

COURSE NOTES

Laboratory investigation of the organ non-specific autoimmune diseases

Investigarea de laborator a bolilor autoimune organ-nespecifice

Anca Cristea

*Immunology Laboratory, 1st Medical Clinic
"Tuliu Hagișanu" University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca*

Abstract

Autoantibodies have been used extensively as a useful biomarker in many autoimmune diseases. The detection of circulating autoantibodies to nuclear antigens in systemic connective tissue diseases or to some of neutrophil cytoplasmic antigens in vasculitis is an important tool in the diagnosis. Many techniques have been developed to detect these autoantibodies, but the indirect immunofluorescence is considered to be the standard clinical test to screen sera before other techniques, like ELISA, to define antibody specificity. In the last years multiplexed technologies were developed that have a high specificity and the capacity of measuring a high number of autoantibodies from a single sample. Measurement of autoantibodies is not a replacement for clinical diagnosis. This review focuses on techniques used to assess the autoantibodies and to evaluation of their clinical significance in some disease subsets.

Keywords: antinuclear autoantibodies, ANCA, indirect immunofluorescence

Rezumat

Prezența autoanticorpilor în serul unui pacient a reprezentat întotdeauna un marker de boală autoimună. Evidențierea autoanticorpilor direcționați față de structuri nucleare sau față de antigenele citoplasmice ale neutrofilelor polimorfonucleare au constituit elemente de diagnostic, alături de datele clinice. Metodele de identificare au evoluat de-a lungul timpului, însă imunofluorescența indirectă rămâne testul standard pentru screeningul acestora. În ultimii ani se încearcă introducerea pe scară largă a unor tehnici avansate de biologie moleculară care pot identifica rapid, cu mare sensibilitate și simultan mai mulți autoanticorpi din aceeași probă. În cele expuse mai jos încercăm să arătăm cum pot fi evidențiați anumiți autoanticorpi, că prezența acestora nu poate înlocui diagnosticul clinic, dar că ei sunt esențiali în diagnosticul bolilor autoimune de țesut conjunctiv și a vasculitelor sistemice.

Cuvinte-cheie: anticorpi antinucleari, ANCA, imunofluorescență indirectă

Introduction

Autoimmune diseases are a heterogeneous group of disorders characterized by immune reactions against one or more "self" components of an individual, that cause inflammation and destruction of tissues and organs.

In the last ten years, the presence of autoantibodies in patients' serum has represented one of the most important criteria in the diagnosis and classification of system and organ-nonspecific autoimmune diseases. The presence of certain specific autoantibodies can be associated with a certain diagnosis, syndrome or clinical particularity of a disease. Nevertheless, we must underline that in most autoimmune disorders several autoantibodies can coexist within the same disease, rather than one specific autoantibody being associated with a single disease.

These facts reveal the fundamental role of the clinical laboratory in the diagnosis, monitoring and even prognosis of autoimmune diseases.

For approximately 40 years, conventional methods for measuring serum autoantibodies have been the diagnosis keystone in these diseases. Among these classical methods we point out immunodiffusion, hemagglutination, counter-immunoelectrophoresis, indirect immunofluorescence, radio-immunoassay, ELISA and Western blot techniques and chemiluminescence. All these methods rely on an antigen-antibody reaction that seeks to identify autoantibodies and, as such, the presence of the respective antigen as a reagent is required. In the latter years ELISA techniques have known a marked development due to high-resolution protein purification and DNA recombination technologies.

Indirect immunofluorescence was and can still be considered the standard test in assessing anti-nuclear antibodies, ANCAs, anti-smooth muscle and anti-mitochondrial antibodies. Since this technique is not an automated but

Introducere

Bolile autoimune reprezintă un grup heterogen de afecțiuni, caracterizate prin reacții imune față de unul sau mai multe componente self ale unui individ, cauzând inflamație și distrucții ale țesuturilor și organelor.

În ultimii zece ani prezența autoanticorpilor în serul pacienților a reprezentat unul din criteriile extrem de importante în diagnosticul și clasificarea bolilor autoimune sistemice sau organ-specifice. Prezența anumitor autoanticorpi specifici pot fi asociați cu un anumit diagnostic, cu un anumit sindrom sau cu o anumită particularitate clinică a bolii. Cu toate acestea, trebuie să subliniem că în majoritatea bolilor autoimune nu se asociază un singur autoanticorp specific unei anume boli autoimune, ci de multe ori coexistă mai mulți autoanticorpi în aceeași afecțiune.

Din cele expuse rezultă că laboratorul clinic are un rol fundamental în diagnosticul, monitorizarea și chiar în prognosticul bolilor autoimune.

Metodele convenționale pentru decelarea autoanticorpilor serici au constituit punctul esențial în diagnosticul acestor afecțiuni de aproximativ 40 de ani. Printre aceste metode clasice enumerăm: imunodifuzia, hemaglutinarea, contraimunelectroforeza, imunofluorescența indirectă, radioimunodozarea, tehnicile ELISA, Western-blot și chemiluminiscența. Toate aceste tehnici au la bază o reacție antigen-anticorp în care se caută identificarea autoanticorpului, ca urmare este necesară prezența antigenului în cauză în postură de reactiv. În ultimii ani datorită tehnicilor înalte de purificare a proteinelor, precum și de obținere a multor antigene prin tehnologii de recombinare ADN, tehnicile ELISA au luat o amploare foarte mare.

Imunofluorescența indirectă a fost și încă poate fi considerată testul standard pentru decelarea anticorpilor antinucleari, ANCA, anti-muschi netezi sau antimitocondriali. Această tehnică nefiind automatizată ci una manuală, citirea este

rather a manual one, its interpretation is subjective and requires a certain experience obtained after years of practice. There are no objective parameters to precisely guide its interpretation. For these reasons, the same test can be interpreted varyingly among different laboratories. There have been attempts to automate the process using a fluorescence microscope monitored by a computer by means of a special analysis software that excludes the background of the preparation and allows a standardization of the reading, but results are still to be expected.

The other techniques mentioned, and especially ELISA, are also not very well standardized and there are significant differences in the interpretation of the results between various manufacturers.

In the last two years, autoimmunity laboratories have become very dynamic due to the advent of new molecular biology techniques that allow simultaneous identification of several antibodies within a minimal quantity of serum, plasma or cell culture supernatant over a very short period of time (approximately 3 hours) and with a high sensibility (1-4). Due to the aforementioned advantages, these techniques could be used as a screening method for autoimmune diseases in risk population groups (5, 6). These techniques use glass, nitrocellulose and polystyrene or magnetic beads as a solid medium upon which the antigen of interest is fixed.

One of these techniques is the **Luminex technology**, which is based upon flow cytometry. It uses polystyrene microspheres as a vehicle for immune reactions, that allow final measurements following the principle of flow cytometry. Specific purified autoantigens are attached to the spheres, which are specifically stained with fluorochromes ranging from red to orange, and thus each microsphere has a unique identity. After incubation with the patient's serum, a second incubation with a human Ig-G antibody marked with a different fluorochrome follows. A laser beam identifies the microsphere with the antigen in question, and a second laser beam reveals the fluorescent molecule that has

subiectivă și presupune o anumită experiență care se dobândește în ani de exercițiu. Nu există parametri obiectivi care să ghideze cu mare exactitate interpretarea preparatului. Din acest motiv există discordanțe în evaluarea aceluiași test între diferite laboratoare. S-a încercat o automatizare a citirii la un microscop cu fluorescență monitorizat de un computer cu un program de analiză a preparatului, în care să se excludă background-ul și să permită o standardizare a citirii, dar rezultatele sunt încă departe.

Nici celelalte tehnici amintite anterior și ne referim la cele ELISA, nu sunt foarte bine standardizate, existând diferențe semnificative în evaluarea rezultatului de la un producător la altul.

În ultimii doi ani laboratoarele de autoimunitate au devenit foarte dinamice din cauza apariției de noi tehnologii în biologia moleculară, care au permis aplicarea lor și în acest domeniu, cu scopul de a identifica simultan mai mulți autoanticorpi dintr-o cantitate minimă de ser, plasmă sau supernatant de culturi celulare, într-un timp foarte scurt, de aproximativ 3 ore și cu mare sensibilitate (1-4). Datorită avantajelor amintite aceste tehnici ar putea fi utilizate cu scop de screening pentru boli autoimune în grupuri de populații cu risc (5, 6). Aceste tehnici utilizează ca și suport solid (matrice) sticla, nitroceluloza, bile de polistiren sau magnetice pe care este imobilizat antigenul în cauză.

Amintim **tehnologia Luminex**, bazată pe citometria în flux. În această tehnică se utilizează microsfere de polistiren drept vehicule pentru reacțiile imune și care permit în final măsuratori bazate pe citometria în flux. Bilele colorate specific cu un fluorocrom de la roșu la oranș au atașat autoantigenul specific purificat, deci fiecare microsferă reprezintă o identitate unică. După incubarea cu serul pacientului urmează o incubare cu un anticorp anti IgG-uman marcat cu un alt fluorocrom. Un laser va identifica microsfera cu antigenul în cauză și al doilea laser identifică molecula fluorescentă care a reacționat cu autoanticorpul fixat de antigen. Deocamdată tehnica este utilizată pentru identificarea

reacted with the autoantibody fixed to the antigen. As of now, this technique is used to assess the specificity of anti-nuclear antibodies, AN-CAs (MPO and PR3) and anti-GBM antibodies (7, 8).

Another up-to-date technique is “**microarray technology**”, based upon chemiluminescence or fluorescence, in which specific autoantigens are attached successively to a nitrocellulose or polystyrene membrane or to a microscopic slide. The reaction is read using a nanoscale bar code attached to a reader that is specific to the reaction used. This technology also applies to autoantibodies in connective tissue disorders, vasculitis and even autoimmune thyroiditis (2, 3, 9).

Mass spectrometry is another state-of-the-art technique used with the same purpose, which measures the mass-to-charge ratio within a certain protein. How is this measurement performed? The protein(s) to be analyzed are specifically retained from the biological fluid sample (by using complementary monoclonal antibodies) on a solid surface upon which several specific capture zones may coexist. The proteins to be researched are ionized by means of irradiation with the energy provided by a laser beam. The ions fly through a vacuum tube to its opposite end under the influence of an electric

specificity of the antibodies antinuclear, ANCA (MPO și PR3), anti MBG (7, 8).

O altă tehnică actuală este “**tehnologia microarray**”, bazată pe chemiluminiscență sau fluorescență, unde autoantigenele specifice sunt atașate succesiv (la rând) de o suprafață de pe o membrană de nitroceluloză sau polistiren, sau pe o lamă de microscop. Citirea reacției se face cu un cod de bare la scară nano, atașat la un cititor specific reacției folosite. Această tehnologie este de asemenea aplicabilă pentru autoanticorpii din bolile de țesut conjunctiv, vasculite și chiar tiroi-dite autoimune (2, 3, 9).

Spectrometria de masă reprezintă o altă tehnică de vârf utilizată în același scop. Această tehnică măsoară raportul masă/sarcină a ionilor dintr-o proteină. Cum se ajunge la această măsurătoare? Proteina/-ele de analizat sunt reținute din lichidul biologic (proba de analizat) în mod specific (prin anticorpi monoclonali complementari) pe o suprafață solidă, pe care pot co-exista mai multe zone de captare specifice. Proteinele de cercetat sunt ionizate prin iradiere cu energia furnizată de un fascicul laser. Ionii zboară sub influența unui câmp electric într-un tub vidat spre celălalt capăt al tubului. Ionii cu diferite mase se mișcă cu viteze diferite și ajung la detectorul de ioni în timpi diferiți. Detectorul măsoară timpul de zbor, care înregistrează un

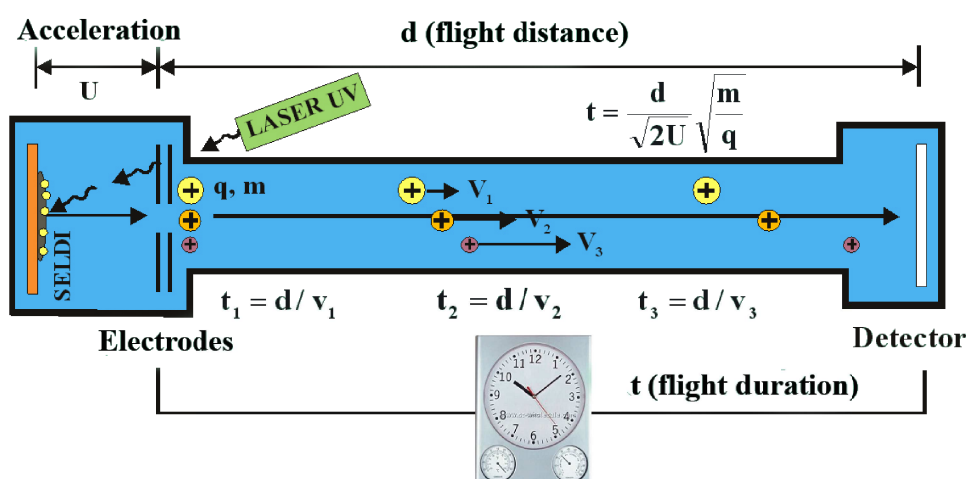


Figure 1. The principle of SELDI-TOF MS. (Principiul spectrometriei de masă SELDI-TOF)

field. Ions with different masses fly with different speeds and reach a ion detector in different amounts of time. The detector measures the flight time, which yields a graph illustrating the mass-to-charge ratio of the ions. This technique is also known as SELDI-TOF MS, i. e. Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight Mass Spectrometry, a denomination that accurately describes its principle (*Figure 1*).

For the time being, these technologies represent only a promise that has yet to prove its efficiency in clinical practice in a more or less close future.

We will present several techniques currently used in clinical immunology laboratories.

Antinuclear antibodies

Antinuclear antibodies (ANA) are autoantibodies directed against certain structures of the nucleus: nucleic acids, nuclear proteins, histones. ANA is a test that is mandatory to be carried out in persons who are suspected of having an autoimmune disease, especially collagenoses, in particular in systemic lupus erythematosus (SLE). The standard method in detecting ANA is **indirect immunofluorescence**. This technique consists of the following steps. The substrate, which can be a cell culture (usually HEp-2), a rodent liver imprint or rat or mouse kidney cryosections, is incubated with the analyzed serum. After successive rinsing, the substrate is incubated with a human Ig-G antibody marked with fluorescein iso-thiocyanate and rinsed again. The preparation is mounted and examined with the help of a fluorescence microscope. The result includes the morphologic pattern of the fluorescence and also the titer. Dilutions that are equal to or greater than 1/80 are considered positive. Several patterns can be encountered: homogenous and/or perinuclear, spotted with several appearances, nucleolar and centromeric. These patterns can be correlated with a certain specificity of an antibody and therefore allow the association with a certain disease. The homogenous pattern is associated

graphic ce reprezintă raportul masă/sarcină al ionilor. Tehnica este cunoscută sub denumirea de SELDI-TOF MS, adică *surface-enhanced laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry*, denumire ce descrie exact principiul tehnicii (*Figura 1*).

Deocamdată, aceste tehnologii reprezintă doar o promisiune, care urmează să-și arate eficiența în practica clinică într-un viitor mai mult sau mai puțin apropiat.

Să revenim la tehnicile utilizate curent în laboratoarele clinice de imunologie în momentul de față.

Anticorpi anti nucleari

Anticorpii antinucleari (ANA) sunt autoanticorpi direcționați față de diverse structuri ale nucleului: acizii nucleici, proteine nucleare, histone. ANA este un test care trebuie executat obligatoriu la o persoană suspectă de o boală autoimună, în special colagenoză, în mod particular lupus eritematos sistemic (LES). Metoda standard pentru decelarea ANA este **imunofluorescența indirectă**. Tehnica constă în următoarele. Substratul, care poate fi cultură de celule, de regulă HEp-2, amprentă de ficat de rozătoare sau criosecțiuni de rinichi de șoarece sau șobo-

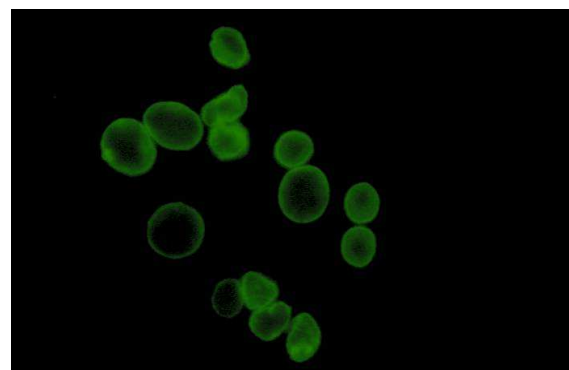


Figure 2. Positive ANA, homogenous and perinuclear pattern – homogenous and peripheral fluorescence of the nuclei

(ANA - aspect omogen și perinuclear-fluorescența omogenă și periferică a nucleilor)

Table 1. Indirect immunofluorescence – liver imprint and HEp-2 substrate

ANA pattern	Specificity	Associated disease	Subsequent tests
NUCLEAR MEMBRANE Homogenous-ring dotted homogenous +nucleoli	A,B,C Lamina Nuclear pores Ribosomal proteins	HAI I, SLE CBP neuropsychic SLE	ELISA-Ribosomal P
HOMOGENOUS/ PERINUCLEAR	ssDNA dsDNA RNA Histones NUCLEOSOMES	SLE SLE Other collagenoses Drug induced SLE- SLE	anti dsADN ELISA-Scl-70 ELISA-histones ELISA/blot dot
SPOTTED coarse+fine fine-irregular fine-dense	RNP/Sm SS-A(Ro) SS-B(La)	MCTD/SLE SSjogren's/SLE Subacute Lupus Sjogren's	ELISA-RNP/Sm ELISA-SS-A ELISA-SS-B
PUNCTIFORM centromere 2-6 nuclear spots > 6 nuclear spots	CENTROMERE COILIN p80	CREST Sj, CBP SLE, Sj, CBP	ELISA-centromere
NUCLEOLAR Different size granulations homogenous-diffuse	Scl-70 PMscl, Mi2 SS-B	Sclerodermia PM/Scl Sjogren's	ELISA-Scl-70 ELISA-PM/Mi2 ELISA-SS-B
CYTOPLASMIC	Jo-1	PM/Dermato	ELISA-Jo-1

with ssDNA and dsDNA and with histones; the perinuclear pattern is associated with native dsDNA (*Figure 2*), the spotted one with ribonucleoproteins, the nucleolar one with DNA-topoisomerase etc. – see *Table 1*.

Certain patients may present several patterns that differ from one dilution to another, a fact that must be mentioned in the report. The results guide the examiner towards a much more specific and precise method of identification such as ELISA, especially in the case of anti-ENA (Extractable Nuclear Antigens) antibodies. The advantage of immunofluorescence is that it allows a targeted choice of specificity for subsequent assessment. On many occasions, the results obtained after immunofluorescence, corroborated with the values of C3 and especially C4 complement and clinical data, may contribute to

lan, se incubează cu serul de cercetat. După spălări succesive substratul este incubat cu un anticorp anti IgG uman marcat cu izotiocianat de fluoresceină, urmată apoi de o nouă spălare. Preparatul se montează și este examinat la un microscop cu fluorescență. Rezultatul include aspectul morfologic al fluorescenței (pattern-ul), precum și titrul. Sunt considerate titruri pozitive diluții egale sau mai mari de 1/80. Se pot distinge mai multe aspecte: omogen și/sau perinuclear, pătat cu diverse aspecte, nucleolar și centromer, aspecte care se corelează cu o anumită specificitate a anticorpilor și ca urmare permite asocierea cu o anumită boală. Aspectul omogen se asociază cu ADNss și ds, histone; perinuclear cu ADNds (nativ) (*Figura 2*); aspectul pătat cu prezența ribonucleoproteinelor; nucleolar cu ADN–topoizomeraza etc , vezi *Tabelul 1*.

Tabelul 1. Imunofluorescența indirectă - substrat amprentă ficat și HEp-2

ANA pattern	Specificitate	Boala asociată	Teste ulterioare
MEMBRANANA NUCLEARĂ <i>omogenă-inelară punctată omogenă+nucleoli</i>	<i>Lamina A,B,C Pori nucleari Proteine riboso- male</i>	<i>HAI I, SLE CBP SLE neuropsihic</i>	<i>ELISA-Ribosomal P</i>
OMOGEN/ PERINUCLEAR	<i>DNAss DNAds RNA Histone NUCLEOSOMI</i>	<i>SLE SLE alte colagenoze SLE-medicamentos SLE</i>	<i>anti ADNds ELISA-Scl-70 ELISA-histone ELISA/blot dot</i>
PĂTAT <i>grosolan+fin fin-neregulat</i>	<i>RNP/Sm SS-A(Ro)</i>	<i>MCTD/SLE Sjogren/SLE Lupus subacut SSjogren</i>	<i>ELISA-RNP/Sm ELISA-SS-A</i>
<i>fin-dens</i>	<i>SS-B(La)</i>		<i>ELISA-SS-B</i>
PUNCTIFORM <i>centromer 2-6 pete nucleare > 6 pete nucleare</i>	<i>CENTROMER COILIN p80</i>	<i>CREST SSj, CBP SLE, SSj, CBP</i>	<i>ELISA-centromer</i>
NUCLEOLAR <i>granulații mărimi diferite omogen-difuz</i>	<i>Scl-70 PMScI, Mi2 SS-B</i>	<i>Sclerodermie PM/Scl SSjogren</i>	<i>ELISA-Scl-70 ELISA-PM/Mi2 ELISA-SS-B</i>
CITOPLASMATIC	<i>Jo-1</i>	<i>PM/Dermato</i>	<i>ELISA-Jo-1</i>

certain diagnosis. Next, we will present the incidence and the utility of this test (10).

It must be underlined that human HEp-2 cell culture is superior to the rodent substrate because it allows the recognition of antigens pertaining to all phases of mitosis and especially of those that depend upon the cell cycle, due to the fact that the nucleus dramatically changes during the phases of the cell cycle. Slides with HEp-2 contain both dividing and resting nuclei in order to encompass the most nuclear antigens. They are sold by various companies and their quality varies among manufacturers.

ANA incidence: SLE 95%, rheumatoid arthritis 25-30%, juvenile rheumatoid arthritis 20%, Sjogren's syndrome 50-70%, scleroderma 60-90%, MCTD 95%, polymyositis-dermatomyositis 10-50%, nodous periarteritis 10%, myas-

Anumiți pacienți pot avea diverse pattern-uri care diferă de la o diluție la alta, și care trebuie menționate în buletinul de analiză. Rezultatele orientează examinatorul spre o metodă de identificare mult mai specifică și mai precisă, mai ales pentru anticorpii anti antigene nucleare extractibile (ENA), cum ar fi o tehnică ELISA. Avantajul imunofluorescenței constă în faptul că alegerea specificității pentru o dozare ulterioară este ținută. De multe ori rezultatele obținute la imunofluorescență și coroborate cu valorile fracțiunilor de complement C3 și mai ales C4, precum și datele clinice pot contribui la un diagnostic cert. Menționăm în cele ce urmează incidența și utilitatea testului (10).

Trebuie să specificăm că utilizarea culturii celulare HEp-2, de origine umană, este superioară substratului de rozătoare întrucât permi-

thenia gravis with thymoma 30-50%, drug-induced SLE 100% (hydralazine, procainamide, anticonvulsants), type I autoimmune hepatitis 80%, primary antiphospholipidic antibody syndrome 20%.

ANA as diagnostic criteria: SLE 100%, MCTD 100%, autoimmune hepatitis 90%.

ANA useful in monitoring or prognosis: SLE, juvenile rheumatoid arthritis, Raynaud's phenomenon.

ANA not useful in diagnosis: multiple sclerosis, idiopathic thrombocytopenia, thyroid disease, discoid lupus erythematosus, infections, malignant diseases, close relatives of patients with autoimmune diseases.

ANA without clinical significance: 3-10% of normal individuals may have titers between 1/80 and 1/160, very rarely 1/320 and the titer rises with age, 20% of the relatives of the patients with autoimmune diseases, 50% of senior citizens.

- **Anti-native dsDNA antibodies**

Anti-dsDNA antibodies appear almost exclusively in SLE and have nephritogenic potential. Their presence allows for a certain diagnosis of SLE. However, only 30-40% of SLE patients have anti-dsDNA antibodies. These antibodies are highlighted either by indirect immunofluorescence using as a substrate the hemoflagellate *Crithidia luciliae*, which has a kinetoplast that consists entirely of circular dsDNA (Figure 3a,b), or through ELISA techniques. ELISA and RIA can yield false positive values due to DNA denaturation during purification, and thus the incidence of these antibodies might be overevaluated (11).

Pathologic values: indirect immunofluorescence - titers >1/10; ELISA: > 60U in active SLE, especially in florid and glomerulonephritis forms – their presence can predict the florid form; very rarely in severe rheumatoid arthritis.

- **Antinucleosome antibodies**

They are antichromatin antibodies and appear to be responsible for LE. These antibodies

te recunoașterea antigenelor din toate fazele mitozei și mai ales a antigenelor dependente de ciclul celular întrucât aspectul nucleului se schimbă dramatic în fazele ciclului celular. Lamele cu celule HEP-2 conțin nucleii atât în diviziune cât și în repaus pentru a cuprinde cât mai multe antigene nucleare. Ele sunt comercializate de diverse firme și calitatea lor diferă de la furnizor la furnizor.

Incidența ANA: LES 95%, poliartrită reumatoidă 25-30%, artrită reumatoidă juvenilă 20%, Sindrom Sjogren 50-70%, sclerodermie 60-90%, BMTC 95%, polimiozită-dermatomiozită 10-50%, periarterită nodoasă 10%, miastenia gravis cu timom 30-50%, LES indus medicamentos 100% (hidralazină, procainamidă, anti-convulsive), hepatită autoimună tip I 80%, sindrom antifosfolipidic primar 20%.

ANA în criterii de diagnostic: LES 100%, BMTC 100%, hepatită autoimună 90%.

ANA utili pentru monitorizare sau prognostic: LES, ARJ, fenomen Raynaud.

ANA nu sunt utili în diagnostic: scleroză multiplă, trombocitopenie idiopatică, boli tiroidiene, lupus discoid, infecții, boli maligne, rude apropiate ale pacienților cu boli autoimune.

ANA fără semnificație clinică: 3-10% din indivizii normali pot avea titruri cuprinse între 1/80 și 1/160, foarte rar 1/320 și titrul crește cu vârsta, 20 din rudele pacienților cu boli autoimune, 50% din vârstnici.

- **Anticorpi anti ADNds (nativ)**

Anticorpul anti ADNds sau se formează aproape exclusiv în LES și are potențial nefritogen. Prezența lor permite un diagnostic cert de LES. Cu toate acestea numai 30-40% din pacienții cu LES au anticorpi anti ADNds. Aceștia se execută prin imunofluorescență indirectă utilizând ca substrat hemoflagelatul *Crithidia luciliae* care conține un kinetoplast exclusiv din ADNds circular (Figura 3a,b), sau prin tehnici ELISA. Tehnicile ELISA și RIA pot da valori fals pozitive datorită denaturării ADN-ului în timpul purificării, astfel încât incidența

ies do not react neither with histones nor with DNA and are highlighted through ELISA or immunodot assay. The substrate used is obtained by extracting chromatin from the nucleus of calf thymus cells and contains DNA and core histones, excluding H1 (12). Immunofluorescence pattern is mostly homogenous. These antibodies are present in 40% of SLE patients, are nephritogenic and their presence indicates active lupus and lupic nephritis (13). These patients do not have anti-dsDNA or antihistone antibodies. The titer correlates with the activity of the disease.

- **Antihistone antibodies**

These antibodies have an incidence of 95% in drug-induced SLE (procainamide, hydralazine etc.) Their pattern is exclusively a homogenous one. They can be found also in rheumatoid arthritis with or without complications, Felty syndrome and juvenile rheumatoid arthritis.

- **Anti-ENA (Extractable Nuclear Antigens) antibodies**

These are a group of antibodies directed against nuclear antigens that can be extracted using saline solutions other than DNA, histones and nucleoli. These antihens include SS-A(Ro), SS-B(La), RNP (Ribonucleoproteins), Sm

acestor anticorpi poate fi supraevaluată (11).

Valori patologice: IF indirectă-titruri >1/10; ELISA: > 60U în LES activ, în special forme fluoide și cu glomerulonefrită, prezența lor poate prezice forma fluoridă, foarte rar în PR forma severă.

- **Anticorpi anti nucleosomal**

Sunt anticorpi anti cromatină. Par a fi principalii responsabili de fenomenul LE. Nu dau reacție nici cu histonele și nici cu ADN. Se execută prin tehnici ELISA sau imunodot, substratul fiind obținut prin extracția cromatinei din nucleul celular din timus de vițel și conține complexul ADN plus histonele de "core", minus H1 (12). Aspectul la IF este mai mult de tip omogen. 40 % din pacienții cu LES au acești anticorpi, sunt nefritogeni și prezența lor indică lupus activ și nefrită lupică (13), fără a avea însă anti ADNds sau histone. Titul se corelează cu activitatea bolii.

- **Anticorpi anti histone**

Acești anticorpi au o incidență de 95% în LES indus medicamentos cu procainamidă, hidralazină etc. Patternul este numai omogen. Pot fi întâlniți și în PR cu sau fără complicații, sindrom Felty, artrită reumatoidă juvenilă.

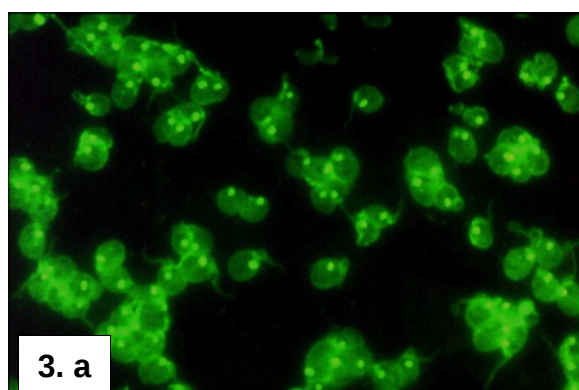


Figure 3 . Anti dsDNA antibodies
a. positive – fluorescent kinetoplast
b. negative – no fixation on nucleus or kinetoplast

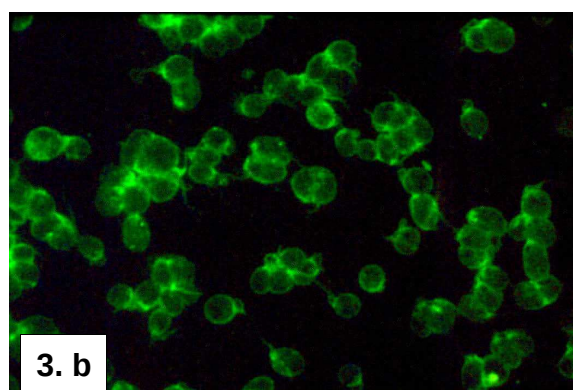


Figura 3. Anticorpi anti ADNds
a. pozitiv - kinetoplastul fluorescent
b. negativ - ser normal – nu fixeaza nici nucleul, nici kinetoplastul

(Smith), Sclero-70 (ADN-topoisomerase), Jo-1 (histidil RNA synthetase). The presence of autoantibodies against these antigens is suggested by a spotted immunofluorescence pattern with certain particular aspects that can be assessed by a specialist. The identification can be done by using ELISA screen techniques, i.e. primary tests that identify the presence of antibodies without discriminating their specificity. In a subsequent step, or by bypassing the ENA test, and depending upon the suspected diagnosis and the pattern obtained, an individual test for one or more specificities is carried out as follows:

- **anti SS-A(Ro):** Primary Sjogren's syndrome > 70%, SLE with renal complications 30-40%, subacute cutaneous lupus 10%, rheumatoid arthritis with Sjogren's syndrome 9%, photosensitivity, neo-natal SLE with atrioventricular block 20%. A fine granular pattern (*Figure 4*) or a granular pattern with 1-2 conspicuous nucleoli may be encountered in indirect immunofluorescence;

- **anti SS-B(La):** Primary Sjogren's syndrome 30-60%, Sjogren's syndrome associated with scleroderma 10%, they do not appear in rheumatoid arthritis with Sjogren's syndrome. A fine granular spotted pattern or 1-2 conspicuous nucleoli with granular or clear nucleoplasm may be significant;

- **anti Sm (Smith):** 25-30% of SLE patients, they are 100% specific for SLE, with a coarse spotted pattern and clear nucleoli in immunofluorescence (*Figure 5*);

- **anti RNP:** they are specific and have raised titers in MCTD, with the same pattern as anti Sm, but C3 and C4 levels are never low;

- **anti Sclero-70:** they appear exclusively in diffuse progressive systemic scleroderma and they correlate with the extent of visceral and cutaneous involvement. Their prognosis is worse than that of anti-centromere antibodies. These antibodies are frequent in pulmonary scleroderma and are seldomly encountered in patients with Raynaud's syndrome. They predict an unfavorable prognosis. A nucleolar immunofluor-

• **Anticorpi anti antigene nucleare extractibile (ENA)**

Sunt o categorie de autoanticorpi direcționați față de antigene nucleare care pot fi extractibile cu soluții saline și sunt altele decât ADN, histone și nucleoli. Acestea includ **SS-A(Ro)**, **SS-B(La)**, **RNP (Ribonucleoproteine)**, **Sm (Smith)**, **Sclero-70 (ADN-topoisomeraza)**, **Jo-1 (histidil ARN sintetaza)**. Prezența autoanticorpilor față de aceste antigene este sugerată la imunofluorescență de un pattern pătat, cu anumite particularități sesizate de un specialist în examinarea preparatului. Identificarea se poate face cu tehnici ELISA screen, adică un test primar prin care se identifică prezența anticorpilor, fără însă a se discrimina specificitatea. În a doua etapă, sau evitându-se testul ENA și în funcție de diagnosticul presupus și patternul obținut, se execută un test individual pentru una sau mai multe specificități, după cum urmează:

- **anti SS-A(Ro):** Sindrom Sjogren primar > 70%, LES cu complicații renale 30-40%, lupus subacut cutanat 10%, PR cu sindrom Sjogren 9%, fotosensibilitate, LES neonatal cu bloc atrio-ventricular 20%. Aspectul pătat fin granular (*Figura 4*) sau granular cu câte 1-2 nucleoli evidenți, poate caracteriza patternul la IF indirectă ;

- **anti SS-B(La):** Sindrom Sjogren primar 30-60%, sindrom Sjogren asociat cu sclerodermie 10%, nu apar în sindrom Sjogren asociat cu PR . Aspectul pătat fin granular, sau cu câte 1-2 nucleoli fluorescenți și nucleoplasma granulară, sau destul de liberă poate caracteriza patternul și pot fi semnificativi, dar

- **anti Sm (Smith):** 25-30% din pacienții cu LES, sunt specifici 100% pentru LES cu aspect pătat grosolan, cu nucleolii liberi la imunofluorescență (*Figura 5*);

- **anti RNP:** sunt specifici și au titruri ridicate în BMTC, cu patternul identic ca și anti Sm, dar întodeauna C3 și C4 nu sunt scăzute;

- **anti Sclero-70:** sunt exclusiv în sclerodermia sistemică progresivă și difuză, se core-

escence pattern suggests the presence of these antibodies;

- **anti Jo-1** are seen in approximately 30% of polymyositis patients, especially in the forms with pulmonary involvement and Raynaud's phenomenon. They disappear in remission, and are therefore useful in monitoring the disease.

We must stress that the most extractable antigens are Jo-1 and SS-A. Therefore, ELISA tests are recommended to be carried out in order to confirm the diagnosis, in particular in polymyositis and subacute cutaneous lupus.

- **Anti-centromere antibodies**

Anti-centromere (or kinetocore) antibodies are markers of the CREST syndrome. They have prognostic value and are encountered in 30% of patients with Raynaud's phenomenon, 12-15% of systemic scleroderma patients and 20% of patients with primary biliary cirrhosis.

- **Anti-ribosomal P protein antibodies**

They are encountered particularly in patients with active SLE and psychosis, but are absent in psychotic patients without SLE.

Anti-C1q antibodies

These antibodies are directed against the

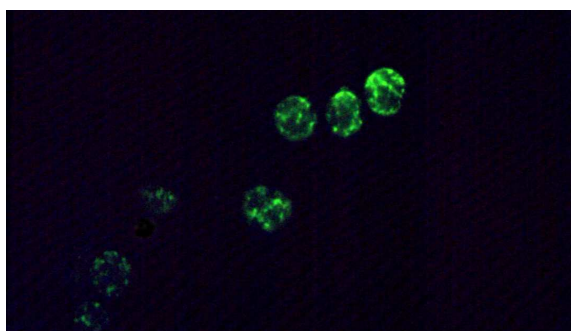


Figure 4. ANA, Anti SS-A(Ro) – finely granular, irregular spotted pattern

ANA aspect pătat fin granular anti SS-A (Ro)

lează cu extinderea afectării viscerale și cutanate. Au prognostic mai puțin favorabil decât anticorpii anti centromer. Frecvent în sclerodermia localizată pulmonar. Se întâlnesc la o minoritate din pacienții cu sindrom Raynaud, prezic un prognostic nefavorabil. Patternul nucleolar de la IF indirectă sugerează exact prezența acestor anticorpi;

- **anti Jo-1** se întâlnesc la aproximativ 30% din pacienții cu polimiozită, în special formele cu afectare pulmonară și fenomen Raynaud. Dispar în remisia bolii, deci utili în monitorizare.

Trebuie să remarcăm faptul că cele mai extractibile antigene sunt Jo-1 și SS-A. Ca urmare, este indicat pentru confirmarea diagnosticului a se executa teste ELISA, mai cu seamă în polimiozită și în lupusul subacut cutanat.

- **Anticorpi anti centromer**

Anticorpii anti centromer sau kinetocor sunt markeri pentru sindromul CREST. Anticorpii au valoare prognostică. Se întâlnesc la 30% din pacienții cu fenomen Raynaud, la 12-25% cu sclerodermie sistemică și 20% în ciroza biliară primitivă.

- **Anticopi anti ribosomalii P**

Se întâlnesc mai cu seamă la pacienții cu LES activ cu psihoză. Nu se întâlnesc la pacienții cu psihoză și fără LES.

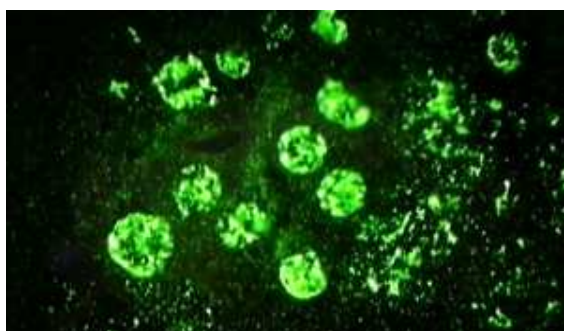


Figure. 5. ANA, Anti Sm/RNP – coarse granular spotted pattern in nucleoplasm

Anti Sm/RNP- aspectul pătat grosolan al nucleoplasmei și nucleolii liberi

C1q component of the classic complement pathway, have a nephritogenic role, are present in a high percent of hypocomplementemic vasculitides, in patients with SLE and their presence correlates with episodes of acute nephritis. They can only be assessed using ELISA (14, 15).

Anti-CCP (Cyclic Citrullinated Proteins)

The antibodies that recognize citrullinated proteins derived from those with arginine residues following the apoptosis of the extracellular matrix proteins in articulations are specific indicators of incipient rheumatoid arthritis. Citrullination occurs under the influence of an enzyme, the peptidyl-arginine deiminase, that determines the apparition of cryptics against which antibodies are formed. Anti-CCP antibodies are useful in preclinical diagnosis of rheumatoid arthritis and have also a prognostic role. They are assessed through ELISA.

Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibodies (ANCA)

ANCA are autoantibodies primarily directed against the enzymes in primary granulations of neutrophil granulocytes. They have a pathogenetic role, are useful in diagnosing and monitoring vasculitides and are important in their classification. They are assessed by indirect immunofluorescence using as a substrate normal polymorphonuclears isolated by density gradient centrifugation and fixated with ethanol. Immunofluorescence pattern can be: **cytoplasmic (c-ANCA)** (Figure 6) wherein a granular cytoplasmic fluorescence can be observed and the antigen is Proteinase 3 (PR3); **perinuclear (p-ANCA)** (Figure 7), in which a homogenous perinuclear fluorescence is seen and the major antigen is Myeloperoxidase (MPO), but also lactoferrin, elastase, cathepsin G; **atypical ANCA** pattern, that appears as a rule when antinuclear antibodies are present. Screening dilution of the analyzed serum is 1:10 (16). These antibodies

Anticorpi anti C1q

Sunt direcționați față de componenta C1q a căii clasice a complementului, au rol nefritogen, sunt prezenți în procent mare în vasculitele hipocomplementemice, la pacienții cu LES și se corelează prezența lor cu episoadele active de nefrită. Se determină numai prin tehnica ELISA (14, 15).

Anticorpi anti proteine ciclic citrulate (anti-CCP)

Autoanticorpii care recunosc proteinele citrulate derivate din cele cu reziduri de arginină în urma procesului de apoptoză a proteinelor extracelulare de matrice de la nivelul articulațiilor sunt indicatori specifici pentru poliartrita reumatoidă incipientă. Citrulina are loc sub influența unei enzime, peptidilarginin deiminază, în urma acțiunii căreia apar criptici față de care se formează autoanticorpi. Anti-CCP sunt utili în diagnosticul preclinic al PR, și au rol prognostic în severitatea bolii. Se execută prin tehnici ELISA.

Anticorpi anti citoplasmă neutrofil (ANCA)

ANCA sunt autoanticorpi direcționați cu preponderență față de enzime din granulațiile primare ale granulocitelor neutrofile. Au rol patogen, sunt utili în diagnosticul și monitorizarea vasculitelor și au importanță în clasificarea acestora. Se execută prin imunofluorescență indirectă utilizând ca substrat PMN normale, izolate prin centrifugare în gradient de densitate și fixate cu etanol. Aspectul imunofluorescenței poate fi: **citoplasmatic (c-ANCA)** (Figura 6) unde se observă o fluorescență granulară a citoplasmei, antigenul fiind Proteinaza 3 (PR3); **perinuclear (p-ANCA)** (Figura 7) unde fluorescența este omogen perinucleară și antigenul major este Mi-

can be assessed also by ELISA but only for the two major specificities. Despite their high specificity for vasculitides, the screening of these antibodies is not recommended. Small titers may also appear in infections. When the suspicion of vasculitides arises, their assessment is recommended.

The diseases associated with the **c-ANCA** pattern are: Wegener's granulomatosis (>95%), microscopic polyangiitis, Churg-Strauss syndrome and polyarteritis. **p-ANCA** pattern is associated with primary vasculitides: pauci-immune rapidly progressive glomerulonephritis, microscopic polyangiitis, Churg-Strauss syndrome, polyarteritis nodosa (17). A p-ANCA pattern can also be encountered in certain collagenoses such as syndrome Felty's syndrome, SLE, rheumatoid arthritis and Sjogren's syndrome, as well as in certain inflammatory gastrointestinal diseases: ulcerative colitis, Crohn's disease and primary sclerosing cholangitis. In the latter diseases, the antigens are cathepsin G, elastase and lactoferrin.

Anti-GMB (Glomerular Basement Membrane) Antibodies

These antibodies are directed against

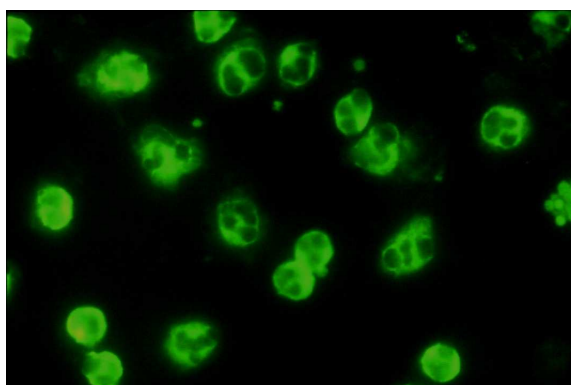


Figure 6. c-ANCA (cytoplasmic ANCA) - granular fixation of the cytoplasm
c-ANCA (cytoplasmic-ANCA)- fixarea granulară a citoplasmei

eloperoxidaza (MPO), dar și lactoferina, elastaza, catepsina G; aspectul **atipic-ANCA** care apare de regulă în contextul prezenței anticorpilor antinucleari. Diluția screening a serului de testat este de 1:10 (16). Se execută și prin tehnici ELISA, numai pentru cele două specificități majore. Nu se recomandă screening pentru acești anticorpi, în ciuda specificității mari pentru vasculite. Pot apare titruri mici și în infecții. Se recomandă efectuarea lor când există suspiciune pentru vasculite.

Bolile asociate aspectului **c-ANCA** sunt: granulomatoza Wegener în (>95%), poliangeita microscopică, Sindrom Churg-Strauss și poliarterita. Aspectul **p-ANCA** este asociat cu vasculite primare: glomerulonefrita rapid progresivă pauci imună, poliangeita microscopică, sindrom Churg Strauss, poliarterita nodoasă (17). Aspectul p-ANCA mai poate fi întâlnit în anumite collagenoze ca sindrom Felty, LES, PR și sindrom Sjogren, precum și în anumite boli inflamatorii gastro-intestinale: colita ulcerativă, boala Crohn și colangita sclerozantă primară. În acestea din urmă, antigenele sunt catepsina G, elastaza și lactoferina.

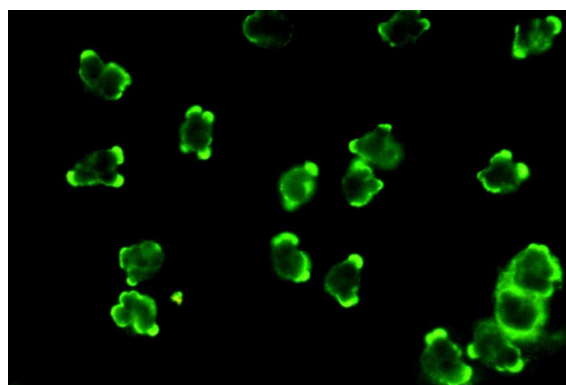


Figure 7. p-ANCA (perinuclear ANCA) - homogenous perinuclear fixation of the cytoplasm
p-ANCA (perinuclear -ANCA)- fixarea omogen perinucleară a citoplasmei

glomerular and alveolar basement membranes and are characteristic for Goodpasture's syndrome. They recognize the noncollagen domain (NC1) of the collagen IV $\alpha 3$ chain. They are pathogenetic, are usually of IgG isotype, are confirmed by renal biopsy by their linear fixation pattern and are useful in monitoring cytotoxic and plasmapheretic therapy. Usually they are assessed through ELISA, but they can also be highlighted through immunofluorescence, case in which the mandatory substrate is represented by monkey kidney.

As a **conclusion**, we make the following observations. Antibody identification does not replace the diagnosis of autoimmune disease unless there are clinical data to sustain this diagnosis. Nevertheless, once their presence is confirmed, the diagnosis can dramatically change. The presence of antibodies must be interpreted in the context of clinical data, patient's age and antibody titer.

Anticorpi anti membrană bazală glomerulară (anti -GBM)

Anticorpii sunt direcționați față de membranele bazale glomerulare și alveolare fiind caracteristici pentru sindromul Goodpasture. Recunosc domeniul non-colagen (NC1) al lanțului $\alpha 3$ al collagenului IV. Sunt patogeni și de regulă izotip IgG. Sunt confirmați prin biopsie renală cu aspectul liniar de fixare al acestora. Sunt utili în monitorizarea terapiei cu agenți citotoxici și plasmafereză. Se identifică de regulă prin teste ELISA, dar e posibil și prin imunofluorescență indirectă, unde substratul este obligatoriu rinichi de maimuță.

Ca și **concluzie**, facem următoarele observații. Identificarea autoanticorpilor nu înlocuiește diagnosticul de boală autoimună dacă nu există și date clinice care să susțină diagnosticul. Cu toate că odată ce prezența lor este confirmată, diagnosticul poate fi schimbat în mod dramatic. Prezența anticorpilor trebuie interpretată în contextul datelor clinice, a vârstei pacientului și al titrului anticorpilor.

References (Bibliografie)

1. Gonzales-Buitrago J.M., Gonzales C. Present and future of autoimmunity laboratory. Clin Chim Acta 2006, 365, 50-57
2. Tozzoli R. Recent advances in diagnostic technologies and their impact in autoimmune diseases. Autoimmun Rev 2007, 6, 334-340
3. Plebani M., Pittoni M., Celadin M et al. Recent advances in diagnostic technologies for autoimmune disease. Autoimmun Rev 2009, 8, 238-243
4. Villalta D., Tozzoli R., Tonutti E et al. The laboratory approach to the diagnosis of autoimmune diseases: is the time to change? Autoimmun Rev 2007, 6, 359-365
5. Rose N. R. Predictors of autoimmune disease: autoantibodies and beyond. Autoimmunity 2008, 41 (6), 419-428
6. Bizzaro N. The predictive significance of autoantibodies in organ-specific autoimmune diseases. Clin.Rev Allergy Immunol 2008, 34 (3), 326-331
7. Desplat-Jego S., Bardin N., Larida B et al. Evaluation of the BioPlex2200 ANA Screen for detection of antinuclear antibodies and comparison with conventional methods. Ann NY Acad Science 2007, 1109 Issue Autoimmunity, 245-255
8. Kaul R., Johnson K, Scholz H et al . Performance of BioPlex2200 Autoimmune Vasculitis kit.

Autoimmunity Rev 2009, 8, 224-227

9. Joos T.O., Schrenk M., Hopfl P. et al. Autoantigen microarray enzyme-linked immunosorbent assay for autoimmune diagnostics. Electrophoresis 2000, 21, 2641-50

10. Cristea A. Explorări imunologice. In : Brudașcă I., Cristea A. Ghid de laborator. Ed. Medicală Universitară "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca 2005, p 121-174

11. Haugbro K., Nossent J.C., Winkler T et al. Anti ds DNA antibodies and disease classification in antinuclear antibody positive patients. The role of analytical diversity. Ann Rheum Dis 2004, 63, 386-394

12. Goetz J. Anticorps anti-nucleosome. GEAI L'INFO No 2, Juillet 1999, 5-8

13. Amoura Z., Koutouzov S, Chabre H et al. Presence of antinucleosome autoantibodies in a restricted set of connective tissue diseases. Arthritis&Rheum 2000, 43, 76-84

14. Sinico R. A., Radice A., Ikehata M. et al. Anti C1q autoantibodies in lupus nephritis: prevalence and clinical significance. Ann NY Acad Sci. 2005, 1050, 193-200

15. Kallenberg C. G.M. Anti C1q autoantibodies. Autoimmunity Rev 2008, 7, issue 8, 612-615

16. Cristea A., Badea T, Bodizs G. Clinical evaluation of antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in ANCA associated diseases. J.Clin Lab Immunol 1995, 46, 85-94

17. Viik A. Rational use of ANCA in the diagnosis of vasculitis. Rheumatology 2002, 41, 481-483