

Progrese în detectarea anticorpilor anti-dsDNA

Advances in detection of anti-dsDNA antibodies

Manole Cojocaru

Rezumat

În practica medicală, anticorpul față de acidul dezoxiribonucleic dublu catenar (dsDNA) sunt printre cei mai frecvenți anticorpi antinucleari (ANA). Corelația serologică între dsDNA și evoluția clinică este încă un domeniu de controverse. Anticorpul anti-dsDNA prezintă corelație cu lupusul eritematos sistemic (LES) și este posibil ca acești autoanticorpi să joace rol în patogenia LES. Anticorpul anti-dsDNA folosesc la monitorizarea evoluției LES. Anticorpul anti-DNA pot fi împărțiți în 2 grupe: aceia care reacționează cu DNA denaturat sau monocatenar (ssDNA) și aceia care recunosc DNA dublu catenar (dsDNA). Detectarea anticorpilor anti-ssDNA este puțin utilă în clinică. Anticorpul anti-dsDNA sunt relativ specifici (95%) pentru LES. Rezultatul negativ nu exclude afecțiunea. Numeroase metode au fost folosite pentru detectarea anticorpilor anti-dsDNA: imunofluorescența indirectă, metoda imunoenzimatică, contraimmunoelectroforeza, imuno- și western blotting. Tehnica imunofluorescenței este accesibilă pentru detectarea anticorpilor anti-dsDNA în ser. Kitul utilizat pentru această tehnică conține Crithidia luciliae ca substrat. Kinetoplastul de Crithidia luciliae conține dsDNA. Martorul pozitiv validează testul și ajută la identificarea kinetoplastului. Serurile pozitive sunt titrate până când ultima diluție mai prezintă încă fluorescența kinetoplastului. Un semn de prognostic nefavorabil în LES este prezența anticorpilor anti-dsDNA care indică afectarea organelor vitale (ex, rinichiul sau vasele). Aprox. 65% dintre bolnavii cu LES în puseu prezintă anticorpi anti-dsDNA și mai puțin de 5% prezintă titruri crescute când boala este în remisie. Peste 80% dintre bolnavii cu nefrită lupică prezintă titrul anticorpilor crescut.

Cuvinte cheie: anticorpul anti-dsDNA, LES, evoluția bolii, teste de laborator

Abstract

In clinical practice, antibodies to double-stranded deoxyribonucleic acid (dsDNA) are among the commonly used antinuclear (ANA) antibodies. The serological correlation between dsDNA and clinical outcome is an area of controversy. The dsDNA continue to show a high disease correlation with patients suffering from SLE, and it is possible that they play a role in its pathogenesis. Additionally, they have also been used clinically to monitor disease activity. Antibodies to DNA can be divided into 2 groups: those that react to denatured or single-stranded DNA (ssDNA) and those recognizing double-stranded DNA (dsDNA). Tests for anti-ssDNA antibodies have limited usefulness. In contrast, anti-dsDNA antibodies are relatively specific (95%) for SLE, making them useful for diagnosis. A negative test does not rule out the disease.

Numerous methods have been devised to detect anti-dsDNA antibodies: indirect immunofluorescence, immunoassay, counter immunoelectrophoresis, immuno- and western blotting. An immunofluorescent assay (IFA) is now available for the detection of anti-dsDNA antibodies in human serum. This IFA anti-dsDNA test kit uses Crithidia luciliae as a substrate. The optimally shaped Crithidia luciliae provide easy identification of the

kinetoplast which contains dsDNA. The use a positive control not only validates the test but helps in the identification of the kinetoplast. Positive specimens are titred to an end-point determined as the last dilution to show kinetoplast fluorescence. A poor prognostic sign in SLE is the presence of anti-dsDNA antibodies indicating an increased likelihood of major organ involvement (e.g., renal disease or vasculitis). About 65% of SLE patients with active disease have anti-dsDNA antibodies but less than 5% have elevated levels when disease is quiescent. More than 80% of patients with lupus nephritis have elevated levels

Key words: anti-dsDNA antibodies, SLE, disease activity, laboratory tests

Acidul dezoxiribonucleic este o moleculă mare care se găsește în mod natural în două forme diferite: conformația dublu catenară (dsDNA) și monocatenară (ssDNA). Aceste molecule conțin numeroși determinanți față de care pot să apară autoanticorpi.

Anticorpilor anti-DNA sunt împărțiți în două grupe: aceia care reacționează cu DNA denaturat sau monocatenar (ssDNA) și aceia care recunosc DNA nativ sau dublu catenar (dsDNA) (1,2). Testele pentru detectarea anticorpilor anti-ssDNA prezintă importanță clinică limitată. Anticorpilor anti-dsDNA sunt relativ specifici (95%) pentru LES și prezintă importanță în stabilirea diagnosticului (30-65% dintre bolnavii cu LES prezintă anticorpi anti-dsDNA).

Anticorpilor anti-ssDNA sunt față de bazele nucleotid ale DNA și sunt prezenți în multe stări clinice (LES, poliartrita reumatoidă, alte boli inflamatorii, infecții cronice, neoplazii). Anticorpilor anti-dsDNA nu prezintă semnificație diagnos-

tică în LES (3,4). Prezența anticorpilor anti-dsDNA sugerează LES.

S-a demonstrat că anticorpilor anti-dsDNA joacă rol în patogenia LES. Prezența anticorpilor anti-dsDNA la pacienții simptomatici este considerată patognomonică pentru LES (testul este specific, dar nu este sensibil pentru LES)

Numeroase metode au fost folosite pentru detectarea anticorpilor anti-dsDNA, dar fiecare metodă are limite.

Cei mai importanți sunt autoanticorpilor față de bazele nucleotid ale moleculei și față de dezoxiriboza-fosfat. Autoanticorpilor față de bazele nucleotid (anti-ssDNA) sunt cei mai frecvenți, aceștia sunt constituentul major al anticorpilor antinucleari (ANA) care produc *patternul* omogen la imunofluorescența indirectă și nu sunt specifici bolii. Aceștia se găsesc la pacienții cu tulburări neimunologice cât și la cei cu boli autoimune (poliartrita reumatoidă, LES, sclerodermie).

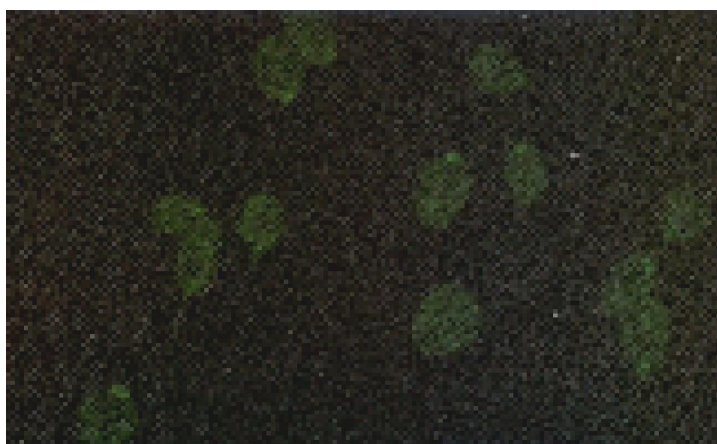


Fig. 1. Imunofluorescența indirectă. Anticorpi anti-dsDNA (pattern negativ)

Imunospecificitatea	Asocierea cu afecțiunea
<i>Anticorpi anti-DNA</i> - determinanți identici pe DNA nativ și denaturat - determinanți pe DNA denaturat	- titrul crescut în LES - titruri scăzute în alte boli reumatice - prezenți în boli reumatice și nereumatice

Tabelul 1. Imunospecificitățile anticorpilor antinucleari

Autoanticorpii față de epitopii dezoxiriboza-fosfat sunt mai puțin frecvenți. Aceștia sunt prezenți în concentrație mare la >90% dintre pacienții cu LES. Titrul acestora se corelează cu evoluția bolii la majoritatea pacienților, făcând astfel detectarea acestora utilă în diagnosticul și managementul pacienților cu LES (5).

Anticorpii anti-dsDNA prezintă valoare diagnostică și sunt implicați în patogenia LES. Fluctuațiile nivelului anti-dsDNA sunt folosite ca marker pentru evaluarea activității bolii (1).

Unele cercetări folosind tehnica ELISA pentru screening-ul anticorpilor anti-dsDNA (pe 633 de seruri) au semnalat că anti-dsDNA sunt prezenți la pacienții cu LES cu mult înaintea stabilirii diagnosticului clinic (9,3 ani, cu media de 2,7 ani) (6). S-a observat că pacienții cu titruri mari ale anticorpilor anti-dsDNA în momentul diagnosticului prezentă și afectarea renală. Aceiași autori au remarcat că creșterea concentrației anti-dsDNA contribuie la debutul manifestărilor clinice la unii dintre pacienții cu LES. De asemenea, s-a observat scăderea semnificativă a titrului anticorpilor anti-dsDNA după tratamentul cu corticosteroizi. (6).

Pe un lot de 34 de pacienți cu sarcoidoză s-a semnalat prezența ANA la 10 dintre pacienți, iar 2 pacienți au prezentat anticorpi anti-dsDNA (sarcoidoza se poate asocia cu LES), prezența acestor anticorpi nu indică dezvoltarea ulterioară a bolii (LES nu a apărut în cei 15 ani de supraveghere) (4).

Pe un lot de 25 pacienți cu hepatită cronică cu virus C (72% au prezentat markeri de autoimunitate). Folosind tehnica ELISA pentru detectarea anticorpilor anti-dsDNA, s-a semnalat că nici unul dintre pacienții investigați nu a prezen-

tat anticorpi anti-dsDNA (7).

Unele studii au arătat că titrurile anticorpilor anti-dsDNA variază cu evoluția clinică în LES, indicând că acest test este util pentru evaluarea stării clinice a pacientului cu LES (8). Această asociere este importantă la pacienții cu nefrită lupică și afectarea SNC. Determinările repetate ale anticorpilor anti-dsDNA sunt cu valoare predictivă mai mare decât dozarea nivelurilor C3 și C4 în LES.

Alte studii nu au semnalat însă nici o asociere între gravitatea LES și titrul anticorpilor anti-dsDNA (9).

Un alt studiu a sugerat că monitorizarea titrurilor anticorpilor anti-dsDNA este utilă pentru tratamentul profilactic (10).

A fost analizată valoarea predictivă a creșterii titrului anticorpilor anti-dsDNA din clasa IgM comparativ cu cei din clasa IgG pentru a evalua recăderile la pacienții cu LES. Creșterea titrului anticorpilor anti-dsDNA din clasa IgM este în contrast cu creșterea titrului anticorpilor din clasa IgG, nu prezintă valoare predictivă în evaluarea recăderilor și nu sunt asociați cu manifestări clinice specifice în LES (11).

Producerea anticorpilor anti-Ro/SS-A și anti-La/SS-B se corelează strâns cu LES și este independentă de producerea de anticorpi anti-dsDNA (12).

Un studiu care a analizat dacă, cu diferite metode (RIA, ELISA, imunofluorescența indirectă), se obțin informații comparabile în ceea ce privește concentrația anticorpilor anti-dsDNA, a semnalat că rezultatele se corelează strâns (13).

S-au studiat caracteristicile clinice și imunologice la un grup de bolnavi cu LES. Rezultatele au subliniat semnificația clinică a anticorpilor față de dsDNA, constatând că tabloul

clinic se corelează cu titrul crescut al anticorpilor anti-dsDNA (14).

Unii autori au efectuat un studiu prospectiv asupra semnificației diagnostice a anticorpilor anti-dsDNA arătând că 85% dintre pacienții fără tabloul clinic de LES, dar cu titrul relativ crescut al anticorpilor anti-dsDNA în ser au dezvoltat LES după câțiva ani (15).

Un alt studiu prospectiv efectuat asupra unui grup de bolnavi cu LES a demonstrat relația dintre evoluția clinică și titrul anticorpilor anti-dsDNA (13). Autorii au demonstrat că titrul anticorpilor anti-dsDNA crește înaintea apariției primelor semne clinice care arată agravarea și scade când afecțiunea este în remisie (16,17).

Jonsson și colab. au urmărit prospectiv peste 6 ani evoluția la pacienți adulți cu LES. Datele imunologice au relevat că frecvența crescută (73%) a anticorpilor anti-dsDNA la bolnavii cu LES s-a corelat cu frecvența crescută a recăderilor (18).

Un studiu prospectiv longitudinal la pacienți cu LES a relevat relația între titrul anticorpilor anti-dsDNA și evoluția bolii. Agravarea bolii (prezența simptomelor majore) nu este însoțită mereu de creșterea titrului anticorpilor anti-dsDNA (19).

Titurii scăzute ale anticorpilor anti-dsDNA au fost observate în special la cei cu LES în perioada de remisie și la unele cazuri cu avor-

turi repetate (prezența autoanticorpilor care reacționează încrucișat) (19-21). Serologic, există corelație între ANA și anti-dsDNA. Titrurile crescute ale anticorpilor anti-dsDNA sunt observate când titrurile ANA sunt peste 1/80 (se recomandă efectuarea întâi a testului pentru ANA) (23).

Unii autori, studiind reactivitatea anti-dsDNA și anti-nucleosom la bolnavi cu LES, au semnalat că afectarea renală nu s-a observat la cei care nu au prezentat anticorpi anti-dsDNA și nici anti-nucleosom (24, 25).

Anticorpii anti-dsDNA sunt policlonali (26). Anticorpii anti-fosfolipide (anticardiolipini), pot să reacționeze încrucișat cu anticorpii anti-dsDNA (27). S-a demonstrat, de asemenea, reactivitatea încrucișată a anticorpilor anti-dsDNA cu proteinele membranei nucleare (28).

Folosirea anticorpilor anti-dsDNA pentru evaluarea LES variază printre reumatologi. Unii monitorizează curent titrurile, alții testează numai bolnavii la care titrul anticorpilor anti-dsDNA pare să reflecte manifestările clinice, iar alții nu folosesc testul pentru monitorizarea evoluției LES.

Anticorpii anti-dsDNA sunt absenți la pacienții cu LES indus de medicamente (22)

Anticorpii anti-dsDNA identificați de Maxime Seligmann în 1957 rămân mereu piatra unghiulară în diagnosticul biologic al LES (<5% LES seronegativ).

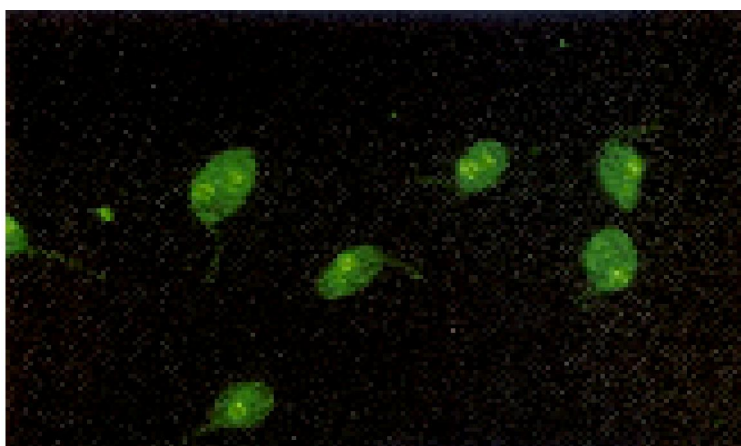


Foto 2. Imunofluorescență indirectă. Anticorpi anti-dsDNA (patern pozitiv)

Concluzii

Anticorpul anti-dsDNA este printre anticorpii antinucleari cel mai frecvent folosit pentru evaluarea stării bolilor autoimune. Se recomandă renunțarea la testul dsDNA la cazurile cu ANA negativ.

Anticorpul anti-dsDNA se poate detecta folosind imunofluorescența indirectă sau ELISA.

Anticorpul anti-dsDNA este relativ specific (95%) pentru LES.

Absența anticorpilor anti-dsDNA nu trebuie să excludă LES ca un diagnostic posibil (anticorpii sunt prezenți până la 60% dintre bolnavii cu LES).

Bibliografie

1. Hang I, Nakamura R. Current concepts and advances in clinical laboratory testing for autoimmune diseases. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1997; 34: 275-311
2. Van Venrooij WJ. Autoantigens in connective tissue diseases In: Panayi GS, Whaley K (eds), *Immunology of connective tissue diseases*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1994; 305-34
3. Von Muhlen CA, Tan EM. Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum* 1995; 24: 323-58
4. Weinberg I, Vasiliev L, Gotsman I. Anti-dsDNA antibodies in sarcoidosis. *Seminars in Arthritis & Rheumatism* 2000; 29(5): 328-31
5. Nakamura RM. Clinical and laboratory evaluation of systemic rheumatic diseases. 19th edition. In: Henry JB, editor. *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. Philadelphia: WB Saunders, 1996; 1013-24
6. Arbuckle MR, James JA, Kohlhase KF, et al. Development of anti-dsDNA autoantibodies prior to clinical diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Scandinavian Journal of Immunology* 2001; 54(1-2): 211-9
7. Agarwal N, Handa R, Acharya SK, et al. A study of autoimmune markers in hepatitis C infection. *Indian Journal of Medical Research* 2001; 113: 170-4
8. Ter Borg EJ, Horst G, Hummel EJ, et al. Measurement of increases in anti-double-stranded DNA antibody levels as a predictor of disease exacerbation in systemic lupus erythematosus: A long-term, prospective study *Arthritis Rheum* 1990; 33(5): 634-43
9. Esdaile JM, Abrahamowicz M, Joseph L, et al. Laboratory tests as predictors of disease exacerbations in systemic lupus erythematosus: why some tests fail *Arthritis Rheum* 1996; 39: 370-8
10. Bootsma H, Spronk P, Derksen R et al. Prevention of relapses in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1995; 345(8965): 1595-9
11. Bootsma H, Spronk PE, Ter Borg EJ, et al. The predictive value of fluctuations in IgM and IgG class anti-ds-DNA antibodies for relapses in systemic lupus erythematosus. A prospective long-term observation. *Annals of the Rheumatic Diseases* 1997; 56(11): 661-6
12. Meilof JF, Veldhoven Ch, Swaak AJ, et al. Production of anti-Ro/SS-A and anti-La/SS-B autoantibodies is closely coordinated in systemic lupus erythematosus and independent of anti-dsDNA production. *Journal of Autoimmunity* 1997; 10(1): 67-75
13. Ward MM, Pisetsky DS, Christenson VD. Anti-double stranded DNA antibody assays in systemic lupus erythematosus: correlations of longitudinal antibody measurements. *Journal of Rheumatology* 1989; 16(5) 609-13
14. Cervera R, Khamashta MA, Font J, et al. Systemic lupus erythematosus: clinical and immunologic patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. The European Working Party on Systemic Lupus Erythematosus. *Medicine* 1993; 72(2): 113-24
15. Swaak AJ, Groenwold J, Bronsveld W. Predictive value of the Rheumatic Diseases 1986; 45(5): 359-66
16. Swaak AJ, Groenwold J, Aarden LA, et al. Prognostic value of anti-dsDNA in SLE. *Annals of the Rheumatic Diseases* 1982; 41(4) 388-95
17. Swaak T, Smeenk R. Detection of anti-dsDNA as a diagnostic tool: a prospective study in 441 non-systemic lupus erythematosus patients with anti-dsDNA antibody (anti-dsDNA). *Annals of the Rheumatic Diseases* 1985; 44(4): 245-51
18. Jonsson H, Nived O, Sturfeld G. Outcome in systemic lupus erythematosus: a prospective study of patients from a defined population. *Medicine* 1989; 68(3): 141-50

19. Thomas C, Robinson J. The antinuclear antibody test. When is a positive result clinically relevant? *Postgrad Med* 1993; 94: 55-66
20. Moder KG, Immunological tests in rheumatology. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999; 81: 539-47
21. Spronk PE, Bootsma H, Kallenberg CG. Anti-DNA antibodies as early predictor for disease exacerbation in SLE. Guidelines for treatment? *Clin Rev Allergy Immunol* 1998; 16: 211-8
22. Hauptman HW. Variants/subsets of SLE. *Md Med J* 1991; 40: 909-16
23. Koshak EA, Mughales J. How the serological correlation between ANA and dsDNA enhance cost effectiveness. *Annals of Saudi Medicine* 2000; 20: 467-70
24. Min D-J, Kim S-J, Park S-H, et al. Anti-nucleosome antibody: Significance in lupus patients lacking anti-double-stranded DNA antibody *Clinical and Experimental Rheumatology* 2002; 20: 13-18
25. Amoura Z, Piette J-C, Bach J-F, et al. The key role of nucleosome in lupus. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 26
26. Alem M, Moghadam S, Malki J, et al. detection of autoantibodies to nuclear antigens by EIA and IF techniques. *Allerg Immunol (Paris)* 1997; 29: 191-4
27. Smeenk RJT, Berden JHM, Swaak AJG. dsDNA autoantibodies In: Peter JB, Shoenfeld Y (eds) *Autoantibodies*. Amsterdam Elsevier. 1996; 227-36
28. Radic MZ. Initiation of systemic autoimmunity and sequence specific anti-DNA autoantibodies. *Crit Rev Immunol* 1999; 19: 117-26