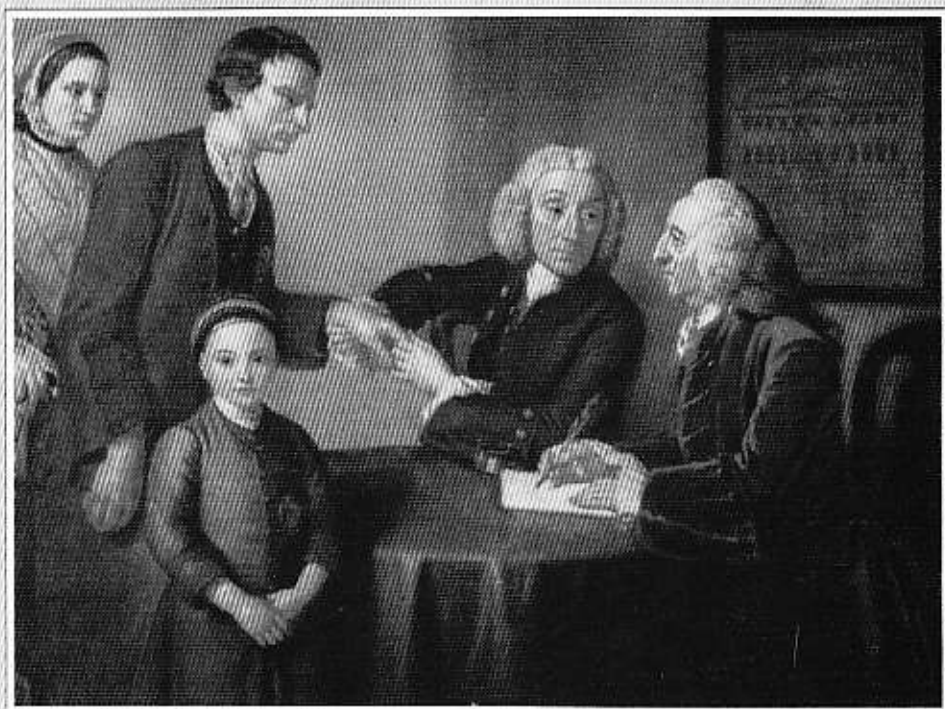


# magyar reumatológia



1994·3

35. ÉVFOLYAM

A MAGYAR REUMATOLÓGUSOK EGYESÜLETÉNEK TUDOMÁNYOS FOLYÓIRATA

*Eredeti közlemények***Extrahálható nukleáris antigén (ENA) elleni antitest meghatározás diagnosztikus értéke szisztémás lupus erythematosusban**Molnár Mária <sup>1</sup>, Kádár János dr. <sup>1</sup>, Csipő István dr. <sup>2</sup>, Gyimesi Edit dr. <sup>2</sup>  
és Gergely Péter dr. <sup>1</sup>

1 Semmelweis Orvostudományi Egyetem II. sz. Belklinika

2 Debreceni Orvostudományi Egyetem III. sz. Belklinika

A szerzők nyolcvan szisztémás lupus erythematosusban (SLE) szenvedő beteg extrahálható nukleáris antigén (ENA) elleni antitest vizsgálatát végezték el, és az eredményeket összevetették a klinikai képpel, illetve az ANA és anti-DNS pozitivitással. A vegyes SLE-s beteganyagban az ENA teszt 61,3%-ban volt pozitív. Bár a bőrtünetekkel és a thrombosisal járó esetekben az ENA pozitívítás gyakrabban fordult elő, a különbségek statisztikailag nem szignifikánsak. Nem volt korreláció az ENA pozitívítás, valamint a klinikai aktivitás, az ANA és anti-DNS pozitívítás között sem.

**KULCSSZAVAK:** Extrahálható nukleáris antigén (ENA), szisztémás lupus erythematosus (SLE)

**Bevezetés**

A szisztémás lupus erythematosus (SLE) a szisztémás autoimmun betegségek „prototípusa”, melyre a nagyrányú és sokféle specifikitású autoantitest termelése jellemző. Ezek közül kiemelkedően fontosak az anti-nukleáris antitestek (ANA), melyek egy része diagnosztikus, illetve prognosztikus jelentőséggel bír. Az ANA gyűjtőfogalom, mely igen sokféle specifikitású antitestet jelent. SLE-ben ezek közül kiemelten fontosak: a natív (kettős láncú) DNS-sel, a denaturált (egyes láncú) DNS-sel reagáló antitestek, a hisztonokkal reagáló antitestek, az anti Sm (Smith) antitest, mely non-hiszton magfehérjékkel reagál, a mag-ribonukleoproteinnel (n RNP-vel) reagáló antitestek, valamint az SS-A (Ro) és SS-B (La) antitestek, melyek különféle – RNS-sel komplexben lévő – proteinnel reagálnak.

Az extrahálható nukleáris antigének (ENA) elleni antitest fogalom első leírásakor különféle, mag-eredetű RNS-tartalmú antigénekkel reagáló antitesteket jelentett [1]. A kevert kötőszöveti betegség (MCTD) diagnosztikájában az ENA pozitívítás\* diagnosztikus jelentőségre tett szert [2]. Valójában az ENA is gyűjtő-

**DIAGNOSTIC VALUE OF ANTIBODIES AGAINST EXTRACTABLE NUCLEAR ANTIGENS (ENA) IN SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS**

The sera of 80 patients with systemic lupus erythematosus (SLE) were essayed for antibodies against extractable nuclear antigens (ENA) activity. The results were compared with clinical data and the presence of ANA and anti-DNA antibodies. The ENA test was positive in 61,3% of SLE patients. Though positive test was found more frequently in patients with skin involvement and thromboembolic episodes, the differences were not significant. There was no correlation between the positive ENA test, the clinical activity and the presence of ANA and anti-DNA antibodies.

**KEY-WORDS:** Extractable nuclear antigen (ENA) Systemic lupus erythematosus (SLE)

fogalom, mely az MCTD-ben valóban gyakran igen pozitív nRNP (más néven uridinben gazdag ribonukleoprotein: U1-RNP) specifikitás mellett magába foglalja az Sm antigént is, sőt a fiziológiás sóoldattal vagy más pufferoldatokkal extrahált antigének éppúgy tartalmazzák a non-hiszton nukleáris antigéneket is, mint pl. az SS-A (Ro)t, SS-B (La)-t és még néhány más, diagnosztikusan kevésbé jellemzett specifikitású antigént is [1, 3].

Az általunk alkalmazott módszer elsősorban az anti-Sm és az anti-n RNP antitestek kimutatására alkalmas [4, 5, 6], de valószínűleg a többi – fentebb felsorolt – ribonukleinsav, protein, illetve komplexeik elleni autoantitestet is kimutatja, tehát elsősorban olyan jellegű szűrővizsgálatra alkalmas, mint pl. az ANA teszt. Vizsgálatainkkal arra a kérdésre kerestünk választ, vajon az ENA pozitívítás és a betegség tünetek (mint SLE alcsoportok), valamint az ANA és anti-DNS pozitívítás között van-e valamiféle kapcsolat, azaz milyen diagnosztikus értéke van az ilyen jellegű meghatározásnak SLE-ben.

**Beteganyag és módszer**

1992 áprilisa és 1993 novembere között 80 SLE-s beteg szérum mintáit vizsgáltuk. Negatív kontrollként 20 egészséges egyén, pozitív kontrollként 1 kevert kötőszöveti beteg-

\* a továbbiakban a meghonosodott „ENA pozitívítást” használjuk, a helyénvalóbb „anti-ENA pozitívítás” helyett

SLE	Betegség	PSS	SS
Betegek száma	6	5	80
Férfi/nő arány	1/5	0/5	12/68
Életkor (medián)	55	53	36
Aktív	4	2	27
Inaktív	2	3	53
ENA+	4	4	49
ENA-	2	1	31
ANA+	4	3	47
ANA-	2	2	34
anti-DNS+	2	2	50
anti-DNS-	4	3	30

I. táblázat. A betegek megoszlása

ségben (MCTD-ben) szenvedő beteg széruma szolgált. Vizsgáltuk továbbá 6 progresszív szisztémás sclerosisban (PSS-ben) és 5 Sjögren syndromában (SS-ben) szenvedő beteg szérumát is. Valamennyi beteg diagnózisát az ARA kritériumok alapján [7, 8, 9, 10] állapítottuk meg.

A szérum minták ANA, ENA- és anti-DNS-antitest tartalmát határoztuk meg. Az ANA-t patkánymáj kriosztát met-szetén vizsgáltuk, részleteit illetően utalunk korábbi közleményeinkre [11,12]. Az anti-DNS-antitesteket szilárd fázisú enzim-immunoesszé (EIA) módszerrel határoztuk meg, a korábban leírtak alapján [13]. A szérumok ENA elleni antitest szintjét szilárd fázisú EIA módszerrel határoztuk meg *Mattioli és Reichlin* [4], illetve *Kávai és mtsai* [5] módszere alapján. Röviden: antigénként borjú thymus ultrahanggal homogenizált kivonatát használtuk. A microtiter lemezeket (Greiner), a thymus kivonat megfelelő hígításával vontuk be (szárazanyagtartalom: 3 µg/lyuk), Tween-PBS-sel mostuk, majd 50 µl PBS-BSA oldatot adtunk hozzá az immunglobulinok nonspecifikus kötődésének megakadályozására. A vizsgálandó szérumok 1:40 hígításának µl-ét a lyukakba pipettáztuk, 4 °C-on egy éjszakán át inkubáltuk majd mostuk. Ezután 50 µl 1:2000 hígítású anti-humán-Ig G, -Ig A, -Ig M,; kappa, -lambda (torma peroxidáz) konjugátumot (DAKO, P212) adtunk hozzá és 15 percig 37°C-on inkubáltuk, ismételt mosás után 100 µl ELISA puffert adtunk hozzá és a reakciót 50 µl 8M kénsav oldattal állítottuk le. Az extinkciót 405 és 495 nm-en mértük. Az eredményt kvalitatív módon, pozitív/negatív alapján fejeztük ki, a határértéket ahhoz az extinkciós ponthoz rendeltük az egyes mérésekben, ahol az meghaladta a pozitív kontroll extinkciójának 20%-át. Ezt az értéket előzetesen (immunológiai betegségben biztosan nem szenvedő) kontrollsavók vizsgálatkor állapítottuk meg. (A savókat 1:40 hígításban alkalmaztuk – hígítás mértékét korábbi vizsgálatokkal állapítottuk meg – fly módon a minta és kontrollsavó esetén is megfelelő érzékenységi tartományban mértük a koncentráció vs. extinkció meghatározásánál. Vizsgálataink nem standardizált – de minden tesztben azonos – pozitív kontroll értékein alapulnak.)

Az SLE-s betegek anamnézisének analizálva, a betegeket az alábbi kritériumok megléte, ill. hiánya alapján csoportosítottuk:

1. arthritus
2. bőrtünetek (discoid, livedo, vespertilio és fix urticariform vasculitis)
3. kétfázisú Raynaud tünet
4. serositis (pleuritis és/vagy pericarditis)

Klinikai kép	ENA+	ENA-	Összesen
Arthritus	38	24	62
Bőrtünetek	19	7	26
Raynaud	4	5	9
Pleuritis/pericarditis	16	8	24
Glomerulonephritis	24	15	39
Haematológiai eltérések	10	7	17
Thrombosis/embolisatio	4	1	5
Idegrendszeri involvatio	2	4	6
Összesen	49	31	80

II. táblázat. Az SLE-s betegek megoszlása a tünetek/szerv involvatio szerint

5. glomerulonephritis
  6. haematológiai eltérések (haemolysis, leukopenia, thrombocytopenia)
  7. vénás vagy artériás thrombosis
  8. központi idegrendszeri involvatio.
- Statisztikai analízishez a chi négyzet teszt Yates korrekcióját alkalmaztuk.

## Eredmények

A betegek megoszlását az I. táblázat szemlélteti. Az öt SS-s beteg közül négy volt ENA pozitív, ami arra utal, hogy a teszt az SS-B és kis specificitással az SS-A antigének elleni antitesteket is kimutatja. A 6 PSS-s beteg közül 4 volt pozitív, ami egyúttal arra is utalhat, hogy a teszt – a nRNP specificitás mellett – PSS-re jellemző autoantitesteket, elsősorban Scl-70-et is kimutat [3]. A II. táblázatban a kritériumok alapján csoportosított SLE-s betegek megoszlása látható. Bár az ENA pozitívitas lényegesen gyakrabban fordult elő a bőrtünetekkel (is) járó esetekben, valamint az – antiphospholipid syndromára visszavezethető – thrombosisos betegekben, egyik esetben sem tekinthető a különbség szignifikánsnak. Sem az ANA, sem az anti-DNS pozitívitas, sem a klinikai aktivitás nem volt korrelációban az ENA pozitívitasal. Harmincnégy beteg ANA negatív volt a vizsgálat idején (korábban, aktív stádiumban ezek csaknem mindegyike ANA pozitív volt), ezek között 18 beteg anti-DNS szintje volt kóros – 16 beteg esetében viszont mind az anti-DNS, mind az ANA teszt negatív volt (III. táblázat). A 16 ANA-negatív, anti-DNS-negatív SLE-s beteg mindegyike klinikailag inaktív stádiumban volt és közülük 8 volt ENA pozitív. Az ENA pozitív és negatív esetek klinikai képe ebben a csoportban sem különbözött egymástól (IV. táblázat).

## Megbeszélés

Az egyes ENA csoportba tartozó antitestek közül az anti-Sm gyakorlatilag csak SLE-ben fordul elő, ezért az ARA diagnosztikai kritériumai között is szerepel [7], az antitest előfordulása azonban nem gyakori, csak

Csoport	Összesen
1 ANA (-), anti-DNS (+)	18
2 ANA (-), anti-DNS (-)	16
1/a ANA (-), anti-DNS (+), ENA (+)	11
1/b ANA (-), anti-DNS (+), ENA (-)	7
2/a ANA (-), anti-DNS (-), ENA (+)	8
2/b ANA (-), anti-DNS (-), ENA (-)	8
Összesen (1+2)	34

III. táblázat. Az ANA negatív SLE-s betegek megoszlása

Klinikai kép	ENA +	ENA -	Összesen
Arthritis	6	6	12
Bőrtünetek	3	3	6
Raynaud	0	0	0
Pleuritis/pericarditis	5	1	6
Glomerulonephritis	3	5	8
Haematológiai eltérések	2	3	5
Thrombosis/embolisatio	2	2	4
Idegrendszeri involvatio	0	1	1

IV. táblázat. Az ANA negatív, anti-DNS negatív SLE-s betegek megoszlása a tünetek/szerv involvatio szerint

mintegy 10–15% [3] tehető. Az anti-SS-A (Ro) és az -SS-B (La) igen gyakran mutatható ki SS-ban, ezért az újabb ARA kritériumok között már szerepel is [10]. Az anti-SS-A (Ro) kongenitális lupusban és subacut cutan lupus erythematosusban (SCLE) jellemzőnek tartott antitest. Vegyes SLE-s beteganyagon az előfordulás gyakorisága 25 [15] és 52% [14] között váltakozik. Az anti-SS-B (La) ritkábban fordul elő: 19% [15]. A nRNP-antitest szintén gyakori, 32 [3] és 48% [14] között figyelhető meg. Az anti-U1-n RNP antitestek előfordulása is alacsony: 13% [15]. *Cervera és mtsai* [15] az ANA, anti-DNS és a különféle anti-ENA és anti-SS-A, -SS-B vizsgálatok adatai alapján az SLE-s betegeket homogén alcsoportokra tudták osztani. Az anti-SS-A és SS-B antitesteket elsősorban a bőr-manifestációkkal, arthritissel és thrombosisal járó esetekben észlelték, az anti-U1-n RNP gyakoribb volt a Raynaud tünetekkel járó formákban, míg az anti-Sm az orális ulceratioval járó formákban volt gyakoribb.

N. B. bár az egyes csoportok között a különbségek erősen szignifikánsak – a hatalmas beteganyag (1000 SLE-s beteg!) miatt –, valójában az egyes pozitív és negatív csoportok között a különbségek nem nagyok (pl. az arthritis vonatkozásában az anti-SS-B pozitív, ill. negatív gyakorisága 92 versus 81%,  $p = 0,001$ ). *Swaak és mtsai* [14] az anti-Sm pozitív SLE-s betegek között szignifikánsan gyakrabban észlelték bőrtüneteket, illetve myocarditist, ez utóbbi egyébként gyakoribb volt a n RNP pozitív esetekben is; az anti SS-A és -SS-B antitest pozitív alapján azonban a betegek között különbséget nem láttak. A különféle antitest vizsgálatok diagnosztikai és prognosztikai értékéről egyébként megoszlanak a vélemények.

Az anti-n RNP antitest pozitívitás és az anti-DNS pozitívitás között *Sulcebe és mtsai* [16] kapcsolatot észleltek; az ENA pozitív –, anti-DNS pozitív betegek között gyakoribb volt a veseinvolvatio is. Ugyanakkor mások ezt az összefüggést nem találták [17]. *Lullit és mtsai* [18] az SLE-s betegek ENA pozitívitásának HLA-asszociációját írták le. A primer (tehát nem SLE-vel asszociált) antifoszfolipid szindrómában – az ENA pozitívitás gyakorlatilag nem fordul elő [19].

Valószínű, hogy lényegesen nagyobb SLE-s beteganyagon ezzel a *szűrővizsgálattal*, a definiált ENA antitest vizsgálatok egyidejű elvégzése nélkül is sikerülne bizonyos alcsoportokat elkülöníteni. Ennek azonban egy-egy betegre vetítve vajmi kevés a *prognosztikai jelentősége*. SLE-re gyanús esetekben, kivált, ha ANA pozitívítást nem észlelünk, az ENA antitest *szűrővizsgálat* indokolt lehet, de jobb eleve konkrét vizsgálatot (tehát anti-Sm-et, stb) végezni.

Megállapítható, hogy az ENA antitestek ily módon történő meghatározása más betegségekben, elsősorban SS-ben, PSS bizonyos eseteiben és MCTD-ben alkalmas *szűrővizsgálatra*, az SLE-ben azonban – szemben az irodalomban javasoltakkal [20] – az értéke csekély. Az ANA negatív, anti-DNS negatív de SLE-szerű esetekben valószínűleg érdemes *elsőnek* elvégezni, majd definiált ENA vizsgálat (anti-Sm, -n RNP, -SS-A és -SSB) végzése javasolt (SS alapos gyanúja esetén azonban célszerű eleve anti-SS-A, ill. SS-B vizsgálatot végezni). Kétségtelen probléma, hogy az egyes vizsgálatok standardizálhatósága még sok kívánnivalót hagy maga után [21].

Összefoglalva: az általunk is alkalmazott ENA antitest szűrővizsgálatok SLE-ben némi diagnosztikai értékkel bírnak, az eredményből a prognózisra következtetni azonban nem lehet. A korábban említett, megfelelően standardizált specifikusabb vizsgálatok – habár sokkal költségesebbek ilyen célokra alkalmasabbak.

#### Köszönetnyilvánítás

A vizsgálatok az OTKA (2612 „D”) és részben az ETT (T-214) támogatásával készültek.

#### Irodalomjegyzék

- [1] Tan, E. M. Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv Immunol*, 1989, 44, 93-126.
- [2] Sharp, G. C., Irwin, W. S., Tan, E.M. et al: Mixed connective tissue disease – An apparently distinct rheumatic disease syndrome associated with a specific antibody to an extractable nuclear antigen (ENA). *Am J Med*, 1972, 52, 148-159.
- [3] Tan, E.M. Antibody markers in systemic autoimmunity. Ciba-Geigy, Summit, New Jersey, 1992, pp. 1-57.
- [4] Mattioli, M., Reichlin, M.: Characterization of a soluble nuclear ribonucleoprotein antigen reactive with SLE sera. *J Immunol* 1971, 107, 1281-1290

- [5] Kávai, M., Zsindely, A., Seres, T., Szegedi, Gy.: Quantitation of antibodies to ENA with an ELISA on polystyrene plates precoated with mBSA. *Scand J Rheumatol Suppl* 1985, 56, 72-74
- [6] Seres, T., Kávai, M., Zsindely, A., Szegedi, Gy.: Quantitation of anti-ENA antibodies by a modified ELISA in patients with SLE and MCTD. *Scand J Rheumatol. Suppl.* 1985, 56, 75-77
- [7] Tan, E.M., Cohen, A. S., Fries, J. F. et al.: The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus (SLE). *Arthritis Rheum*, 1982, 25, 1271-1277.
- [8] Arnett, F.C., Edworthy, S., Block, D.A. et al: The 1987 revised ARA criteria for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 1987, 30, S17.
- [9] Masi, A.T., Rodman, G.P., Medsger, T. A.Jr et al: Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum*, 1980, 23, 581-590.
- [10] Vitali, C., Bombardieri, S., Moutsopoulos, H.M. et al: Preliminary criteria for the classification of Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum*, 1993, 36, 340-347.
- [11] Gergely, P.: Immunológiai vizsgálatok szisztémás lupus erythematosusban. *Orv Hetil*, 1981, 122, 2141-2144.
- [12] Phi, N.C., Vien, C.V., Fehér, J., Gergely, P.: Correlation between the levels of antinuclear antibodies, anti-DNA antibodies, and complement in systemic lupus erythematosus. *Acta Med Hung*, 1988, 45, 145-159.
- [13] Reul, R., Kádár, J., Bodó, I., Gergely, P.: Anticardiolipin antibodies: Association with anti-DNA antibodies, disease activity, renal involvement and a history of thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Acta Med. Hung*, 1992/93, 49, 201-205.
- [14] Swaak, A. J. G., Huysen, V., Smeenk, R. J. T.: Antinuclear antibodies in routine analysis: the relevance of putative clinical association. *Ann Rheum Dis*, 1993, 52, 110-114.
- [15] Cervera, R., Khamashta, M.A., 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 (Baltimore)*, 1993, 72, 113-124
- [16] Sulcbe, G., Morcka, K.: Diagnostic and prognostic significance of different antinuclear antibodies in more than 1000 consecutive Albanian patients with rheumatic diseases. *Clin Exp Rheumatol*, 1992, 10, 255- 261.
- [17] Houssiau, F.A., D'Cruz, D., Vianna, J., Hughes, G.R.: Lupus nephritis: the significance of serological tests at the time of biopsy. *Clin Exp Rheumatol*, 1991, 9, 345-349
- [18] Lulli, P., Sebastiani, G.D., Trabace, S. et al: HLA antigens in Italian patients with systemic lupus erythematosus: evidence for the association of D Qw2 with the autoantibody response to extractable nuclear antigens. *Clin Exp Rheumatol* 1991, 9, 475-479.
- [19] Asherson, R.A., Khamashta, M. A., Ordi-Ros, J. et al: The „primary” antiphospholipid syndrome: major clinical and serological features. *Medicine (Baltimore)*, 1989, 68, 366-374.
- [20] Depiante-Depaoli, M., Galmarini, M., Pesoa, S.A., Riera, C.M.: Comparison of tanned cell hemagglutination and counter immunoelectrophoresis test in the detection of antibodies to extractable nuclear antigens (ENA) and to DNA in the systemic lupus erythematosus. *Ann Biol Clin Paris*, 1989, 47, 247-251.
- [21] van Venrooij, W.J., Charles, P., Maini, R.N.: The consensus workshops for the detection of autoantibodies to intracellular antigens in rheumatic diseases. *J Immunol Methods*, 1991, 140, 181-189.

Levelezés: Gergely Péter dr. SOTE II. Belklinika, 1046 Budapest, Szentkirályi u 46

*„Sose kérdezd, kiért szól a harang: érted szól.”  
(John Donne)*