

Katarzyna Fischer¹, Iwona Brzosko¹, Marek Brzosko²¹Samodzielna Pracownia Diagnostyki Reumatologicznej, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie²Klinika Reumatologii i Chorób Wewnętrznych, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Autoprzeciwciała w praktyce reumatologicznej

Autoantibodies in rheumatology practice

STRESZCZENIE

Dziś autoprzeciwciała wykorzystywane są bardzo powszechnie w codziennej praktyce reumatologicznej. Są pomocne dla postawienia rozpoznania, szczególnie we wczesnej fazie choroby, przy skąpej manifestacji klinicznej, bądź kiedy chory prezentuje nietypowy obraz kliniczny. Niekiedy stosuje się je także do monitorowania aktywności procesu chorobowego i oceny prognozy. Należy jednak pamiętać, że ze względu na ograniczenia metodyczne i brak standaryzacji badań ewaluacyjnych, autoprzeciwciała winny być traktowane tylko jako narzędzie pomocnicze w procesie diagnostyki chorób reumatycznych,

a nie złoty standard diagnostyczny. W pracy dyskutowane są zagadnienia związane z zaburzeniami immunologicznymi leżącymi u podstaw patogenezy chorób autoimmunizacyjnych, szczególnymi cechami diagnostyki serologicznej, znaczeniem klinicznym wybranych autoprzeciwciał z uwzględnieniem odrębności diagnostycznych wieku dziecięcego, postępowaniem w standaryzacji metod i wyzwaniami na przyszłość, których realizacja przyczyni się do optymalizacji diagnostyki autoprzeciwciał w praktyce klinicznej.

Forum Reumatol. 2016, tom 2, nr 1, 39–50

Słowa kluczowe: autoprzeciwciała; autoimmunizacja; diagnostyka serologiczna; układowe choroby tkanki łącznej

WSTĘP

Choroby autoimmunizacyjne są niezwykle heterogenne zarówno w odniesieniu do częstości występowania, objawów klinicznych, jak i patogenezy. Ocenia się, że ogółem dotyczą około 5% światowej populacji, a liczba zachorowań wzrasta. Uwzględniając płeć, problem ten dotyczy 3,0% mężczyzn i 7,1% kobiet. Zdefiniowano ponad 80 jednostek chorobowych, których prevalencja waha się od 1% do < 1/10⁶. Szczyt zachorowań przeważnie przypada między 40. a 50. rokiem życia. Choroby te zwykle cechują się przewlekłym przebiegiem z okresami zaostrzeń i remisji, prowadząc, w najbardziej dramatycznych przypadkach, do trwałego inwalidztwa, a nawet śmierci [1].

Autoimmunizacja jest definiowana jako odpowiedź immunologiczna przeciw własnemu antygenowi lub antygenom. Odpowiedzi auto-

immunizacyjne mogą pojawiać się, nie wywołując choroby albo w chorobach wywołanych innymi mechanizmami i zwykle, dzięki zjawisku autotolerancji, nie prowadzą do rozwoju choroby autoimmunizacyjnej. Do mechanizmów zapewniających tolerancję na własne antygeny należą tolerancja centralna, czyli eliminacja w procesie apoptozy limfocytów T autoreaktywnych podczas ich dojrzewania w grasicy oraz tolerancja obwodowa, której zadaniem jest niedopuszczenie do aktywacji autoreaktywnych limfocytów T, które pokonały barierę centralnych narządów limfatycznych [2].

Do przełamania tolerancji własnej organizmu może dojść na skutek różnych mechanizmów:

— molekularnej mimikry, w której antygeny patogenu inicjują odpowiedź immunologiczną i dochodzi do krzyżowych reakcji z antygenami gospodarza;

Adres do korespondencji:
dr n. med. Katarzyna Fischer
Samodzielna Pracownia Diagnostyki Reumatologicznej
Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie
tel.: 91 425 33 43, faks 91 425 33 44
e-mail:
katarzyna.fischer11@gmail.com

- uwolnienia ukrytych antygenów (np. w wyniku uszkodzenia), gdy antygeny pierwotnie ukryte przed układem immunologicznym, mogą inicjować reakcje autoimmunizacyjne;
- działania autoreaktywnych limfocytów T (tzw. *T-cell bypass*), które z reguły są usuwane we wspomnianych wyżej mechanizmach tolerancji centralnej i obwodowej, jednak pojawienie się zmienionych antygenów (infekcje, leki, promieniowanie ultrafioletowe) powoduje aktywację nowych autoreaktywnych komórek;
- zaburzenia równowagi cytokinowej (cytokiny stanowią istotne mediatory odpowiedzi immunologicznej) skutkujące dysregulacją układu immunologicznego [2].

Rozpoznanie choroby autoimmunizacyjnej wiąże się ze spełnieniem co najmniej dwóch z poniższych kryteriów:

- swoista nabyta odpowiedź immunologiczna skierowana jest przeciw zajętemu narządowi lub tkance;
- autoreaktywne limfocyty T i/lub autoprzeciwiactwa obecne są w zajętej tkance lub narządzie;
- transfer autoreaktywnych limfocytów T i/lub autoprzeciwiactwa do zdrowego osobnika lub zwierzęcia inicjuje rozwój choroby;
- wykazanie na modelach zwierzęcych, że immunizacja autoantygenem indukuje chorobę,
- eliminacja lub supresja odpowiedzi autoimmunizacyjnej hamuje progresję choroby lub prowadzi do poprawy klinicznej [3].

Jak się obecnie uważa choroby autoimmunizacyjne są wynikiem wzajemnych interakcji pomiędzy czynnikami wywołującymi (zwłaszcza czynnikami środowiskowymi, w tym zakażeniami), dziedziczeniem genów uwrażliwiających, autoantygenami, zaburzeniami procesu tolerancji antygenów własnych i mechanizmów apoptozy. Najczęściej dzieli się je na narządowo swoiste (autoprzeciwiactwa reagują z antygenami swoistymi tylko dla określonej tkanki) i układowe (autoprzeciwiactwa reagują z antygenami powszechnie występującymi w organizmie), do których należą układowe choroby tkanki łącznej [2].

CO CZYNI DIAGNOSTYKĘ SEROLOGICZNA UNIKATOWĄ

Diagnostyka serologiczna opierająca się na detekcji autoprzeciwiactwa nie może być porównywana z żadną inną dziedziną medycyny laboratoryjnej. O jej unikatowości decyduje

biologiczna heterogenność odpowiedzi immunologicznej, szerokie spektrum autoantygenów cechujące jedną chorobę, mnogość czynników interferujących w testach laboratoryjnych i wpływająca na ekspresję autoprzeciwiactwa, bardzo istotna odwrotna zależność między swoistością a czułością diagnostyczną czy możliwość wykrycia autoprzeciwiactwa przed manifestacją kliniczną choroby [4].

HETEROGENNOŚĆ ODPOWIEDZI IMMUNOLOGICZNEJ

Odpowiedź autoimmunizacyjna cechuje się zmiennością i u osób, u których rozpoznano tę samą chorobę można obserwować różne izotypy autoprzeciwiactwa, różnice mogą także dotyczyć ich powinowactwa i awidności (zachłanności, czyli siły wiązania antygeny przez przeciwiactwa) czy wewnątrz- i międzykomórkowego rozmieszczenia oraz swoistości epitopów [4]. Sięgając do wybranych przykładów, heterogenność przeciwiactwa przeciw dwuniciowemu DNA (anty-dsDNA, *anti-double stranded DNA antibodies*), stanowiących podstawowy marker serologiczny toczenia rumieniowatego układowego (TRU), przejawia się w zdolności do krzyżowej reaktywności z różnymi białkami. Ich krzyżowa reaktywność z α -aktyniną stanowi jeden z patomechanizmów nefropatii toczniowej [5], a z receptorem NMDA (*N-methyl-D-aspartate receptor*) może indukować zaburzenia neuropsychiatryczne, takie jak depresja czy zaburzenia czynności poznawczych [6]. Natomiast krzyżowe reakcje między czynnikiem reumatoidalnym (RF, *rheumatoid factor*) a antygenem kardiolipinowym prowadzą do fałszywie dodatnich wyników uzyskanych dla przeciwiactwa antykardiolipinowych (aCL, *anticardiolipin antibodies*) w klasie IgM [7]. Heterogenność może także dotyczyć rozpoznawania przez autoprzeciwiactwa różnie zmodyfikowanych form antygenów. Reakcja z apoptotycznie lub oksydatywnie zmodyfikowaną formą U1-70 kDa wiąże się z różną manifestacją kliniczną [8]. Różne rozmieszczenie epitopów, wewnątrz- lub międzykomórkowo, może mieć swoje konsekwencje diagnostyczne. Większość przeciwiactwa przeciwcentromerowych (ACA, *anti-centromere antibodies*) reaguje z centromerowym białkiem B (CENP-B), jednak w niewielkim odsetku stwierdza się reaktywność wyłącznie w stosunku do białka A (CENP-A). Jeżeli zatem zostaną zastosowane testy oparte tylko na CENP-B to uzyskuje się w tych przypadkach wynik ujemny [4].

ZMIENNOŚĆ ETNICZNA

Nie od dziś wiadomo, że ekspresja autoprzeciwciał podlega także zmienności etnicznej. U chorych na twardzinę układową (TU) rasy kaukaskiej częściej stwierdza się ACA, a u Afroamerykanów — przeciwciała reagujące z topoizomerazą czy fibrylaryną [9]. Podobnie u Afroamerykanów, Afrokaraibów i mieszkańców Afryki Południowej rasy czarnej istotnie częściej występują przeciwciała reagujące z antygenem Sm (przeciwciała ujęte w kryteriach klasyfikacyjnych TRU) w porównaniu z rasą kaukaską [10]. Z drugiej strony, różnice etniczne mogą zaznaczyć się w immunologicznie podobnych grupach. Przeciwciała reagujące z antygenem Ku u Japończyków wiążą się z zespołami nakładania TU i zapalenia wielomięśniowego (PM, *polymyositis*) lub TU/PM/TRU. Natomiast u Afroamerykanów istnieje ścisły związek z TRU [4].

CZUŁOŚĆ I SWOISTOŚĆ DIAGNOSTYCZNA AUTOPRZECIWCIAŁ

Diagnostykę autoprzeciwciał cechuje ścisła odwrotna zależność między czułością i swoistością. Dlatego międzynarodowe rekomendacje dotyczące detekcji różnych autoprzeciwciał często oparte są na co najmniej dwuetapowej strategii diagnostycznej. W przypadku przeciwciał przeciwjądrowych (ANA, *anti-nuclear antibodies*) najpierw stosuje się test przesiewowy z użyciem metody immunofluorescencji pośredniej i linii komórkowej HEP-2 jako substratu [11]. Cechą testu przesiewowego winna być duża czułość (co istotnie zmniejsza jego swoistość, czyli zwiększa się liczba wyników fałszywie dodatnich — uzyskuje się wyniki dodatnie również u osób bez objawów choroby reumatycznej). W drugim etapie przeprowadza się test potwierdzenia, który powinna cechować duża swoistość (potwierdzenie obecności autoprzeciwciał ściśle związanych z wybranymi układowymi chorobami tkanki łącznej, ale też większy odsetek wyników fałszywie ujemnych). Zgodnie z ogólną zasadą, że im większe miano autoprzeciwciał, tym większa swoistość diagnostyczna, zaleca się, aby miana dzielić na przedziały, co ma ułatwić wstępną interpretację wyniku [4]. W przypadku ANA proponuje się następujący podział: 1:40–1:80 — graniczne/słabo dodatnie, 1:160–1:640 — średnio dodatnie, $\geq 1:1280$ — wysoko dodatnie [12]. Za miana istotne klinicznie u dorosłych uważa się $\geq 1:160$, a u dzieci $\geq 1:40$ [11].

WARTOŚĆ PREDYKCYJNA AUTOPRZECIWCIAŁ

Choroby autoimmunizacyjne cechują się złożoną naturą. Zwykle poprzedza je faza subkliniczna, kiedy dochodzi do dysregulacji układu immunologicznego. Nie obserwuje się jeszcze objawów narządowych, ale można wykryć obecność wybranych wskaźników serologicznych. Po upływie miesięcy, a częściej lat, dochodzi do przełamania tolerancji własnej organizmu i przy udziale różnych mechanizmów, opisanych wyżej, dochodzi do rozwoju manifestacji klinicznych. Na podstawie badań przeprowadzonych u amerykańskich żołnierzy, u których po latach rozpoznano TRU, pokazano, że już na 10 lat przed pojawieniem się pierwszych objawów obecne były ANA i autoprzeciwciała reagujące z antygenem Ro (anty-Ro) u 78% i 47% odpowiednio. U 55% badanych na 2,5 roku przed postawieniem rozpoznania można było stwierdzić anty-dsDNA, podczas gdy autoprzeciwciała reagujące z RNP czy anty-Sm pojawiały się na kilka miesięcy przed początkiem choroby. Co ciekawe, po postawieniu diagnozy pojawienie się nowych autoprzeciwciał odnotowywano niezwykle rzadko. U pewnego odsetka osób z grupy kontrolnej natomiast stwierdzano jedynie obecność ANA i anty-Ro. Zatem dodatni wynik autoprzeciwciał charakterystycznych dla TRU odznaczał się dużą czułością i swoistością dla późniejszego rozpoznania choroby [13]. Dodatnia wartość predycyjna autoprzeciwciał staje się coraz istotniejsza w obliczu współczesnych, innowacyjnych terapii, możliwości postawienia rozpoznania na jak najwcześniejszym etapie choroby, czy przy skąpych lub nietypowych objawach klinicznych [4].

JAK ZLECAĆ I INTERPRETOWAĆ WYNIKI BADAŃ SEROLOGICZNYCH W REUMATOLOGII NA PRZYKŁADZIE PRZECIWCIAŁ PRZECIWIĄDROWYCH

Istnieje kilka zasad, którymi należy się kierować, planując diagnostykę serologiczną układowych chorób tkanki łącznej:

- obecność autoprzeciwciała może być patognomoniczna dla danej choroby;
- miano autoprzeciwciała koreluje z aktywnością choroby;
- obecność autoprzeciwciała wiąże się z określonymi objawami klinicznymi;
- autoprzeciwciała ma znaczenie rokownicze [14].

American College of Rheumatology (ACR) opublikował szablon zawierający przesłanki, które należy uwzględnić analizując przydatność kliniczną parametrów laboratoryjnych. Po zdefiniowaniu i uwzględnieniu aspektów metodologicznych należy przede wszystkim określić do jakich celów test ma być stosowany: ustalenie rozpoznania, ocena prognozy czy długoterminowe monitorowanie [15]. Formułowanie tego typu wytycznych przez gremia opiniodawcze ma sprzyjać racjonalizacji diagnostyki serologicznej i stanowić pomoc dla reumatologów we właściwym doborze testów laboratoryjnych, zależnie od ich przeznaczenia.

Pomimo coraz doskonalszych narzędzi diagnostyki laboratoryjnej i lepszego poznania patogenetyki układowych chorób tkanki łącznej, autoprzeciwciała nadal winny być uważane jedynie za markery choroby i stanowić część złożonego panelu diagnostycznego, a nie być złotym standardem diagnostycznym (wynik dodatni nie zawsze potwierdza, a ujemny wyklucza chorobę) [2]. Idąc dalej za rozważaniami Sheldon [2] i uwzględniając omówione wcześniej wybrane cechy diagnostyki serologicznej, można sformułować kilka praktycznych wskazań:

- żaden z testów nie jest doskonały wiele z nich nie prezentuje zadowalającej czułości i swoistości diagnostycznej;
- należy zapoznać się z laboratorium, do którego zleca się badania z jednej strony by mieć wiedzę, czy podlega wewnętrznym i zewnętrznym sprawdzianom jakości, czy przeprowadza procedury oznaczania autoprzeciwciała zgodnie z międzynarodowymi rekomendacjami itp., a z drugiej by nawiązać współpracę klinicysta–diagnosta laboratoryjny, niezbędną dla optymalnego procesu diagnostycznego;
- nie należy spodziewać się, że wyniki będą wymienne między laboratoriami, choćby ze względu na stosowanie różnych metod, co gorsza, nawet jeśli stosowane są te same metody, wyniki uzyskane w różnych laboratoriach mogą być istotnie odmienne;
- jeżeli wynik badania nie jest zgodny z oceną kliniczną, należy zlecić powtórny analizę, najlepiej z użyciem innej metody, głównie aby wykluczyć/potwierdzić ryzyko interferencji (m.in. substancje endogenne, leki, przeciwciała heterofilowe czy wspomniana krzyżowa reaktywność);
- jeżeli powtórny wynik nadal budzi wątpliwości, należy oznaczenie wykonać w świeżo pobranej próbce (ze względów omówionych wyżej);

— należy upewnić się, że zlecając testy laboratoryjne zadajemy konkretne, celowane pytanie i że testy, które zleciłimy są w stanie na to pytanie odpowiedzieć [2].

Ostatni punkt wydaje się być kluczowy — badania laboratoryjne, a zwłaszcza ocenę autoprzeciwciała, należy zlecać wyłącznie ze wskazań klinicznych [16]. Jako przykład postuży badanie ANA, bodaj najczęściej wykonywane w praktyce reumatologicznej. Przeciwciała przeciwjądrowe często wykrywa się w zdrowej populacji, w niskim mianie 1:40 nawet u 31,7%, a także w przebiegu ciąży, infekcji, chorób nowotworowych, autoimmunizacyjnych chorób narządowo swoistych (np. autoimmunologicznego zapalenia tarczycy czy wątroby) [17]. Zatem czułość i swoistość ANA jest zdeterminowana przyjętą wartością odcięcia dla miana autoprzeciwciała oraz wstępną oceną kliniczną, popartą danymi z wywiadu i badaniem fizykalnym, sugerującymi układową chorobę tkanki łącznej. Jednym z najczęstszych błędów jest zlecenie tego badania przy braku lub niewielu przesłankach klinicznych [16].

Na stronie ACR w zakładce „Wybierając mądrze” punkt pierwszy odwołuje się do oceny ANA. Jednoznacznie wskazuje się w nim, aby odstąpić od poszerzania diagnostyki w kierunku autoprzeciwciała swoistych, jak anty-dsDNA czy anty-Sm, jeśli wynik testu przesiewowego był ujemny i brak jest klinicznych przesłanek sugerujących układową chorobę tkanki łącznej. Wyjątek stanowią autoprzeciwciała reagujące z Jo-1 i SS-A, gdyż ekspresja antygeny na komórkach HEp-2 często jest niewystarczająca, co może być przyczyną wyników fałszywie ujemnych. W uzasadnionych przypadkach oceną kliniczną badania należy przeprowadzić przy użyciu innych, bardziej czułych metod [18].

Objawy kliniczne ściśle związane z układowymi chorobami tkanki łącznej, które przede wszystkim powinny być uwzględniane przy zleceniu badania w kierunku obecności ANA, obejmują: objawy ciężkiego zmęczenia (*disabling fatigue*), objaw Raynauda, objawy zapalenia stawów, gorączkę o nieznanym etiologii oraz stosowanie leków związanych z ryzykiem rozwoju toczenia indukowanego lekami (*DIL, drug induced lupus*) [12]. Współzależność prawdopodobieństwa klinicznego (*pre-test probability*) oraz strategii diagnostycznej ANA i prawdopodobieństwa rozpoznania TRU (*post-test probability*, wartość predykcyjna) przedstawiono w tabeli 1. Dane wskazują, że ujemna wartość predykcyjna (wykluczenie choroby) jest większa dla testu przesiewowego

Tabela 1. Prawdopodobieństwo kliniczne i strategia diagnostyczna ANA a prawdopodobieństwo rozpoznania TRU wg Mahler i wsp. [19]

Prawdopodobieństwo kliniczne	Prawdopodobieństwo rozpoznania (wartość predykcyjna)			
	TP (+)	TP (—)	TMS (+)	TMS (—)
Małe — utrata włosów i artralgia	6%	0,08%	19%	0,20%
Średnie — fotowrażliwość, umiarkowana leukopenia	42%	0,80%	72%	3%
Duże ~ fotowrażliwość, typowe zmiany skórne, objawy zapalenia stawów	87%	7%	96%	21%

TP — test przesiewowy, metoda immunofluorescencji pośredniej; TMS — test monospecyficzny (potwierdzenia), (+) — dodatni wynik testu, (—) — ujemny wynik testu

Tabela 2. Znaczenie kliniczne przeciwciał przeciwjądrowych

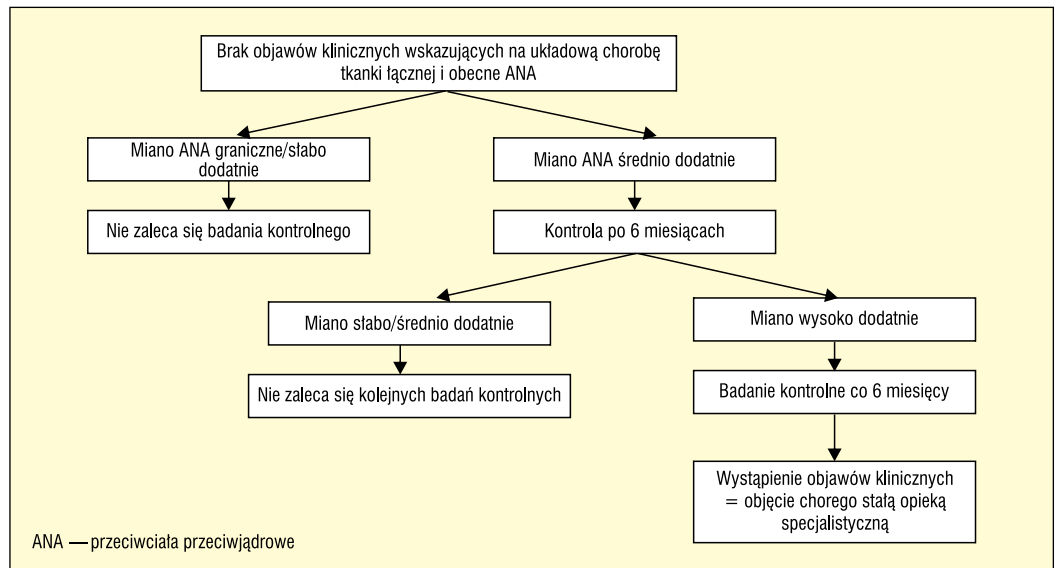
Stan kliniczny	Częstość występowania ANA (%)	Znaczenie kliniczne
Mieszana choroba tkanki łącznej	Okolo 100	Diagnostyczne
Toczeń indukowany lekami	Okolo 100	Diagnostyczne
Toczeń rumieniowaty układowy	95–100	Diagnostyczne
Autoimmunologiczne zapalenie wątroby	40–100	Diagnostyczne
Twardzina układowa	40–80	Diagnostyczne
Zespół Sjögrena	40–96	Diagnostyczne
Zapalenie wielomięśniowe i skórno-mięśniowe	30–80	Diagnostyczne
Pierwotna marskość żółciowa	50–80	Diagnostyczne
Młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów	20–50	Prognostyczne
Objaw Raynauda	20–60	Prognostyczne
Reumatoidalne zapalenie stawów	30–50	Brak
Zespół antyfosfolipidowy	40–70	Brak
Fibromyalgia	15–25	Brak
Toczeń skórny	5–25	Brak
Choroby tarczycy	30–50	Brak
Stwardnienie rozsiane	Okolo 25	Brak
Krewni chorych na układowe choroby tkanki łącznej	5–25	Brak
Choroby nowotworowe	Różna częstość	Brak/znaczenie nieustalone
Choroby infekcyjne	Różna częstość	Brak

w porównaniu z testem potwierdzenia (przestrzeganie dwuetapowej strategii diagnostycznej ANA jest zatem konieczne). Przy skąpych i nieswoistych przesłankach klinicznych (małe i średnie prawdopodobieństwo kliniczne) niewykrycie ANA zmniejsza szansę na postawienie diagnozy TRU < 1%. Natomiast potwierdzenie obecności autoprzeciwciał swoistych dla choroby, zwłaszcza przy obecności charakterystycznych objawów, zwiększa prawdopodobieństwo rozpoznania TRU do 96% [19]. Znaczenie ANA w różnych stanach klinicznych podsumowano w tabeli 2.

A jak postępować kiedy stwierdzi się obecność ANA u osoby bezobjawowej? Otóż możliwe scenariusze kliniczne, determinujące ewentualne przeprowadzenie badań dodatko-

wych i dalsze postępowanie kliniczne, ściśle wiążą się z mianem ANA (ryc. 1):

- brak typowych objawów klinicznych i ANA w małym mianie. Nie zaleca się powtarzania testu ani badania kontrolnego (ponad 11-letnie obserwacje wykazały, że jedynie ok. 10% osób rozwija chorobę autoimmunizacyjną, a wyniki oznaczeń ANA u większości nie zmieniają się na przestrzeni lat, nie wpływając tym samym na postępowanie kliniczne);
- brak typowych objawów klinicznych i ANA w średnim mianie. Zaleca się powtórzenie testu po 6 miesiącach. Jeśli utrzymuje się średnie lub małe miano autoprzeciwciał i nadal nie stwierdza się objawów klinicznych, nie ma konieczności przeprowadza-



Rycina 1. Schemat postępowania u osoby bez objawów choroby reumatycznej, u której wykazano obecność przeciwciał przeciwjądrowych

- nia dalszych badań. Jeśli natomiast miano ANA w kolejnym badaniu zwiększa się przy dalszym braku objawów, badanie kontrolne powinno powtarzać się np. co 6 miesięcy (ze względu na dodatnią wartość predykcijną autoprzeciwciał i wspomnianą większą swoistość diagnostyczną autoprzeciwciał występujących w dużym mianie);
- obecność typowych objawów i dodatni test na obecność ANA wiążą się oczywiście z koniecznością przeprowadzenia badań dodatkowych i objęcia chorego stałą opieką specjalistyczną [12].

INNE BADANIA SPECJALISTYCZNE

W codziennej praktyce reumatologicznej, poza ANA, wykorzystuje się szerszy arsenał parametrów immunologicznych. Należą do nich między innymi przeciwciała przeciw cytoplazmie granulocytów obojętnochłonnych (ANCA, *anti-neutrophil cytoplasmic antibodies*), przeciw cyklicznemu cytrulinowanemu peptydowi (anty-CCP, *anti-cyclic citrullinated peptide antibodies*) i przeciwfosfolipidowe (aPL, *anti-phospholipid antibodies*).

PRZECIWCIAŁA PRZECIW CYTOPLAZMIE GRANULOCYTÓW OBOJĘTNOCHŁONNYCH

Przeciwciała ANCA są markerem serologicznym układowych zapaleń naczyń. Do zapaleń naczyń związanych z ANCA zalicza się ziarniniakowość z zapaleniem naczyń, mikroskopowe zapalenie naczyń oraz eozynofilową ziarniniakowość z zapaleniem naczyń.

Ponadto, w nowej klasyfikacji zapaleń naczyń opublikowanej w 2013 roku [20] zaznacza się, że przeciwciała te mogą być również wykorzystane do różnicowania guzkowego zapalenia tętnic (PAN, *polyarteritis nodosa*) z zapaleniami naczyń związanymi z ANCA. W przebiegu PAN nie stwierdza się obecności ANCA. Jest to ważna cecha różnicująca, gdyż w przypadku zajęcia małych i średnich tętnic, przebieg kliniczny obu wymienionych typów martwiczych zapaleń naczyń może być bardzo podobny [20].

W przypadku ANCA również stosuje się dwuetapową strategię diagnostyczną opartą na teście przesiewowym z użyciem granulocytów utrwalonych etanolem oraz formaliną i monoswoisty test potwierdzenia. W badaniu przesiewowym można wyróżnić 4 typy świecenia: cytoplazmatyczny (C-ANCA), okołojądrowy (P-ANCA), cytoplazmatyczny atypowy (C-ANCA atypowe) i atypowy (A-ANCA) [21]. Najważniejszymi antygenami docelowymi są dla C-ANCA — proteinaza 3 (PR3), dla P-ANCA — mieloperoksydaza (MPO). Swoistość testów dla zapaleń naczyń wynosi dla C-ANCA 95%, P-ANCA 80%, anty-PR3 90% i anty-MPO 90%.

Pamiętać należy, że przeciwciała te, zwłaszcza P-ANCA, z różną częstością mogą występować u bezobjawowych osób (szczególnie w starszym wieku), w przebiegu zapalnych chorób jelit, autoimmunologicznych chorób wątroby, innych układowych chorób tkanki łącznej, infekcji, chorób nowotworowych, u osób uzależnionych od kokainy, w mukowi-

Tabela 3. Zmodyfikowane laboratoryjne kryteria kwalifikacyjne zespołu antyfosfolipidowego (Sydney 2004) [25]

Kryteria laboratoryjne
Antykoagulant tocznia obecny w osoczu, wykryty ≥ 2 -krotnie w odstępach ≥ 12 tygodni metodami ustalonymi przez Międzynarodowe Towarzystwo Zakrzepicy i Hemostazy
Przeciwciała antykardiolipinowe w klasie IgG (GPL) i/lub IgM (MPL) obecne w surowicy lub osoczu w średnim lub dużym stężeniu (> 40 GPL lub MPL albo > 99 percentyla) stwierdzone minimum 2-krotnie w odstępie ≥ 12 tygodni, pomiar z użyciem standaryzowanego testu ELISA
Obecność przeciwciał przeciw $\beta 2$ -glikoproteinie I w klasie IgG i/lub IgM w surowicy lub osoczu w stężeniu > 99 percentyla, stwierdzona minimum 2-krotnie w odstępie ≥ 12 tygodni, pomiar z użyciem standaryzowanego testu ELISA

scydozie i celiakii, a także po zastosowaniu wybranych leków (propylotiouracyl, hydralazyna, interferon czy minocyklina) [22].

PRZECIWCIAŁA PRZECIW CYKLICZNEMU CYTRULINOWANEMU PEPTYDOWI

Opublikowane w 2010 roku przez ACR/*European League Against Rheumatism* (EULAR) kryteria klasyfikacyjne reumatoidalnego zapalenia stawów (RZS) zawierają dwa kryteria serologiczne: obecność RF i przeciwciał przeciw białkom cytrulinowanym. Spełnienie co najmniej jednego z nich jest konieczne dla ustalenia rozpoznania [23].

W praktyce klinicznej powszechnie wykorzystuje się anty-CCP. Obecnie stosowane testy ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) II generacji umożliwiające detekcję anty-CCP (z wykorzystaniem wysoko oczyszczonych syntetycznych peptydów zawierających cytrulinę), cechują się dużą czułością (75–82%) i swoistością (90–98%) diagnostyczną RZS. Wykazuje się ich obecność już we wczesnej fazie choroby (czułość 61%) i jak potwierdzono, istotnie wiążą się z występowaniem formy nadżerkowej i postępującą destrukcją stawów. Niektóre badania wykazały, że mogą być obecne w surowicy już na kilkanaście lat przed manifestacją pierwszych objawów choroby. Wartość predykcyjna anty-CCP jest większa niż RF. Szansa rozwoju RZS w ciągu 5 lat u osób z obecnością anty-CCP wynosi 69% [24].

Duża swoistość dla RZS pozwala wykorzystywać anty-CCP w różnicowaniu RZS z TRU, wirusowym zapaleniem wątroby typu C i polimialgią reumatyczną.

Należy wspomnieć, że przez wiele lat RF był jedynym kryterium serologicznym RZS. Czynnikiem reumatoidalnym, najczęściej klasy IgM, stwierdza się u 80–85% chorych, ale we wczesnej fazie choroby tylko u około 30%. Nie jest to swoisty marker RZS. Wykrywa się go w przebiegu innych zapalnych chorób reumatycznych, krieglobulinemii, chorób infekcyjnych i nowotworów. Obecny może być także u zdrowych osób i częstość jego występowania

wzrasta z wiekiem. Z praktycznego punktu widzenia warto jest, obok RF IgM, oznaczać RF w klasie IgA. Wyniki dodatnie dla obu izotypów są bardziej swoiste dla RZS i rzadko spotyka się taką kombinację w innych chorobach reumatycznych [24].

PRZECIWCIAŁA PRZECIWFOSFOLIPIDOWE

W praktyce reumatologicznej rutynowo oznacza się trzy rodzaje aPL włączone do kryteriów klasyfikacyjnych zespołu antyfosfolipidowego (APS, *antiphospholipid syndrome*): aCL, przeciwciała przeciw $\beta 2$ -glikoproteinie I (anty- $\beta 2$ -GPI) i antykoagulant tocznia (LA, *lupus anticoagulant*) (tab. 3) [25].

Na przestrzeni lat podejście do diagnostyki APS, a zwłaszcza interpretacji testów serologicznych, zmieniło się. W zależności od obecności wybranych manifestacji można określić małe, średnie i duże ryzyko wystąpienia APS, co w różnym stopniu uzasadnia zlecenie badania aPL:

- małe ryzyko APS — żylna lub tętnicza zakrzepica u starszych chorych;
- średnie — wydłużony czas częściowej trombolastyny po aktywacji (APTT, *activated partial thromboplastin time*) u osób bezobjawowych, nawracające samoistne poronienia, sprowokowana żylna zakrzepica u młodych chorych (< 50 r.);
- duże — niesprowokowana zakrzepica żylna i tętnicza u młodych chorych, lokalizacja zmian zakrzepowych w nietypowych miejscach, późne utraty ciąży, jakiegokolwiek epizodu zakrzepowy lub powikłania położnicze u chorych na choroby autoimmunizacyjne (zwłaszcza TRU, RZS, małopłytkowość autoimmunologiczną, niedokrwistość autoimmunohemolityczną) [26].

W przypadku chorych z objawami naczyniowymi i położniczymi uzyskane wyniki oznaczeń aPL mają znaczenie w ocenie ryzyka, czy u podłoża tych zmian leży APS. Za pewnym rozpoznaniem przemawia wynik dodatni dla wszystkich aPL ujętych w kryteriach. Jeśli obecne są tylko aCL i anty- $\beta 2$ -GPI, zwłaszcza

Tabela 4. Czynniki interferujące w testach laboratoryjnych do oceny przeciwciał przeciwfosfolipidowych

<ul style="list-style-type: none">— Zbyt krótki czas (< 3–6 miesięcy) od epizodu zakrzepowego— Leczenie antykoagulacyjne, heparyny i doustne antykoagulanty, interferują z testami koagulologicznymi stosowanymi w diagnostyce LA (aCL, anti-β2-GPI — brak interferencji)— Domieszka płytek krwi w osoczu (falszywie ujemne wyniki LA)— Zwiększone stężenie białka C-reaktywnego może powodować wydłużenie czasów krzepnięcia (proporcjonalne do stężenia białka) stosowanych w diagnostyce LA— Bardzo duże stężenia substancji endogennych (hemoglobina, bilirubina, lipidy)— Duże stężenie immunoglobulin poli- i monoklonalnych (wyniki fałszywie dodatnie)— Reakcje krzyżowe — infekcje, RF— Brak klasycznych aPL — obecne inne izotypy lub inne aPL— Zespół nerczycowy — utrata aPL IgG z moczem, zmniejszona synteza i/lub zwiększony katabolizm— Glukokortykosteroidy i leki immunosupresyjne (zmniejszenie miana aPL)
--

LA — antykoagulant tocznia, aCL — przeciwciała antykardiolipinowe, anti- β 2-GPI — przeciwciała przeciw β 2-glikoproteinie I, RF — czynnik reumatoidalny, aPL — przeciwciała przeciwfosfolipidowe, IgG — immunoglobulina klasy G

izotyp IgG, mówi się o wysoce prawdopodobnym APS. Obecny jeden rodzaj aPL, czyni diagnozę APS mało prawdopodobną lub rozpoznaje się tak zwany położniczy APS [26].

Przeciwciała przeciwfosfolipidowe są też znakomitym przykładem jak wiele zmiennych może wpływać na wynik badań immunologicznych i tym samym, jak wiele zmiennych należy wziąć pod uwagę, aby uczynić tę diagnostykę optymalną i wiarygodną. Wybrane czynniki przedstawiono w tabeli 4.

Zatem, ujmując wszystkie aspekty związane z diagnostyką APS, właściwa strategia winna obejmować następujące etapy:

- jeśli u chorego obecne są typowe objawy kliniczne, należy oznaczyć wszystkie aPL ujęte w kryteriach klasyfikacyjnych zespołu. W przypadku uzyskania wyników dodatnich należy rozpoznać APS;
- w przypadku gdy charakterystycznym objawom klinicznym APS nie towarzyszy obecność klasycznych aPL, należy ocenić możliwe inne tło zakrzepicy, wykluczyć kliniczne i laboratoryjne przyczyny wyników ujemnych, ocenić inne, nieujęte w kryteriach, aPL i w przypadku wyników dodatnich rozpoznać APS, gdy wyniki badań dodatkowych także są ujemne należy rozpoznać seronegatywny APS [27].

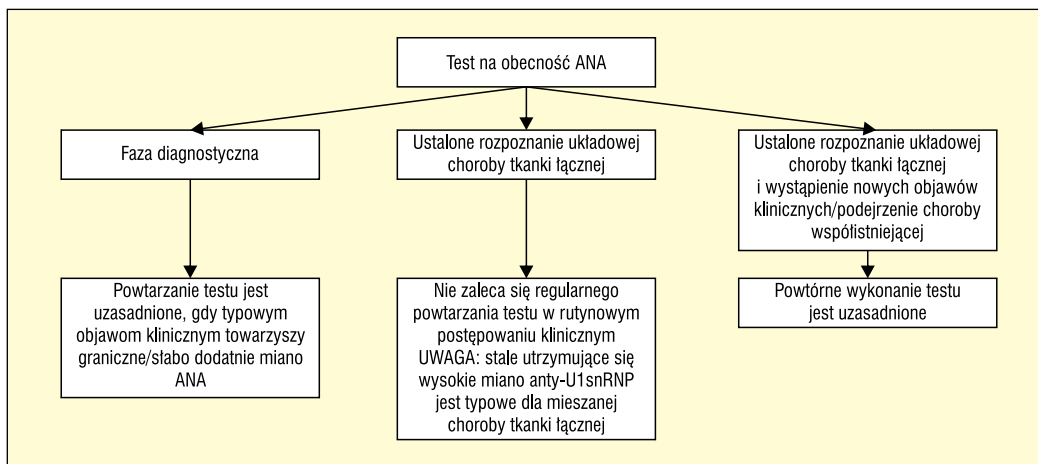
CZY POWTARZAĆ TESTY SEROLOGICZNE U CHORYCH NA CHOROBY REUMATYCZNE

W praktyce lekarza reumatologa często pojawia się pytanie „Czy i jak często należy powtarzać ocenę autoprzeciwciał?”. Ogólna zasada brzmi, że badania serologiczne są najbardziej przydatne w fazie diagnostyki i poza kilkoma wyjątkami, nie mają wartości jako markery aktywności procesu chorobowego i ich regularne powtarzanie nie wnosi istot-

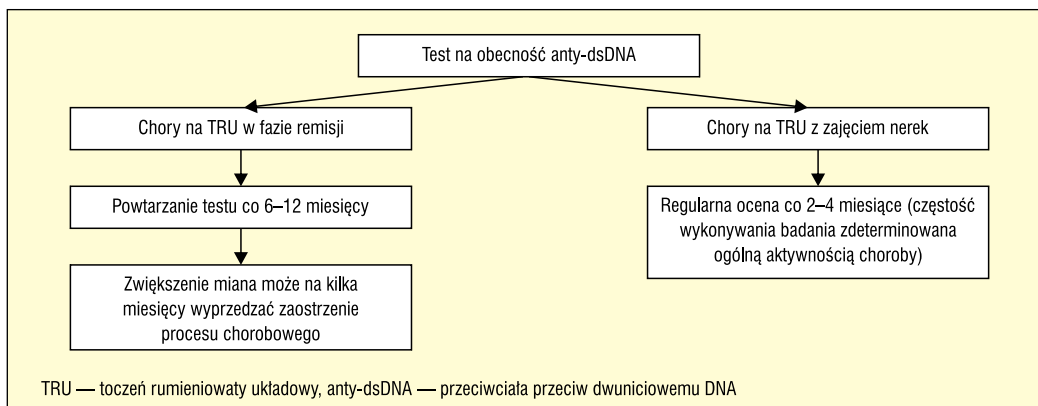
nych klinicznie informacji. Sytuacja zmienia się, gdy pojawią się nowe objawy, które mogą wpłynąć na diagnozę lub zmianę terapii. Wtedy powtórne wykonanie badań laboratoryjnych jest wskazana.

Opierając się na konkretnych przykładach, wskazuje się, że ogólny test ANA dość słabo koresponduje z aktywnością choroby i możliwością oceny skuteczności leczenia. Jego powtarzanie jest najbardziej uzasadnione w przypadku zmiany obrazu klinicznego, czy podejrzenia chorób współistniejących (ryc. 2). Podobnie stężenia autoprzeciwciał swoistych mogą zmieniać się w czasie i przeciwciała te wykrywa się zarówno w aktywnej fazie choroby, jak i w okresie remisji (ale np. stale utrzymujące się duże stężenie anti-U1RNP jest wysoce swoiste dla mieszanej choroby tkanki łącznej). Wyjątek stanowią anti-dsDNA, które ściśle wiążą się z zajęciem nerek w przebiegu TRU oraz z ogólną aktywnością choroby (wzrost stężenia może na kilka miesięcy wyprzedzać zaostrzenie procesu chorobowego). Zatem jak często powtarzać test w tej grupie chorych? Specjaliści są zdania, że u chorych w okresie wyciszenia objawów kontrolne badanie powinno się wykonać co 6–12 miesięcy, a u chorych z zajęciem nerek częściej, nawet co 2–4 miesiące, zależnie od ogólnej aktywności choroby (ryc. 3) [28].

Wyniki badań nad możliwością wykorzystania anty-CCP do monitorowania leczenia nie są jednoznaczne. Analiza chorych poddanych konwencjonalnemu leczeniu, głównie metotreksatem (MTX) wskazuje na zależność zmiany stężenia anty-CCP w czasie terapii od czasu trwania choroby. Natomiast wyniki badań dotyczących stosowania terapii łączonych (MTX i inhibitory czynnika martwicy nowotworów alfa [TNF- α , *tumor necrosis factor alpha*]) są sprzeczne. Podobnie wskazuje się



Rycina 2. Jak często powtarzać test na obecność przeciwciał przeciwjądrowych



Rycina 3. Jak często powtarzać oznaczanie przeciwciał przeciw dwuniciowemu DNA u chorych na toczeń rumieniowaty układowy

na słabą korelację miana RF z aktywnością choroby. Jednak u chorych z dużym mianem częściej obserwuje się manifestację pozastawowe oraz szybką progresję destrukcji stawów. Choć ocenia się, że RF ma ograniczone znaczenie w monitorowaniu leczenia, to podkreśla się użyteczność RF IgM w monitorowaniu terapii z zastosowaniem klasycznego leczenia (DMARDs, *disease-modifying antirheumatic drugs*) i inhibitorów TNF- α — przy dobrej odpowiedzi na zastosowaną terapię jego miano zmniejsza się [24].

W przypadku aPL po ustaleniu rozpoznania APS powtarzanie badań nie jest konieczne o ile nie wystąpiły jakiegokolwiek zmiany w obrazie klinicznym. Jak dotąd badania nie dają jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, czy u chorych na APS „zanik” aPL w kolejnych badaniach jest równoznaczny z poprawą kliniczną [29].

Choć liczne obserwacje potwierdziły związek miana ANCA z aktywnością procesu chorobowego, należy podkreślić, że większość

z nich opierała się na retrospektywnej analizie danych. Ponadto, w badaniach tych różnie definiowano nawrót i zaostrzenie objawów chorobowych, różnice dotyczyły także odstępu czasu między kolejnymi wizytami kontrolnymi, czy stosowanych technik laboratoryjnych. Ogólnie, uważa się że zaostrzenie choroby jest bardziej prawdopodobne przy zwiększeniu miana ANCA, niż przy jego niskich wartościach. Jednak wyniki zawsze należy interpretować indywidualnie dla każdego chorego. Nie ma bowiem arbitralnie ustalonej wartości miana ANCA, którą można by określić jako wysoką i jednoznacznie wiązać z dużym ryzykiem zaostrzenia. Decyzja o zmianie lub intensyfikacji leczenia powinna opierać się na wynikach analizy klinicznej i badania histologicznego, a nie tylko na ocenie autoprzeciwciał. Należy również pamiętać, że miana ANCA oceniane przy użyciu technik IIF i ELISA często ze sobą nie korelują i eksperci wciąż debatuje, który z testów uznać za wskaźnik aktywności choroby [30].

ODRĘBNOŚCI DIAGNOSTYCZNE WIEKU DZIECIĘCEGO

U chorych na młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów (MIZS [JIA, *juvenile idiopathic arthritis*]) obecność anty-CCP stwierdza się z niewielką częstością. Około 25% dzieci z wielostawową postacią choroby jest także dodatnia dla RF [31].

Przeciwciała przeciwjądrowe z kolei mają największe znaczenie praktyczne w diagnostyce młodzieńczego TRU (MTRU). Miana $\geq 1:1280$ stanowią silny predyktor choroby. Natomiast miana niskie $\leq 1:320$ (zwłaszcza u dzieci < 13 rż.) pozwalają na wykluczenie choroby. Jeśli w przebiegu MTRU dominują ANA w klasie IgM wskazują na łagodniejszy przebieg choroby i lepsze rokowanie (mniejsze ryzyko zajęcia nerek i innych narządów) [31].

Nie potwierdzono znaczenia ANA w diagnozowaniu MIZS (decydują objawy kliniczne) i różnicowaniu go z młodzieńczym zapaleniem skórno-mięśniowym, czy innymi zespołami bólowymi w układzie mięśniowo-szkieletowym. Przeciwciała przeciwjądrowe są natomiast przydatne w rozpoznaniu skąpostawowej postaci MIZS (głównie u dziewczynek z niesymetrycznym zapaleniem stawów), w przebiegu której stwierdza się objawy zapalenia błony naczyniowej oka (częstość występowania ANA do 60%). Najrzadziej ANA obecne są u chorych z układowym początkiem choroby [31].

U zdrowych dzieci ANA stwierdza się z częstością 2–16%. U dzieci z objawami mięśniowo-szkieletowymi (m.in. zespół hipermobilności stawów, zespół Osgood-Schlattera, zespół rzepkowo-udowy) częstość występowania ANA ocenia się na 4–31%. Podkreśla się, że obecność ANA (zwłaszcza w małym mianie) u dzieci bez objawów choroby reumatycznej nie jest predyktorem rozwoju choroby autoimmunizacyjnej w przyszłości [31].

STANDARYZACJA METOD OZNACZANIA AUTOPRZECIWCIAŁ W REUMATOLOGII — CZY JEST MOŻLIWA?

Na przestrzeni lat podejmowano wiele międzynarodowych inicjatyw mających na celu standaryzację oceny autoprzeciwciał. W latach 80. ubiegłego stulecia powołano *Autoantibody Standardization Committee* pod przewodnictwem prof. Eng M. Tana. Głównym celem organizacji jest gromadzenie próbek surowic od chorych na układowe choroby tkanki łącznej z autoprzeciwciałami monospecyficznymi dla

danego antygeny, które mają służyć jako materiał referencyjny do oceny wiarygodności testów laboratoryjnych. W 2002 roku utworzono *European Autoimmune Standardization Initiative* (EASI). Krajowe komitety pod auspicjami EASI istnieją we Francji, Belgii, Szwecji, Holandii, Szwajcarii, Niemczech, Hiszpanii, Austrii, Włoszech, Norwegii, Portugalii, Finlandii, Izraelu i na Ukrainie (od 2012). Głównym celem tej organizacji jest praca nad harmonizacją technicznych aspektów dotyczących testów do diagnostyki autoprzeciwciał, współpraca z klinicystami i naukowcami w zakresie raportowania, rozpowszechniania i interpretacji wyników. Jedną z najnowszych inicjatyw została powołana w 2009 roku — *Working Group on Harmonization of Autoantibody Tests* (WG-HAT) przy *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, której głównym celem jest przygotowanie materiałów referencyjnych, zgodnie z rekomendacjami dla innych analizów, we współpracy z *The Institute for Reference Materials and Measurements of the Joint Research Centre of European Commission* [32].

Pomimo tak wielu programów standaryzacyjnych i licznych rekomendacji, ankieta EASI dotycząca oceny ANA rozesłana do uczestniczących w inicjatywie krajów, odsłoniła ogromne rozbieżności w sposobie przeprowadzania badania i formułowania wyników. Okazuje się, że ponad 50% laboratoriów w Holandii, Portugalii i Norwegii nie wykonuje przesiewowego testu immunofluorescencji pośredniej. W ponad 35% analizowanych jednostek oceny preparatów dokonuje tylko jeden badacz (a rekomenduje się 2 osoby oceniające przy manualnym wykonaniu testu), a miano przesiewowe 1:40 stosuje się powszechnie w 15% laboratoriów, głównie w Norwegii i Portugalii. Rozbieżności dotyczą również metod służących potwierdzeniu obecności anty-dsDNA, czy podjęcia oceny przeciwciał monoswoistych przy dodatnim wyniku testu przesiewowego (taką strategię potwierdziło tylko 64% ocenianych podmiotów). Wyniki są przedstawiane ilościowo w większości laboratoriów, ale na przykład tylko półilościowo w ponad 70% jednostek w Szwecji, a tylko jakościowo w około 30% w Belgii, Holandii i Portugalii [33]. Jeśli nie będą przestrzegane rekomendowane schematy postępowania i nie przeprowadzi się ostatecznej standaryzacji metod, trudno o zapewnienie powszechnej wysokiej jakości badań, harmonizację i porównywalność wyników między laboratoriami.

PODSUMOWANIE ORAZ WSKAZÓWKI I WYZWANIA NA PRZYSZŁOŚĆ

Niewątpliwie diagnostyka serologiczna ma coraz większe znaczenie, zwłaszcza we wczesnej diagnostyce chorób reumatycznych. Na pewno istnieje potrzeba opracowania nowych testów wieloparametrowych, które usprawniłyby diagnostykę i wpisały się, wraz z innymi biomarkerami, w nurt medycyny personalizowanej, odpowiadającej dzisiejszemu spojrzeniu na proces opieki nad chorym.

Osiągnięcie tych założeń będzie możliwe przy ścisłej współpracy producentów testów, laboratoriów, lekarzy i gremiów eksperckich. Konieczne są dalsze wysiłki zmierzające do opracowywania rekomendacji (i ich respektowania) oraz standaryzacji metod. Zwłaszcza to ostatnie zadanie jest niezwykle trudne ze względu na złożoną naturę diagnostyki auto-przeciwiała. W procesie standaryzacji należy bowiem uwzględniać wszystkie czynniki:

— przedanalizyczne (identyfikacja pacjenta, pozyskiwanie, przechowywanie i postępowanie z materiałem do badań, warunki

transportu, czynniki związane z pacjentem — czynniki fizjologiczne, stany patologiczne, leki);

— analityczne (zmiennosc testów, charakterystyka antygeny, immobilizacja antygeny, systemy kalibracji i standaryzacji, metody detekcji);

— poanalizyczne (opracowanie wyniku, jednostki pomiarowe, ustalenie wartości odcięcia: analiza dystrybucji wśród zdrowych osób dobranych pod względem wieku i płci oraz wśród osób kontrolnych z innymi schorzeniami — w tym z infekcjami, z obecnością paraprotein i hipergammaglobulinemią, interpretacja i kategoryzacja — wyniki ujemne, graniczne, dodatnie, wysoko dodatnie, interpretacja nowych testów w odniesieniu do starszych metod, ocena zakresu czułości).

W opinii autorów naczelną zasadą, aby zlecenie testów serologicznych poprzedzała wnikliwa ocena kliniczna uzasadniająca celowość diagnostyki jest i pozostanie aktualna, gdyż tylko takie podejście gwarantuje racjonalne i obiektywne wykorzystanie danych laboratoryjnych.

ABSTRACT

Nowadays autoantibodies are commonly used in everyday rheumatology practice. They are helpful in diagnosis, especially at early stages of the disease with oligosymptomatic manifestations or when the patient presents an atypical clinical picture. Sometimes they might be applicable to monitor the activity of the disease or to assess the prognosis. However, it should be noted that because of methodological limitations and the lack of standardization of evaluation studies, autoantibodies should not be considered the diagnostic golden standard but only the additional tool in

diagnosis of rheumatologic diseases. In the current paper are discussed issues with regard to immunological disorders underlying the pathogenesis of autoimmune diseases, special features of serological diagnostics, clinical significance of selected autoantibodies taking into account diagnostic distinctiveness in childhood, developments in standardization of methods and future challenges to optimize autoantibodies diagnostics in clinical practice.

Forum Reumatol. 2016, Vol. 2, No 1, 39–50

Key words: autoantibodies; autoimmunity; serological diagnostics; systemic connective tissue diseases

1. Hayter S.M., Cook M.C. Updated assessment of the prevalence, spectrum and case definition of autoimmune diseases. *Autoimmun. Rev.* 2012; 11: 754–765.
2. Sheldon J. Laboratory testing in autoimmune rheumatic diseases. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 2004; 18 (3): 249–269.
3. Damoiseaux J.G., Tervaert J.W. The definition of autoimmune disease: are Koch's postulates applicable? *Neth. J. Med.* 2002; 60: 266–268.
4. Conrad K., Roggenbuck D., Reinhold D., Sack U. Autoantibody diagnostics in clinical practice. *Autoimmun. Rev.* 2012; 11: 207–211.
5. Zhao Z., Weinstein E., Tuzova M. i wsp. Cross-reactivity of human lupus anti-DNA antibodies with alpha-actinin and nephritogenic potential. *Arthritis Rheum.* 2005; 52: 522–530.
6. Faust T.W., Chang E.H., Kowal C. i wsp. Neurotoxic lupus autoantibodies alter brain function through two distinct mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010; 107: 18569–18574.
7. Galperin I., Fortin P.R., Subang R., Newkirk M.M., Rauch J. A subset of rheumatoid factors crossreacts with cardiolipin in patients positive for IgM rheumatoid factor and anticardiolipin antibodies. *J. Rheumatol.* 2000; 27 (3): 820–821.

8. Greidinger E.I., Casciola-Rosen I., Morris S.M., Hoffman R.W., Rosen A. Autoantibody recognition of distinctly modified forms of the U1-70 kd antigen is associated with different clinical disease manifestations. *Arthritis Rheum.* 2000; 43: 881–888.
9. Reveille J.D. Ethnicity and race and systemic sclerosis: how it affects susceptibility, severity, antibody genetics, and clinical manifestations. *Curr. Rheumatol. Rep.* 2003; 5: 160–167.
10. Cooper G.S., Parks C.G., Treadwell E.I. i wsp. Differences by race, sex and age in the clinical and immunologic feature of recently diagnosed systemic lupus erythematosus patients in the southeastern United States. *Lupus* 2002; 11: 161–167.
11. Agmon-Levin N., Damoiseaux J., Kallenberg C. i wsp. International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. *Ann. Rheum. Dis.* 2014; 73 (1): 17–23.
12. Volkman E.R., Taylor M., Ben-Artzi A. Using the antinuclear antibody test to diagnose rheumatic diseases: when does a positive test warrant further investigation. *South Med. J.* 2012; 105 (2): 100–104.
13. Scofield R.H. Autoantibodies as predictors of disease. *Lancet* 2004; 363: 1544–1546.
14. Ząbek J. Podstawowe zasady racjonalnej serodiagnostyki autozreciwiał markerowych w układowych chorobach tkanki łącznej. *Reumatologia* 2005; 43 (6): 335–340.
15. American College of Rheumatology ad Hoc committee on immunologic testing guidelines. Guidelines for immunologic laboratory testing in the rheumatic diseases: an introduction. *Arthritis Rheum.* 2002; 47 (4): 429–433.
16. Bhagat M., Sehra S.T., Shahane A., Kwan M. Utility of immunologic testing in suspected rheumatologic disease. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 2014; 14: 405–414.
17. Kavanaugh A., Tomar R., Reveille J. i wsp. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. American College of Pathologists. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2000; 124: 71–81.
18. American College of Rheumatology. Choosing wisely — an initiative of the ABIM Foundation. Five things physicians and patients should question. <http://www.choosingwisely.org/societies/american-college-of-rheumatology/>; data pobrania:
19. Mahler M., Meroni P.L., Bossuyt X., Fritzler M.J. Current concepts and future directions for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. *J. Immunol. Res.* 2014; 2014: 315179.
20. Jennette J.C., Falk R.J., Bacon P.A. i wsp. 2012 Revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis Rheum.* 2013; 65 (1): 1–11.
21. Savige J., Gillis D., Benson E. i wsp. International Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies (ANCA). *Am. J. Clin. Pathol.* 1999; 111: 507–513.
22. Bosch X., Guilabert A., Font J. Antineutrophil cytoplasmic antibodies. *Lancet* 2006; 368: 404–418.
23. Neogi T., Aletaha D., Silman A.J. i wsp. The 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for rheumatoid arthritis. Phase 2 methodological report. *Arthritis Rheum.* 2010; 62 (9): 2582–2591.
24. da Mota L.M.H., dos Santos Neto L.L., de Carvalho J.F. Autoantibodies and other serological markers in rheumatoid arthritis: predictors of disease activity? *Clin. Rheumatol.* 2009; 28: 1127–1134.
25. Miyakis S., Lockshin M.D., Atsumi T i wsp. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J. Thromb. Haemost.* 2006; 4: 295–306.
26. Pengo V., Banzato A., Bison E., Denas G., Padayattil Jose S., Ruffatti A. Antiphospholipid syndrome: critical analysis of the diagnostic path. *Lupu.* 2010; 19: 428–431.
27. Cervera R., Conti F., Doria A i wsp. Does seronegative antiphospholipid syndrome really exist? *Autoimmun. Rev.* 2012; 11: 581–584.
28. Bizzaro N., Wiik A. Appropriateness in anti-nuclear antibody testing: from clinical request to strategic laboratory practice. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2004; 22: 349–355.
29. Ortel T L. Antiphospholipid syndrome: laboratory testing and diagnostics strategies. *Am. J. Hematol.* 2012; 87: 75–81.
30. Csernok E. ANCA testing: the current stage and perspectives. *Clin. Exp. Nephrol.* 2013; 17: 615–618.
31. Breda L., Nozzi M., De Sanctis S., Chiarelli F. Laboratory tests in the diagnosis and follow-up of pediatric rheumatic diseases: an update. *Semin Arthritis Rheum.* 2010; 40: 53–72.
32. Meroni P.L., Biggioggero M., Pierangeli S.S., Sheldon J., Zegers I., Borghi M.O. Standardization of autoantibody testing: a paradigm for serology in rheumatic diseases. *Nature Rev. Rheumatol.* 2014; 10 (1): 35–43.
33. Damoiseaux J., Agmon-Levin N., Van Blerk M. i wsp. From ANA-screening to antigen-specificity: an EASI-survey on the daily practice in European Countries. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2014; 32: 539–546.