DR INŻ. **MAŁGORZATA KOZŁOWSKA,**
KIEROWNIK DZIAŁU INFORMACJI NAUKOWEJ
DR N. MED. **BARBARA PAWŁOWSKA,**
SPECJALISTA DS. INFORMACJI NAUKOWEJ
EUROIMMUN POLSKA SP. Z O.O.

TEKST PROMOCYJNY

Diagnostyka zapaleń małych naczyń w świetle nowych rekomendacji

Czym są układowe zapalenia naczyń?

Układowe zapalenia naczyń (ang. *systemic vasculitis*) stanowią szeroką grupę chorób autoimmunizacyjnych o nieznanej etiologii, których istotą jest naciekanie leukocytów na ściany naczyń krwionośnych. Prowadzi to do ich uszkodzenia i ograniczenia drożności. Proces ten może obejmować naczynia różnych narządów, ale w szczególności dotyczy nerek, płuc, górnych dróg oddechowych, skóry i gałek ocznych. Ostatecznie układowe zapalenia naczyń mogą prowadzić do niedokrwienia i martwicy tkanek zaopatrywanych przez zajęte procesem chorobowym naczynia [1].

Klasyfikacja zapaleń naczyń

Na podstawie rozmiaru naczynia zajętego procesem chorobowym układowe zapalenia naczyń dzieli się na [2]:

I. zapalenia dużych naczyń (zapalenie tętnic Takayasu, olbrzymiokomórkowe zapalenie tętnic);

II. zapalenia średnich naczyń (guzkowe zapalenie tętnic, choroba Kawasakiego);

III. zapalenia małych naczyń:

a. zapalenie małych naczyń związane z przeciwciałami przeciwko cytoplazmie neutrofili (ANCA, ang. *anti-neutrophil cytoplasmic antibodies*); do zapaleń naczyń związanych z przeciwciałami ANCA (AAV, ang. *ANCA-associated vasculitis*) należą:
- ziarniniakowatość z zapaleniem naczyń (GPA, ang. *granulomatosis with polyangiitis*), dawniej: ziarniniakowatość Wegenera;
- eozynofilowa ziarniniakowatość z zapaleniem naczyń (EGPA, ang. *eosinophilic granulomatosis with polyangiitis*), dawniej: zespół Churga-Strauss;
- mikroskopowe zapalenie naczyń (MPA, ang. *microscopic polyangiitis*);

b. zapalenie małych naczyń związane z kompleksami immunologicznymi;

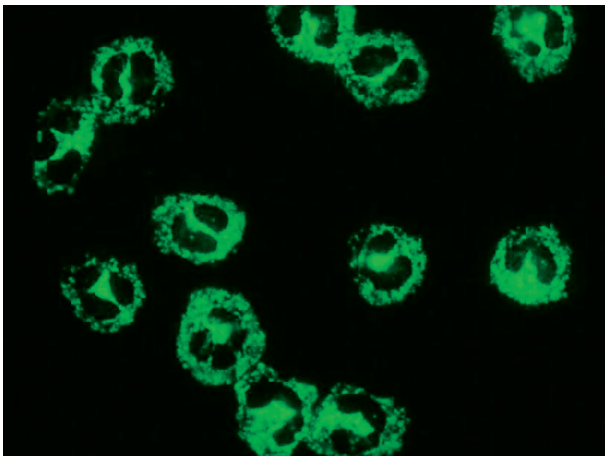
IV. zapalenia różnych naczyń (choroba Behçeta, zespół Cogana).

Patogeneza AAV

W patogenezie **GPA**, **EGPA** oraz **MPA** dużą rolę odgrywają pobudzone neutrofile oraz przeciwciała ANCA, które są skierowane przeciwko antygenom obecnym w ziarnistościach cytoplazmatycznych neutrofili. Przeciwciała te przyczyniają się do zwiększonej aktywacji neutrofili, a następnie do tzw. „wybuchu oddechowego", uwalniającego zawarte w ziarnistościach enzymy proteolityczne, cytokiny, chemokiny oraz inne mediatory stanu zapalnego. Kaskada reakcji, w której biorą udział przeciwciała ANCA, prowadzi ostatecznie do lizy komórek śródbłonka naczyniowego. Ponadto przeciwciała ANCA zakłócają wchłanianie się nacieku zapalnego w świetle naczyń oraz rozregulowują apoptozę neutrofili, czyli naturalny proces zaprogramowanej śmierci komórek [3].

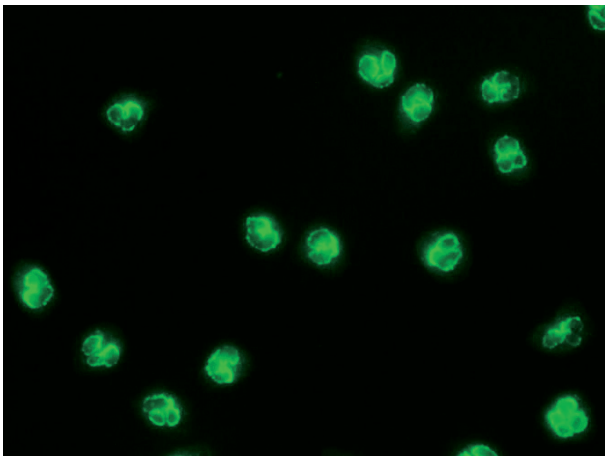
Algorytm diagnostyczny wykrywania przeciwciał ANCA

Zgodnie z międzynarodowymi rekomendacjami z 1999 roku dotyczącymi diagnostyki przeciwciał ANCA badanie przesiewowe powinno być wykonane metodą immunofluorescencji pośredniej (IIFT, ang. *indirect immunofluorescence test*) z zastosowaniem jako substratu granulocytów utrwalonych etanolem [4]. Badanie to umożliwia różnicowanie dwóch podstawowych typów przeciwciał ANCA: o typie świecenia cytoplazmatycznego (cANCA) oraz o typie świecenia perinuklearnego (pANCA) (ryc. 1–2).



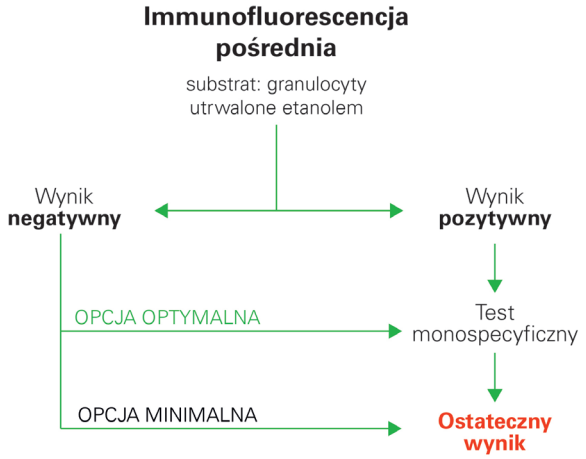
Ryc. 1. Granulocyty utrwalone etanolem. Przeciwciała cANCA

TEKST PROMOCYJNY



Ryc. 2. Granulocyty utrwalone etanolem. Przeciwciała pANCA

Dodatni wynik IIFT należy następnie potwierdzić testem monospecyficznym w celu ustalenia specyficzności antygenowej wykrytych przeciwciał. Według rekomendacji w przypadku negatywnego wyniku badania IIFT wyróżnia się dwie strategie: „opcję minimalną", która zakłada, że wynik negatywny IIFT jest ostateczny, oraz „opcję optymalną", według której w pewnych przypadkach (m.in. u pacjentów z objawami klinicznymi lub u chorych poddawanych immunoterapii) uzasadnione jest wykonanie testu monospecyficznego pomimo negatywnego wyniku IIFT (ryc. 3).



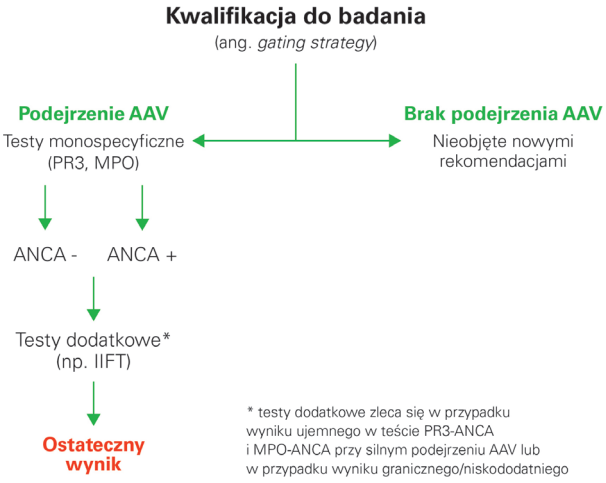
Ryc. 3. Algorytm diagnostyczny wykrywania przeciwciał ANCA

Antygeny docelowe dla przeciwciał ANCA

Antygenem docelowym dla przeciwciał cANCA jest przede wszystkim proteinaza 3 (PR3) lub rzadziej – bakteriobójcze białko zwiększające przepuszczalność błony bakterii Gram-ujemnych (BPI, ang. *bactericidal permeability increasing protein*). W przypadku pANCA antygenem docelowym jest najczęściej mieloperoksydaza (MPO), ale mogą nim być również laktoferyna, elastaza, katepsyna G i wiele innych składników cytoplazmy granulocytów obojętnochłonnych [4].

Diagnostyka laboratoryjna zapaleń małych naczyń związanych z ANCA

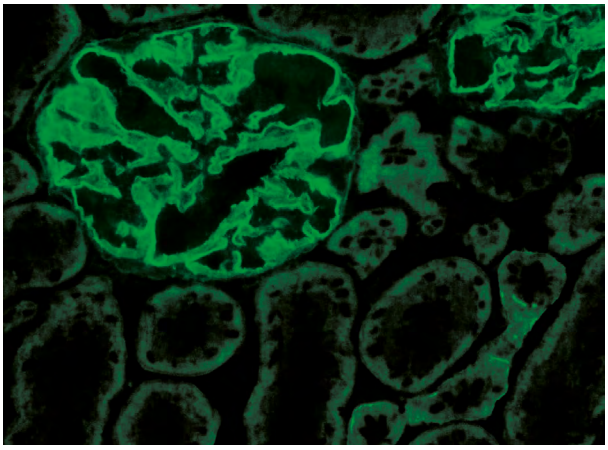
Najważniejszymi antygenami docelowymi dla przeciwciał ANCA zaangażowanych w patogenezę AAV są PR3 (w przebiegu GPA) oraz MPO (w przebiegu MPA oraz EGPA). W 2017 roku ukazały się **nowe rekomendacje dotyczące wyłącznie diagnostyki GPA oraz MPA** (ryc. 4) [5]. Według zalecanej strategii diagnostycznej u pacjentów z podejrzeniem tych dwóch chorób należy w pierwszej kolejności wykonać test monospecyficzny w kierunku przeciwciał PR3-ANCA oraz MPO-ANCA. Jeśli zarówno dla PR3-ANCA, jak i dla MPO-ANCA wyniki są ujemne, a istnieje silne podejrzenie AAV, zaleca się wykonanie dodatkowych testów, np. IIFT, w celu zwiększenia czułości badania. Przeprowadzenie drugiego testu inną metodą może również nieznacznie zwiększyć specyficzność badania w przypadku niskiego miana przeciwciał [5].



Ryc. 4. Algorytm diagnostyczny w przypadku podejrzenia AAV

W świetle nowych rekomendacji z 2017 roku IIFT można pominąć. Należy jednak pamiętać, że rekomendacje te ograniczają się jedynie do dwóch jednostek chorobowych (GPA oraz MPA). Nie dotyczą m.in. pacjentów z EGPA. Ponadto przeciwciała ANCA występują również w innych schorzeniach – kolagenozach, nieswoistych zapaleniach jelit czy pierwotnym stwardniającym zapaleniu dróg żółciowych. Przeciwciała ANCA, które wykrywa się u tych pacjentów, są najczęściej skierowane przeciwko innym antygenom docelowym niż PR3 lub MPO [4]. W tym przypadku ograniczenie diagnostyki wyłącznie do testów opartych o te dwa antygeny docelowe zmniejsza trafność diagnostyczną.

Przeciwciała ANCA wytwarza również około 30% pacjentów nefrologicznych z przeciwciałami przeciwko błonie podstawnej kłębuszków nerkowych (GBM, ang. *glomerular basement membrane*) (ryc. 5). Dlatego też u pacjentów z chorobami nerek warto analizować równolegle oba typy przeciwciał (ANCA i anty-GBM).



Ryc. 5. Nerka szczura. Przeciwciała anty-GBM

Nowatorski test do diagnostyki ANCA

Istnieje możliwość wykonania tylko jednego badania, które łączy zalety IIFT i metod monospecyficznych. Takim rozwiązaniem jest test IIFT oparty na kombinacji sześciu różnych substratów. Podstawę testu stanowią: **granulocyty utrwalone etanolem** – umożliwiające rozróżnienie przeciwciał cANCA i pANCA; **granulocyty utrwalone formaliną** – pozwalające na wykrycie przeciwciał ANCA formalino-dodatnich lub formalino-ujemnych; **komórki HEp-2 wraz z granulocytami utrwalonymi etanolem** – dzięki zastosowaniu tego substratu możliwe jest rozróżnienie przeciwciał ANCA i przeciwciał przeciwjądrowych (ANA, ang. *antinuclear antibodies*). Dodatkowo w teście tym znajdują się również substraty, które dzięki zastosowaniu nowatorskiej **techniki EUROPLUS** spełniają wymogi testu monospecyficznego. Podczas produkcji takich substratów na szkiełku mikroskopowym opłaszcza się wysokooczyszczony antygen w postaci kropli. Dzięki temu, w trakcie oceny preparatu, ewentualna fluorescencja świadczy o reakcji przeciwciała z konkretnym antygenem. W przypadku diagnostyki przeciwciał ANCA substraty stanowią wysokooczyszczone antygeny PR3, MPO oraz GBM. Wprowadzenie do laboratorium testu IIFT opartego o sześć substratów umożliwia wykonanie szczegółowej diagnostyki w kierunku przeciwciał ANCA podczas jednej inkubacji, a to przekłada się na wyższą trafność diagnostyczną oraz na oszczędność czasu pracowników laboratorium.

PIŚMIENNICTWO:

1. Wiatr E., Gawryluk D., *Pierwotne systemowe zapalenia naczyń związane z przeciwciałami przeciwcytoplazmatycznymi (ANCA) — rekomendacje diagnostyczne i lecznicze*, Pneumonol. Alergol. Pol. 2013; 81: 479–491.
2. Jennette J.C. i wsp., *2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides*, Arthritis Rheum. 2013; 65: 1–11.
3. Ryba M., Hruby Z., Witkiewicz W., *Układowe zapalenia naczyń związane z występowaniem przeciwciał przeciwko cytoplazmie neutrofili – ANCA*, Przegląd Lekarski 2013; 70 (3): 149–156.
4. Savige J. i wsp., *International consensus statement on testing and reporting of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA)*, Am. J. Clin. Pathol. 1999; 111: 507–513.
5. Bossuyt X. i wsp., *Revised 2017 international consensus on testing of ANCAs in granulomatosis with polyangiitis and microscopic polyangiitis*, Nature Reviews Rheumatology 2017; 13: 683–692.

Kompleksowa diagnostyka ANCA

System EUROPLUS

Jednoczesne badanie ANCA oraz potwierdzenie ich swoistości za pomocą wysokooczyszczonych białek.

TEST PRZESIEWOWY z ludzkimi granulocytami do oceny **pANCA, cANCA, aANCA**

+

TEST POTWIERDZAJĄCY z oczyszczonymi białkami do oceny **anty-MPO, PR3, GBM**

granulocyty (etanol)
granulocyty (formalina)
HEp-2 + granulocyty

MPO
PR3
GBM

6 BIOCHIPÓW na jednym polu reakcyjnym

Przesiew i potwierdzenie w trakcie jednej inkubacji!

EUROIMMUN Polska Spółka z o.o.