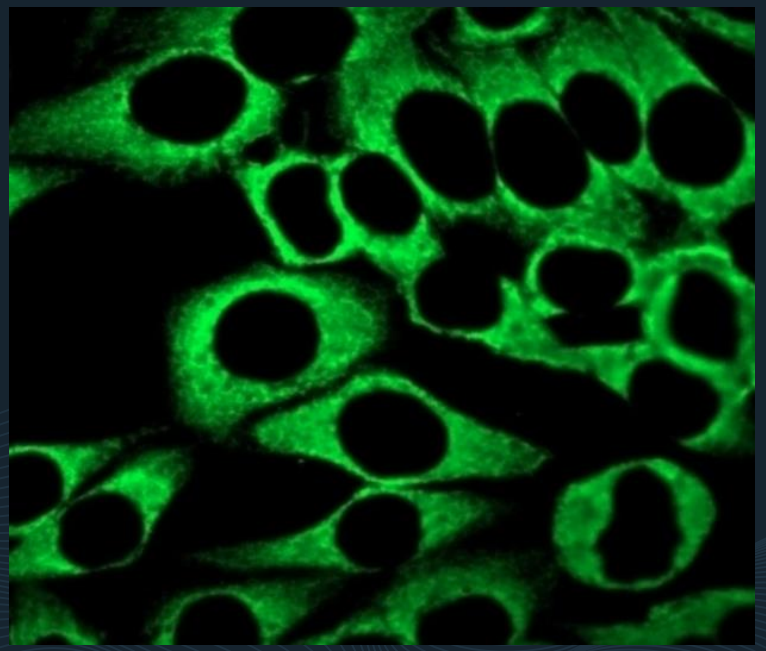
Έλεγχος- Έμμεσος Ανοσοφθορισμός- Θετικό Τεστ

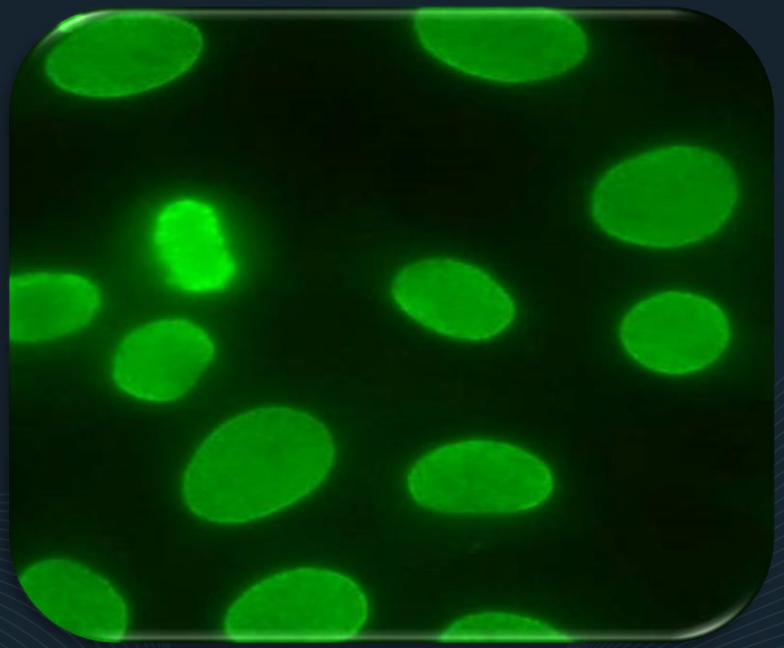


Έλεγχος- Έμμεσος Ανοσοφθορισμός Αρνητικό Τεστ



ΟΛΑ ΤΑ ΘΕΤΙΚΑ HE-p2 ΑΝΑ ΤΕΣΤ ΔΕΝ ΕΙΝΑΙ ΑΝΑ





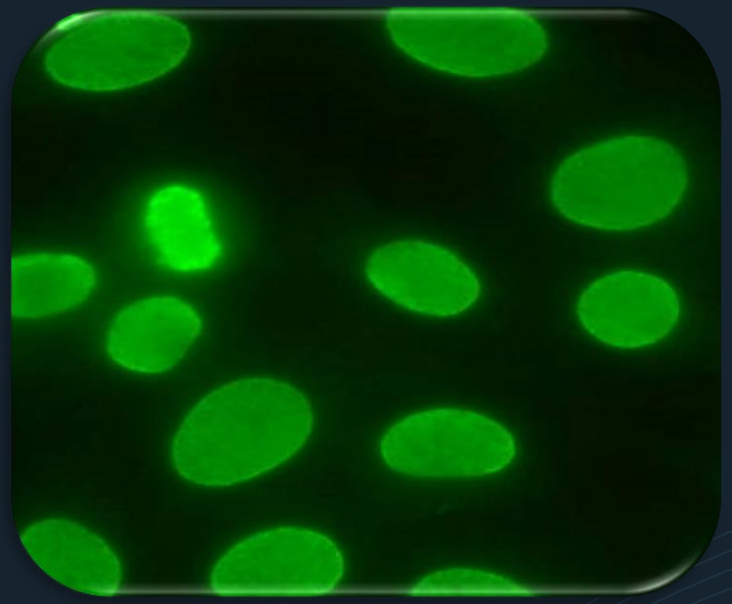
ΠΟΙΟ ΑΠΟ ΑΥΤΑ ΤΟ ΑΝΑ ΕΙΝΑΙ ΘΕΤΙΚΟ ΓΙΑ ΑΝΑ;

ANA

1ος ασθενής

Αραίωση

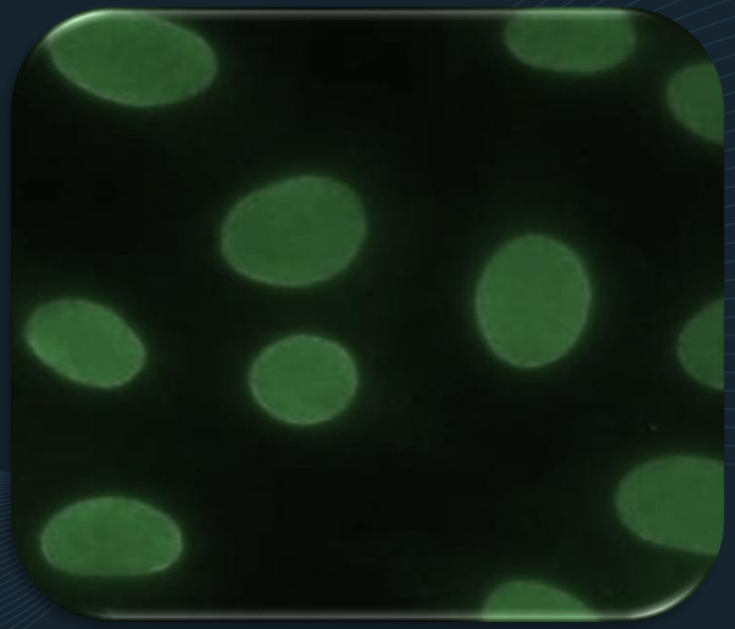
1/80

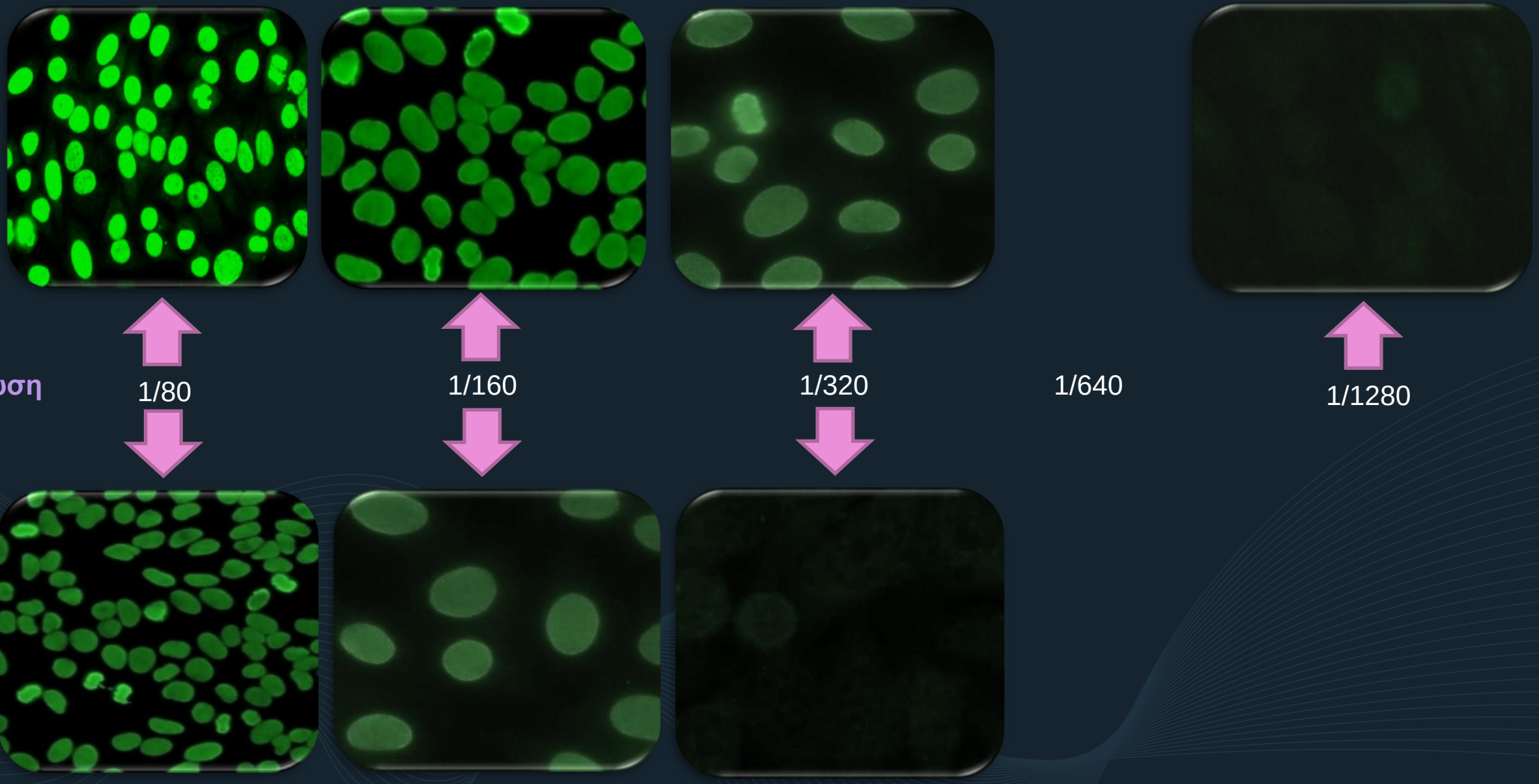


2ος ασθενής

Αραίωση

1/80




Αραίωση
1/80
1/160
1/320
1/640
1/1280

14 ΕΠΕΜΥ
Πανελλήνιο Συνέδριο
Ρόδος
29 Σεπτεμβρίου - 2 Οκτωβρίου 2022

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ:			
ΠΑΤΡΩΝΥΜΟ:		ΦΥΛΟ Άνδρας	ΗΛΙΚΙΑ 32ετών
Α/Α	757673	ΔΕΙΓΜΑ	Ορός
ΗΜΕΡ. & ΩΡΑ ΠΑΡΑΛΑΒΗΣ:	21/9/2022 16:40	ΑΡ.ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΟΥ	8539657
ΗΜΕΡ. & ΩΡΑ ΕΓΚΡΙΣΗΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ		ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΙΘΒΙΟΧΙ

ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Περιγραφή εξέτασης	Ευρεθείσα Τιμή	Τιμές Αναφοράς
Αντισώματα P-ANCA	1,51(Αρνητικό) AU/ml	<16 AU/ml Αρνητικό >= 24 AU/ml Θετικό

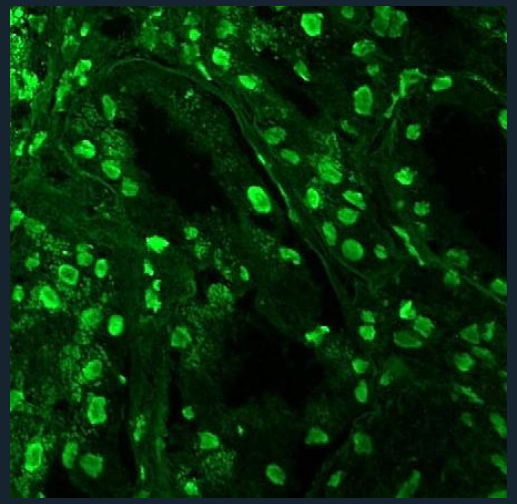
ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Περιγραφή εξέτασης	Ευρεθείσα Τιμή	Τιμές Αναφοράς
ΑΝΤΙΠΥΡΗΝΙΚΑ (ΑΝΑ)	0,9(Αρνητικό) index	>12 Θετικό <8,0 Αρνητικό

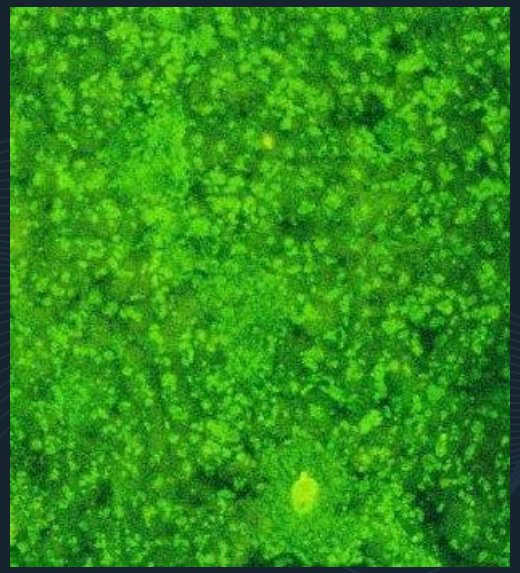
ΑΥΤΗ Η ΜΕΘΟΔΟΣ

ΔΕΝ ΕΙΝΑΙ IIF

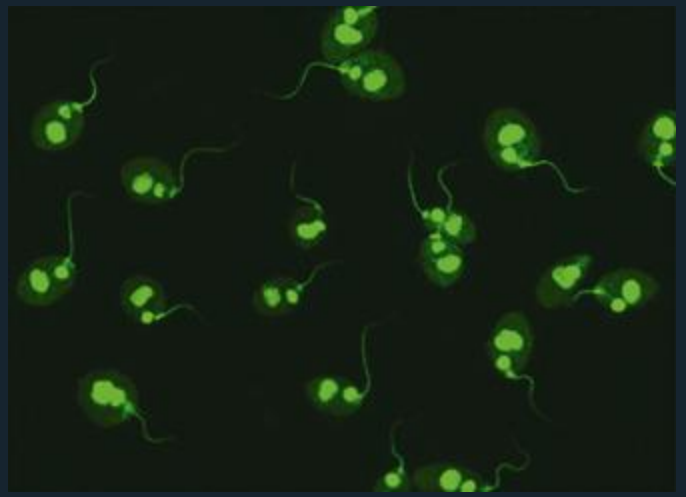
ANA με IIF



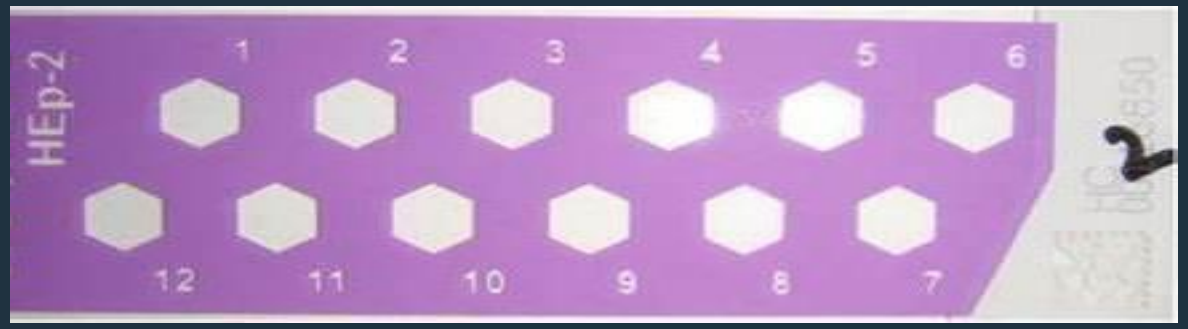
νεφρός

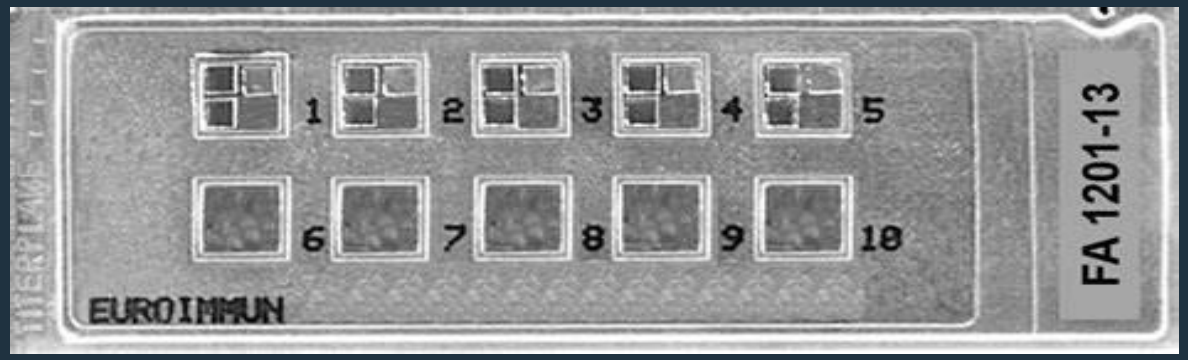


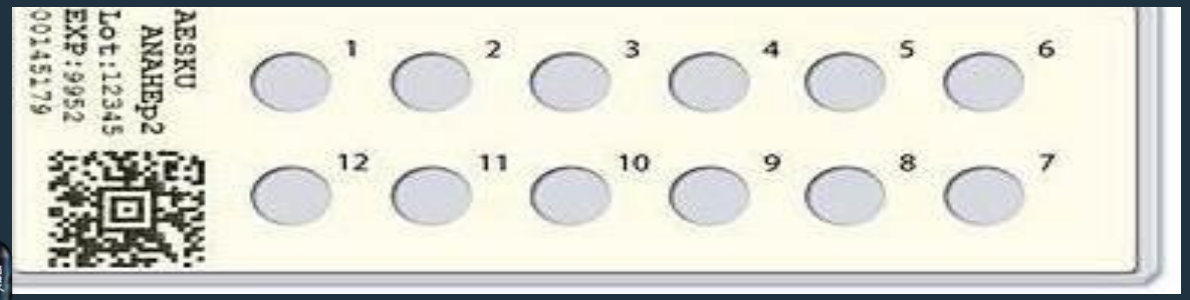
ήπαρ



Crithidia luciliae



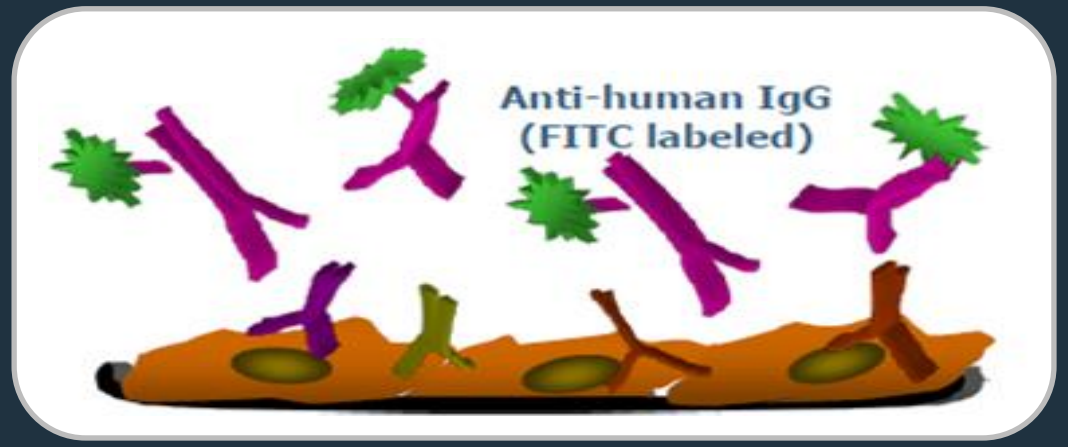




slides HEp2 κυττάρων εμπορίου

IIF σε HEp2

Επώαση με ορό πλακιδίων επιστρωμένων με HEp2



Επώαση με το δευτερογενές συζευγμένο αντίσωμα

Παρατήρηση στο μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού

IIF σε HEp2

Αλγόριθμος μικροσκόπησης ΑΝΑ σε πλακίδια ανοσοφθορισμού

Ερώτηση 1η: Θετικό ή αρνητικό (υπάρχει φθορισμός;)

Ερώτηση 2η: Ο φθορισμός εντοπίζεται στον πυρήνα, στο κυτταρόπλασμα ή περιφερικά του πυρήνα;

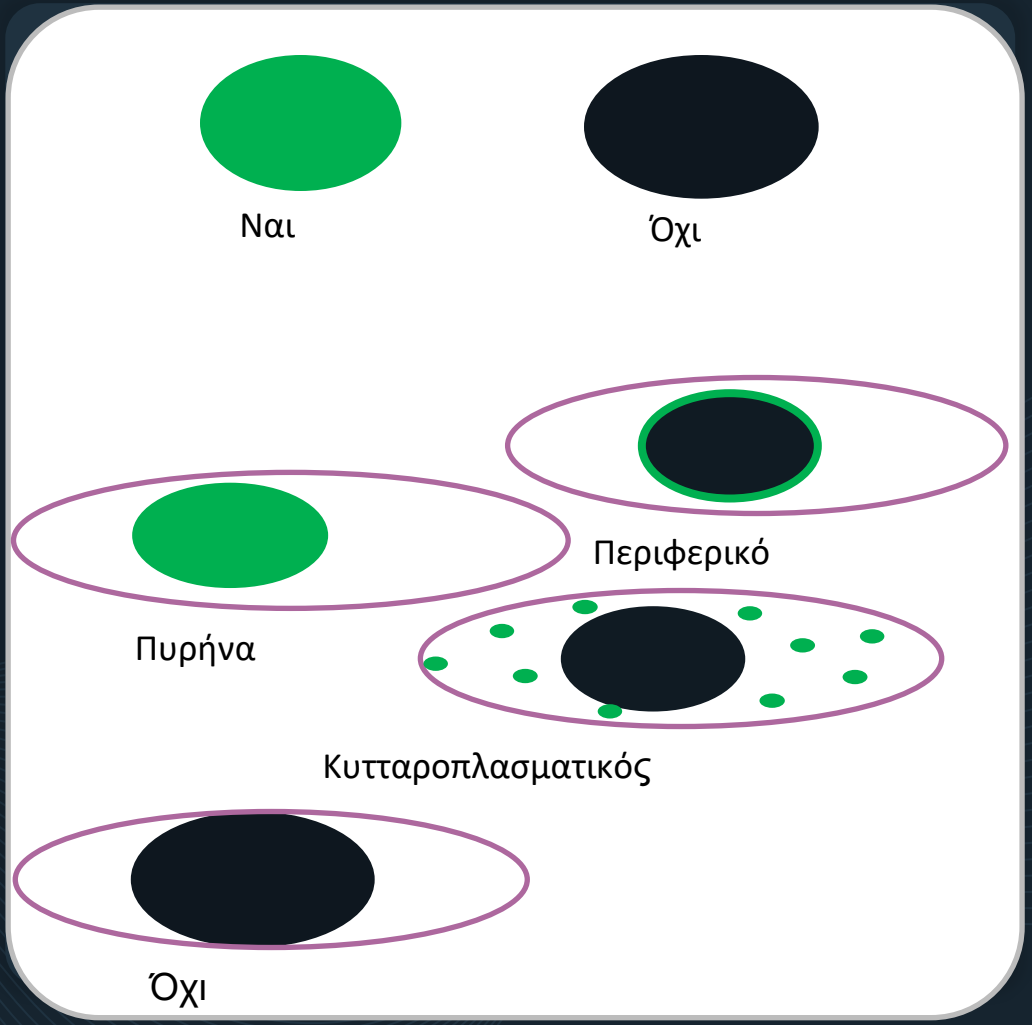
Ερώτηση 3η: Εάν είναι πυρηνικός, τι είδους φθορισμό έχει ο πυρήνας;

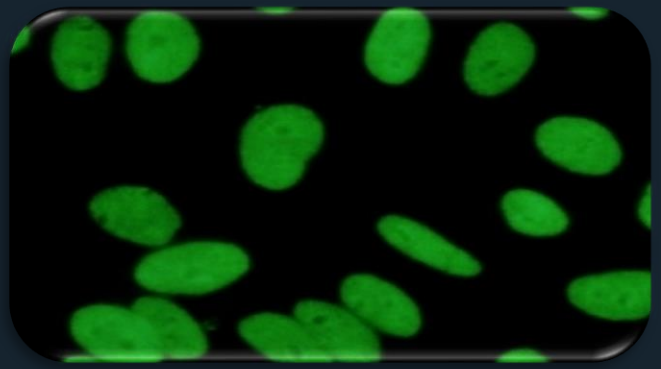
Ερώτηση 4η: Ποιος είναι ο τίτλος-αραίωση?

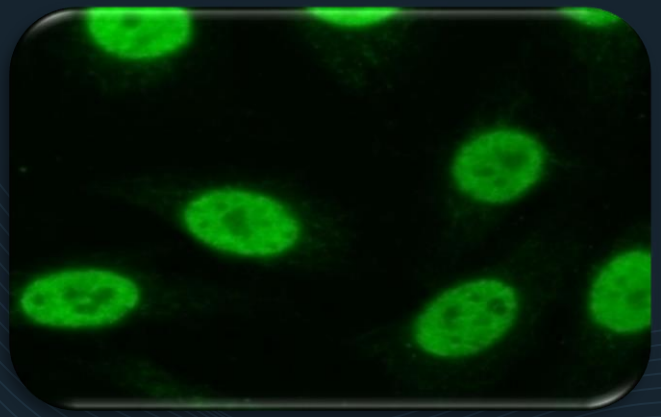
Αλγόριθμος μικροσκόπησης ANA σε πλακίδια ανοσοφθορισμού

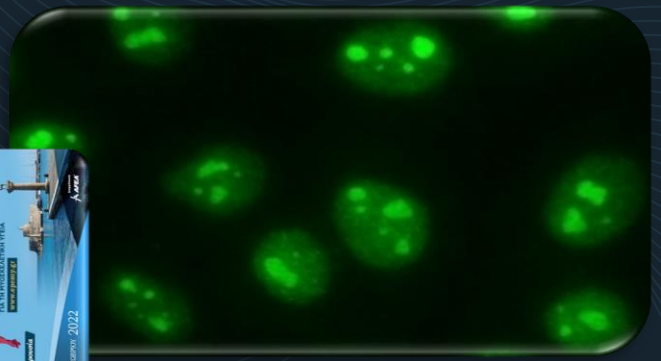
Ερώτηση 1η: Θετικό ή αρνητικό (υπάρχει φθορισμός;)

Ερώτηση 2η: Ο φθορισμός εντοπίζεται στον πυρήνα, στο κυτταρόπλασμα ή περιφερικά του πυρήνα;



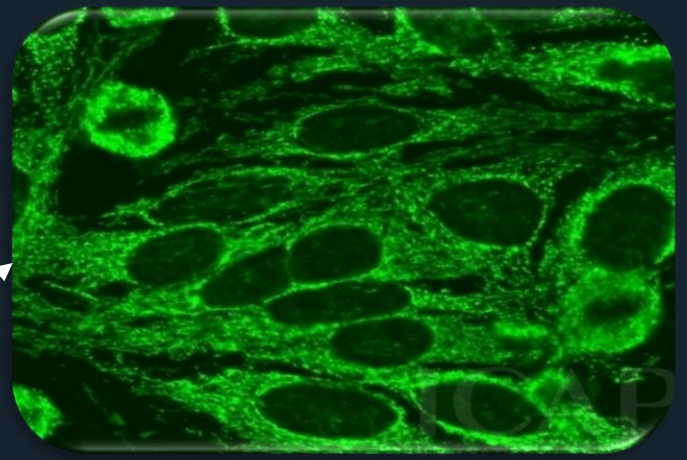


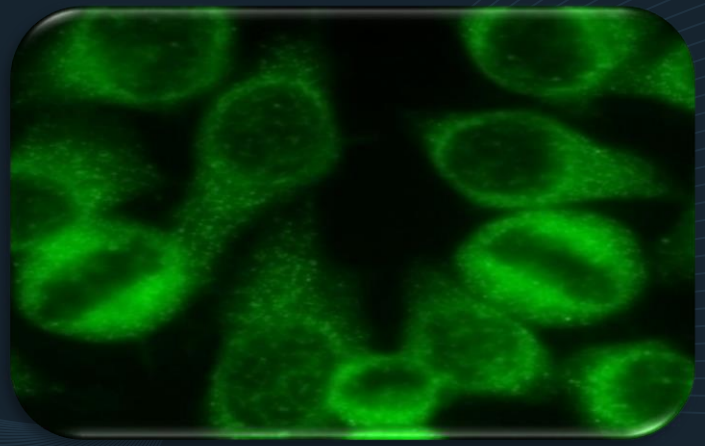




ΠΥΡΗΝΙΚΟΣ ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ

ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΟΣ ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ



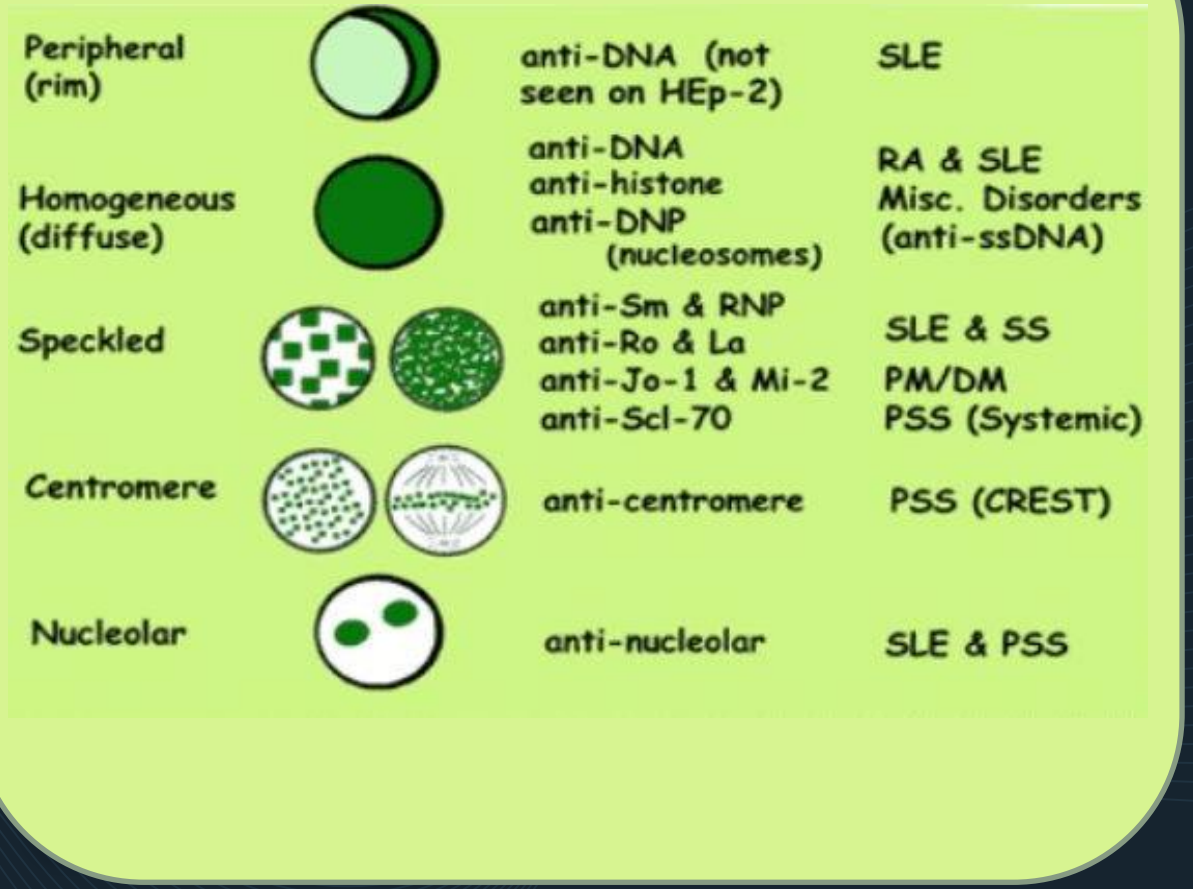


Αλγόριθμος μικροσκόπησης ANA σε πλακίδια ανοσοφθορισμού

Ερώτηση 1η: Θετικό ή αρνητικό (υπάρχει φθορισμός;)

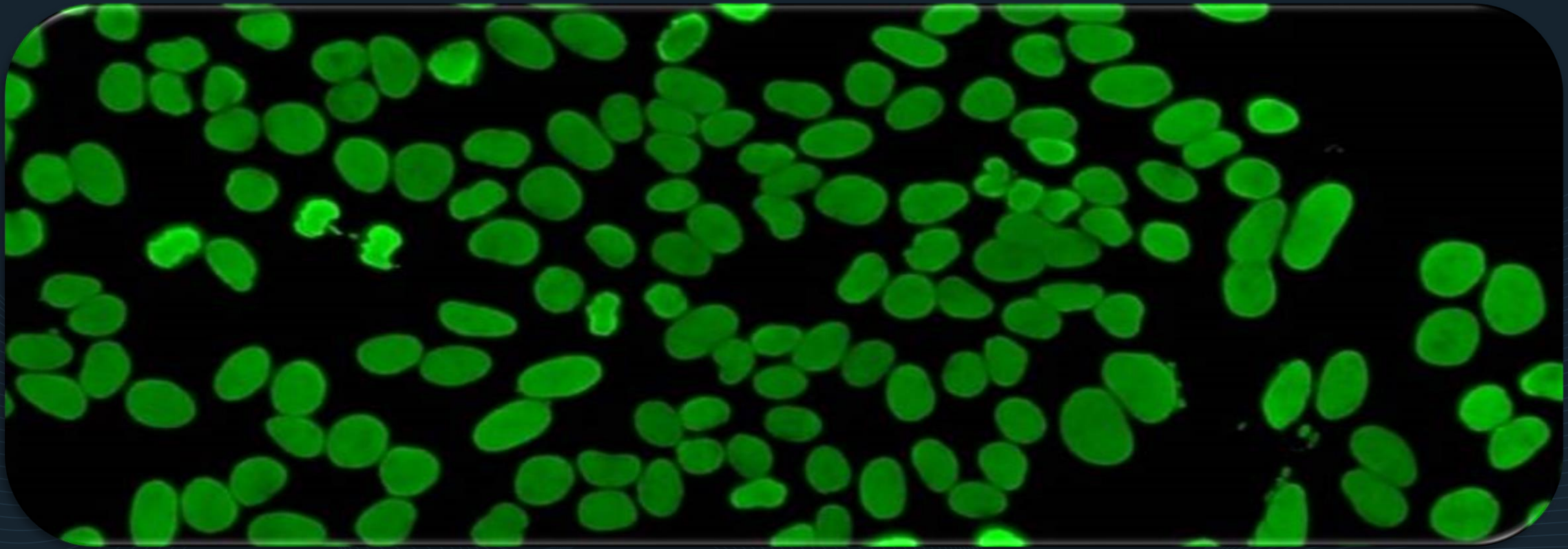
Ερώτηση 2η: Ο φθορισμός εντοπίζεται στον πυρήνα, στο κυτταρόπλασμα ή περιφερικά του πυρήνα;

Ερώτηση 3η: Εάν είναι πυρηνικός, τι είδους φθορισμό έχει ο πυρήνας;

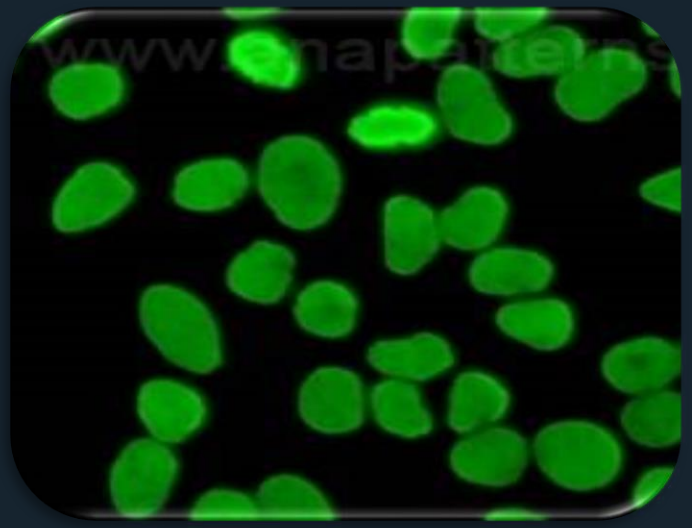


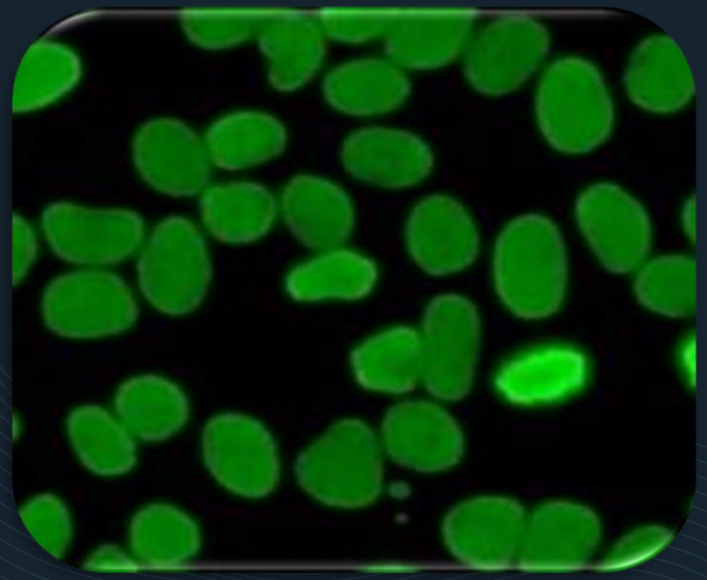
Peripheral (rim)	anti-DNA (not seen on HEp-2)	SLE
Homogeneous (diffuse)	anti-DNA anti-histone anti-DNP (nucleosomes)	RA & SLE Misc. Disorders (anti-ssDNA)
Speckled	anti-Sm & RNP anti-Ro & La anti-Jo-1 & Mi-2 anti-Scl-70	SLE & SS PM/DM PSS (Systemic)
Centromere	anti-centromere	PSS (CREST)
Nucleolar	anti-nucleolar	SLE & PSS

Ομοιογενής



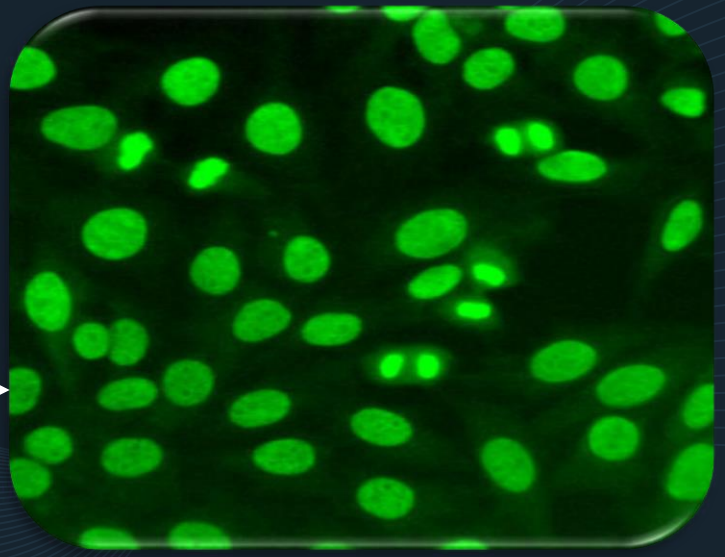
ΣΕΛ



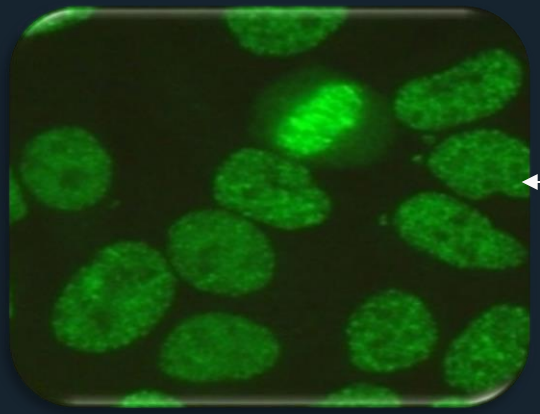


ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ
ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ

ΑΥΤΟΑΝΟΣΟΣ
ΥΠΟΘΥΡΕΟΕΙΔΙΣΜΟΣ

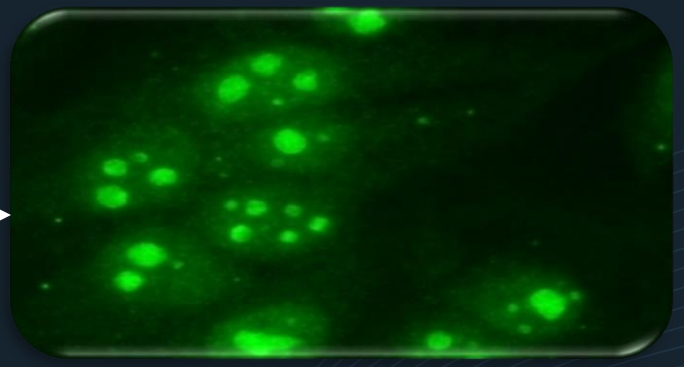


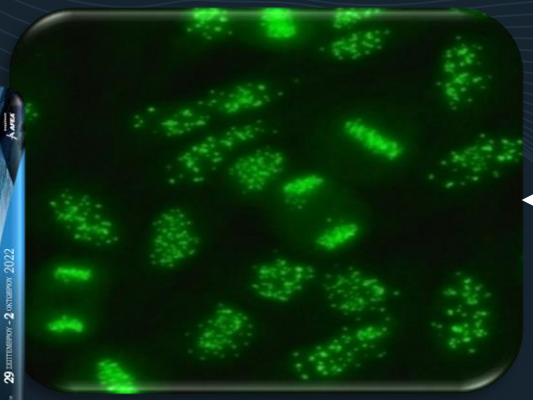
ΠΥΡΗΝΙΚΑ ΠΡΟΤΥΠΑ



ΛΕΠΤΟΣ ΣΤΙΚΤΟΣ

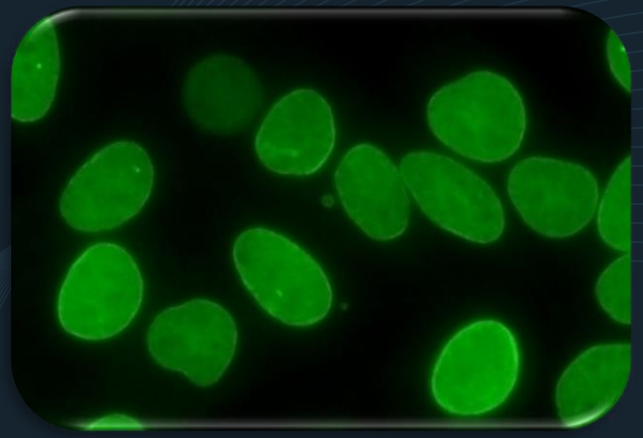
ΠΥΡΗΝΙΣΚΙΚΟΣ



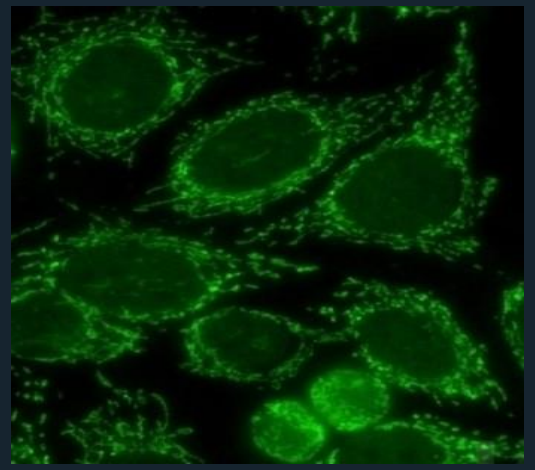


ΚΕΝΤΡΟΜΕΡΙΔΙΑΚΟΣ

ΠΥΡΗΝΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ

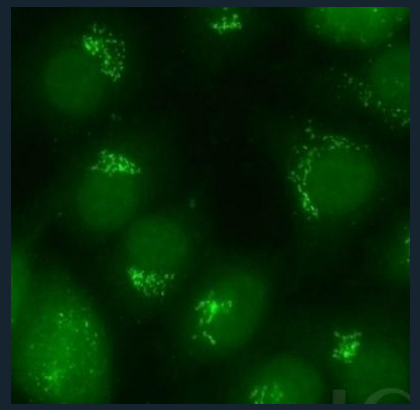


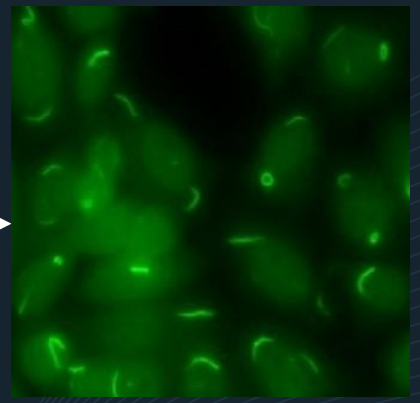
ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΑ ΠΡΟΤΥΠΑ



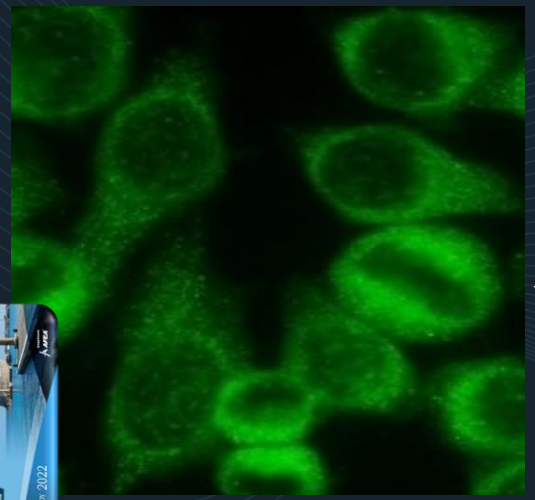
Anti-AMA

Anti-Golgi

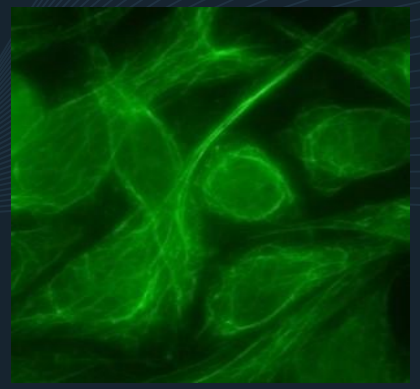




Anti-RR



Anti-Jo1



Anti-cytokeratin

Αλγόριθμος μικροσκόπησης ANA σε πλακίδια ανοσοφθορισμού

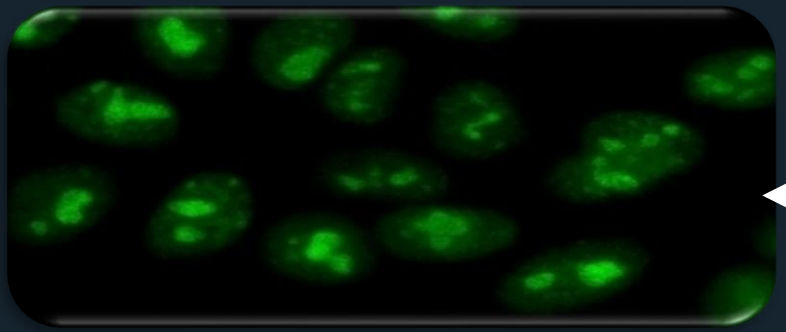
Ερώτηση 1η: Θετικό ή αρνητικό (υπάρχει φθορισμός;)

Ερώτηση 2η: Ο φθορισμός εντοπίζεται στον πυρήνα, στο κυτταρόπλασμα ή περιφερικά του πυρήνα;

Ερώτηση 3η: Εάν είναι πυρηνικός, τι είδους φθορισμό έχει ο πυρήνας;

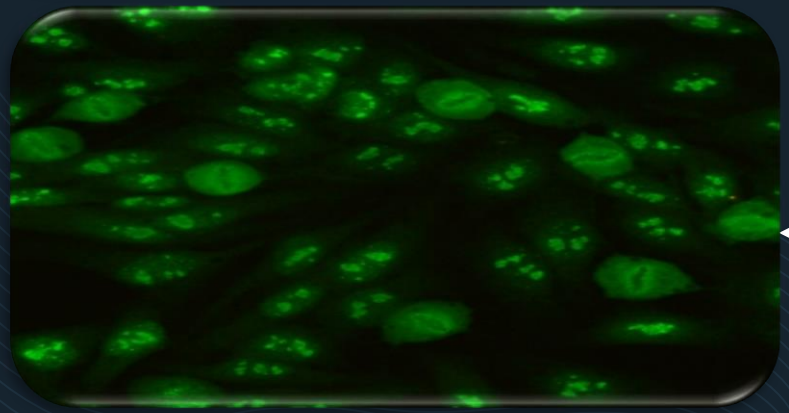
Ερώτηση 3α: Εάν έχει ένα πυρηνικό πρότυπο, τι επιμέρους χαρακτηριστικά φέρει αυτό;

Ερώτηση 3α: Εάν έχει ένα πυρηνικό πρότυπο τι επιμέρους χαρακτηριστικά έχει- το παράδειγμα των αντιπυρηνισκικών;



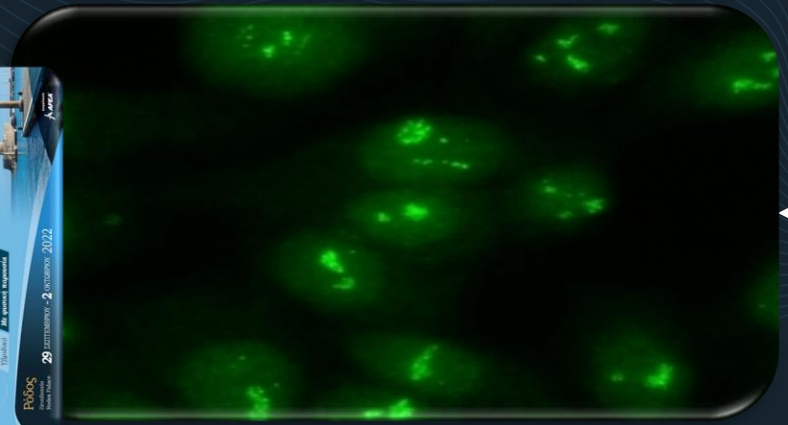
Ομοιογενής πυρηνισκικός

PM/Scl-75, PM/Scl-100, Th/To, B23/nucleophosmin, nucleolin, No55/SC65



clumpy πυρηνισκικός

U3-snoRNP/fibrillarin



punctate πυρηνισκικός

RNA polymerase I, hUBF/NOR-90

Αλγόριθμος μικροσκόπησης ANA σε πλακίδια ανοσοφθορισμού

Ερώτηση 1η: Θετικό ή αρνητικό (υπάρχει φθορισμός;)

Ερώτηση 2η: Ο φθορισμός εντοπίζεται στον πυρήνα, στο κυτταρόπλασμα ή περιφερικά του πυρήνα;

Ερώτηση 3η: Εάν είναι πυρηνικός, τι είδους φθορισμό έχει ο πυρήνας;

Ερώτηση 4η: Ποιος είναι ο τίτλος- αραίωση?

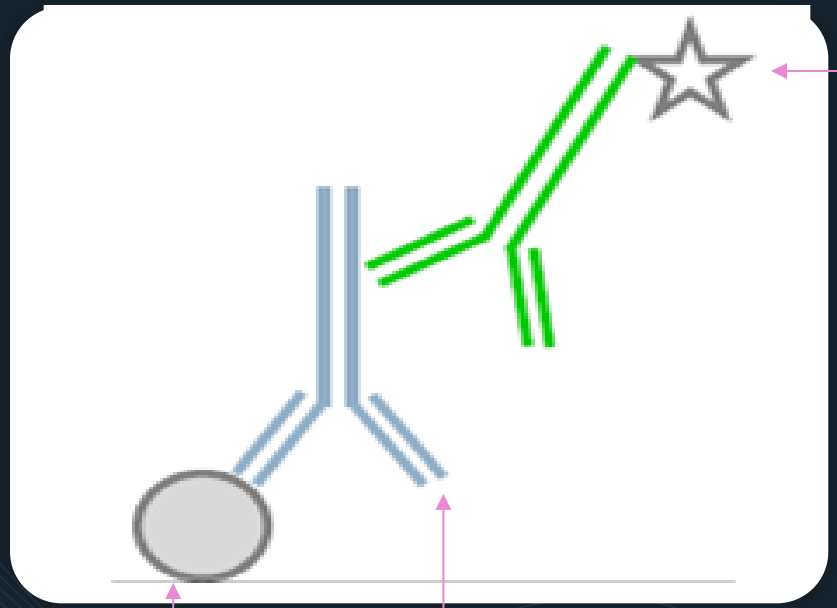
1/40
↓
1/80
↓
1/160
↓
1/320
↓
1/640
↓
1/1280
↓
1/2560

ELISA

- Μέθοδος επιβεβαίωσης της αρχικής υποψίας ύπαρξης αυοταντισώματος, αλλά και της ταυτοποίησης και ποσοτικοποίησης του τίτλου για το αυτοαντίσωμα αυτό.

- Αυτό είναι ιδιαίτερα χρήσιμο αλλά και απαραίτητο όταν ο τίτλος του αυτοαντισώματος έχει κλινική σημασία βαρύτητας νόσου ή αν χρησιμοποιείται ως δείκτης ανταπόκρισης στην θεραπεία.

Indirect ELISA



ΕΝΖΥΜΟ

+

ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ

ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΕΣ ΣΥΖΕΥΜΕΝΟ ΑΝΤΙΣΩΜΑ

ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑ ΟΡΟΥ

ΑΝΤΙΓΟΝΟ-ΣΤΟΧΟΣ

Ένζυμο	Χρωμογόνο υπόστρωμα	Χρώμα
Alkaline phosphatase (AP)	p-nitrophenylphosphate (pNPP)	
Horseradish peroxidase (HRP)	o-phenylenediamine (OPD)	
	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)	
	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS)	

Cut-off ELISA

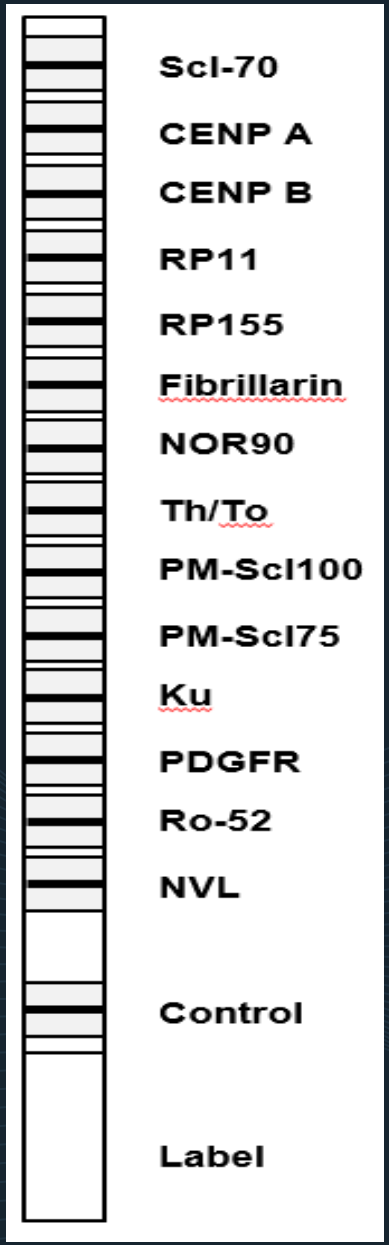
- Τα αποτελέσματα αρχικά εκφράζονται σε απορροφήσεις σε συγκεκριμένο μήκος κύματος
- Το cut off της μεθόδου ορίζεται από τον κατασκευαστή
- Standard control η απορρόφηση του οποίου αποτελεί το cut of της θετικότητας
- Τα αποτελέσματα δίνονται σε RU/ml
- Κάθε εμπορικά διαθέσιμη ELISA μπορεί να έχει διαφορετικά cut off για το ίδιο αυτοαντιγόνο

Line Blot

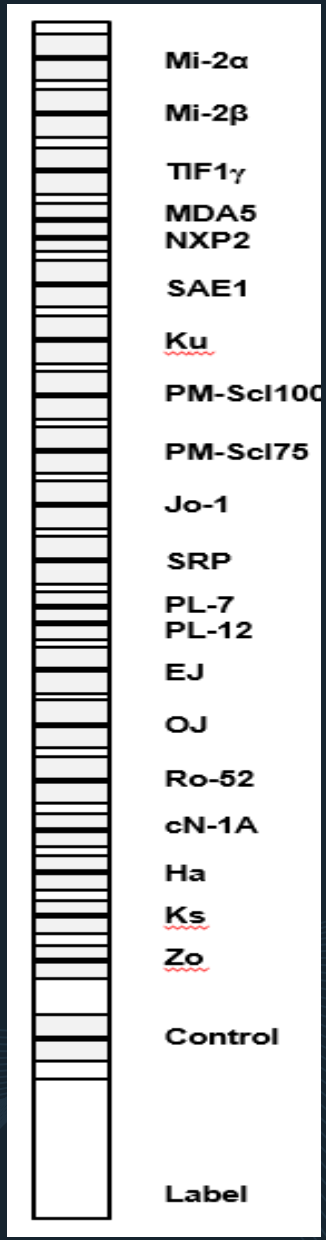
- Όταν υπάρχει μεγάλη κλινική υποψία για κάποιο νόσημα, και συμβατή εικόνα IIF
- Αντί για ELISA
- Δυνατότητα ημιποσοτικής ανίχνευσης πολλών αυτοαντιγόνων σε μικρό χρονικό διάστημα
- Δεν απαιτούν ιδιαίτερο εργαστηριακό εξοπλισμό,
- Υπάρχει και τρόπος ποσοτικοποίησης των αποτελεσμάτων.

Αρχή μεθόδου Line Blot

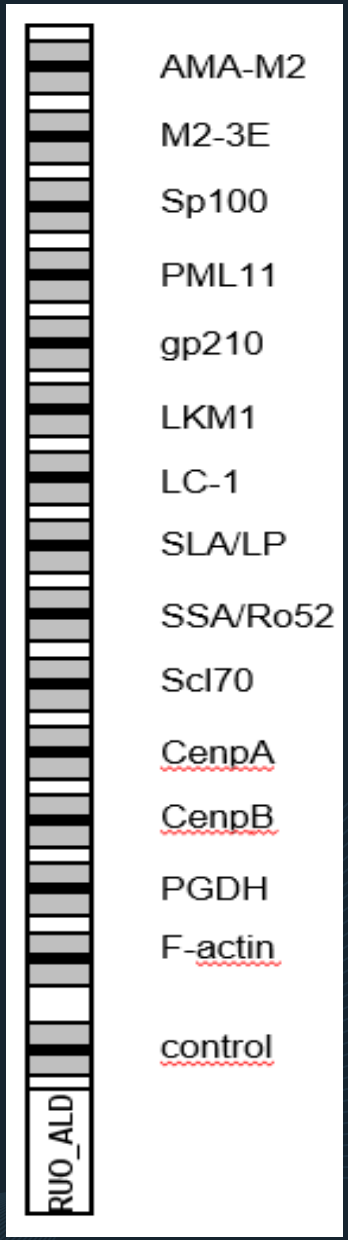
- Παρόμοια με ELISA
- Εδώ το υπόστρωμα είναι ταινία με μικρά τεμάχια από νιτροκυτταρίνη πάνω σε κάθε ένα από τα οποία έχουμε κολλήσει συγκεκριμένο αντιγόνο.



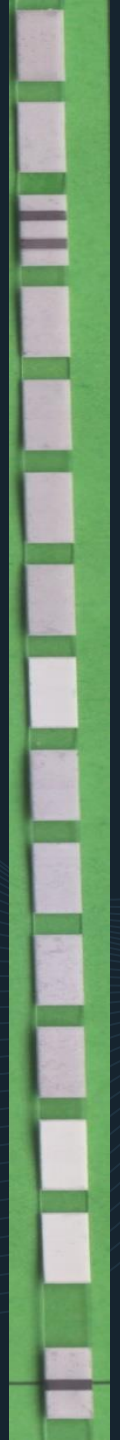
el αυτοαντισωμάτων για Μυοσίτιδα



Panel αυτοαντισωμάτων για Συστηματική Σκλήρυνση



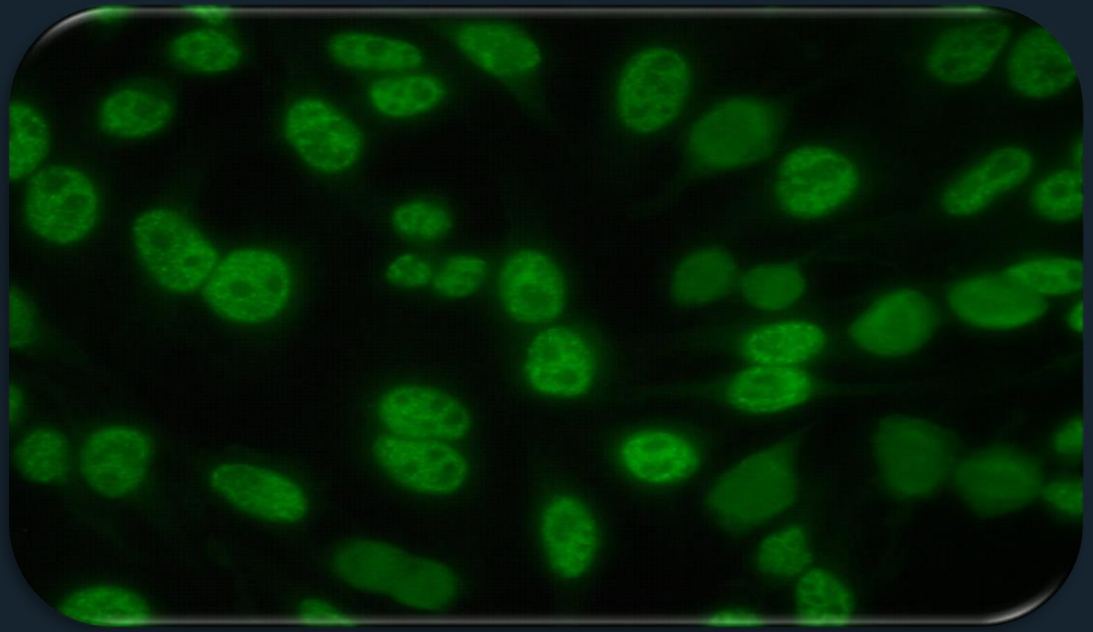
Panel αυτοαντισωμάτων για αυτοάνοσο νόσημα ήπατος



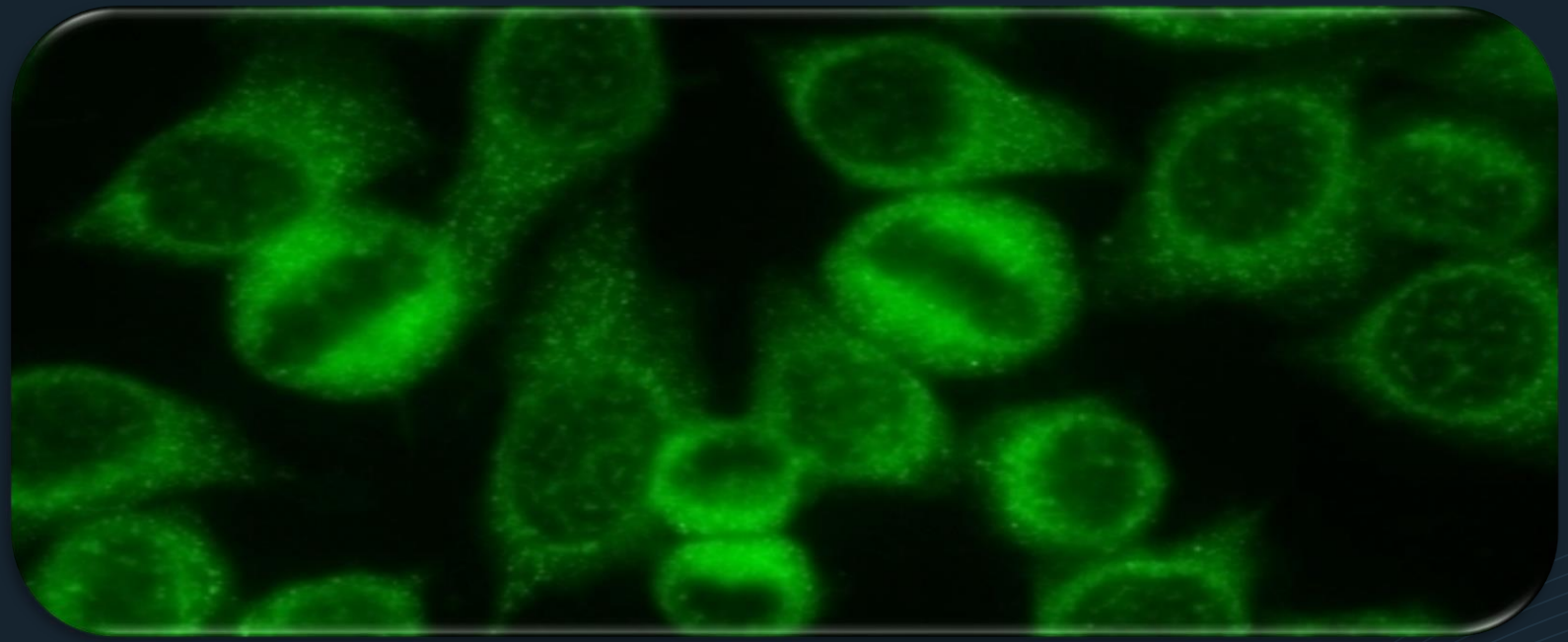
SS-A

Ro-52

control

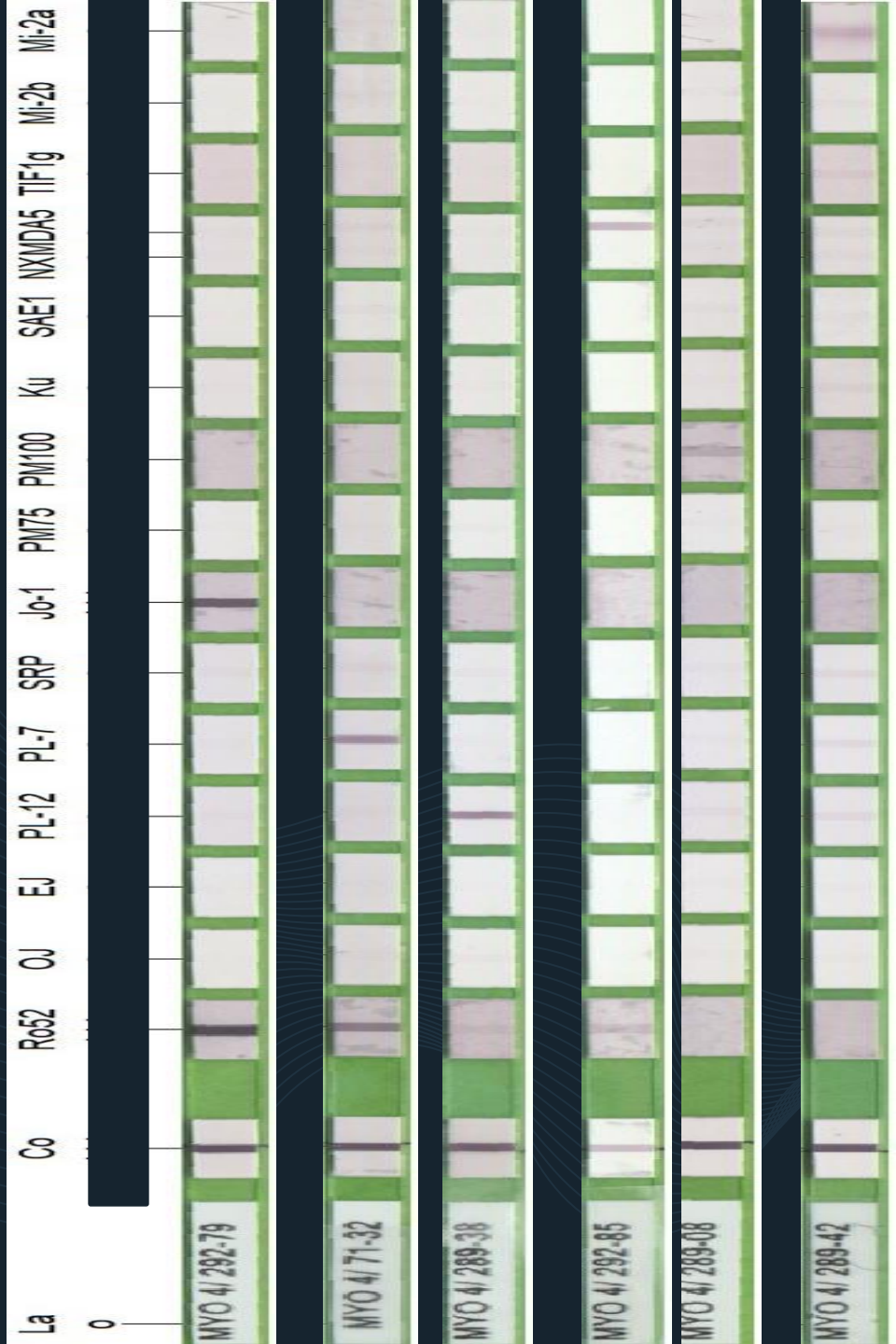


Representative case 1: Ασθενής με ξηροστομία και ξηροφθαλμία, με θετική βιοψία χείλους έδωσε nuclear fine speckled pattern in IIF και αντιδραστικότητα έναντι SS-A and Ro-52 antigen in line assay



Representative case 2: Ασθενής με κεντρομυελική αδυναμία, αυξημένη CPK και θετική βιοψία μυός έδωσε κοκκιώδη κυτταροπλασματικό φθορισμό σε in IIF και αντιδραστικότητα έναντι Jo-1 ΚΑΙ Ro-52 antigen in line assay

slidesmania.com



Παραδείγματα αποτελεσμάτων line blot σε ασθενείς με Μυοσίτιδα

slidesmania.com

Ο ανοσολογικός έλεγχος πάντοτε στέλνεται για επιβεβαίωση και υποστήριξη της κλινικής υποψίας

Η αποστολή ανοσολογικού ελέγχου δεν αποτελεί ποτέ μέθοδο προληπτικών εξετάσεων

Ποτέ δεν στέλνουμε ανοσολογικό έλεγχο αν δεν μπορούμε να αξιολογήσουμε το αποτέλεσμα που λαμβάνουμε

slidesmania.com

Breg Cells Are Numerically Decreased and Functionally Impaired in Patients With **Systemic Sclerosis**.
Mavropoulos A, Simopoulou T, Varna A, Liaskos C, Katsiari CG, Bogdanos DP, Sakkas LI.
Arthritis Rheumatol. 2016 Feb;68(2):494-504. doi: 10.1002/art.39437.

Disease-related autoantibody profile in patients with **systemic sclerosis**.
Liaskos C, Marou E, Simopoulou T, Barmakoudi M, Efthymiou G, Scheper T, Meyer W, Bogdanos DP, Sakkas LI.
Autoimmunity. 2017 Nov;50(7):414-421. doi: 10.1080/08916934.2017.1357699. Epub 2017 Jul 27.

IL-10-producing regulatory B cells (B10 cells), IL-17+ T cells and autoantibodies in **systemic sclerosis**.
Mavropoulos A, Liaskos C, Simopoulou T, Bogdanos DP, Sakkas LI.
Clin Immunol. 2017 Nov;184:26-32. doi: 10.1016/j.clim.2017.04.013. Epub 2017 May 11.

Multiparametric autoantibody profiling of patients with **systemic sclerosis** in Greece.
Liaskos C, Marou E, Simopoulou T, Gkoutzourelas A, Barmakoudi M, Efthymiou G, Scheper T, Meyer W, Katsiari CG, Bogdanos DP, Sakkas LI.
Mediterr J Rheumatol. 2018 Sep 27;29(3):120-126. doi: 10.31138/mjr.29.3.120. eCollection 2018 Sep.

Autoantibodies against specific nuclear antigens are present in psoriatic disease and are diminished by secukinumab.
Patrikiou E, Liaskos C, Mavropoulos A, Ntavari N, Gkoutzourelas A, Simopoulou T, Fechner K, Scheper T, Meyer W, Katsiari CG, Roussaki-Schulze A, Zafiriou E, Sakkas LI, Bogdanos DP.
Clin Chim Acta. 2020 Nov;510:400-407. doi: 10.1016/j.cca.2020.07.037. Epub 2020 Jul 23.
PMID: 32710943

slidesmania.com

ΣΑΣ ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ!

slidesmania.com