

پاراکلینیک در روماتولوژی

گردآوری و تدوین:

دکتر اصغر حاجی عباسی

فوق تخصص روماتولوژی

دانشیار دانشگاه علوم پزشکی گیلان

دکتر هدا کاوسی

فوق تخصص روماتولوژی

استادیار دانشگاه علوم پزشکی تهران

سرشناسه: سمینار سالیانه مرکز تحقیقات روماتولوژی (بیست و چهارمین : ۱۳۹۶ : تهران)
 عنوان و نام پدیدآور: پاراکلینیک در روماتولوژی/تهیه و گردآوری اصغر حاجی عباسی، هدا کاوسی ؛ [تهیه کننده]
 مرکز تحقیقات روماتولوژی.
 مشخصات نشر: تهران: نوآوران سینا، ۱۳۹۶.
 مشخصات ظاهری: ۷۰۰ص.
 شابک: ۹۷۸-۶۰۰-۸۵۳۴-۵۹-۴
 وضعیت فهرست نویسی: فیپا
 موضوع : روماتیسم شناسی — کنگره ها
 موضوع : Rheumatology— Congresses
 شناسه افزوده: حاجی عباسی، اصغر، ۱۳۴۰ -
 شناسه افزوده: کاوسی، هدا، ۱۳۵۷ -
 شناسه افزوده: دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران. مرکز تحقیقات روماتولوژی
 رده بندی کنگره: RC۹۲۷ / س ۸ ۱۳۹۶
 رده بندی دیویی: ۷۲۳/۶۱۶
 شماره کتابشناسی ملی: ۵۰۶۶۹۶۲

نام کتاب:	پاراکلینیک در روماتولوژی
تهیه و گردآوری:	دکتر اصغر حاجی عباسی، دکتر هدا کاوسی
ناشر:	نوآوران سینا
نوبت چاپ:	اول / ۱۳۹۶
شمارگان:	۱۰۰۰
لیتوگرافی، چاپ و صحافی:	دانش
بهاء:	۳۷۰۰۰۰ ریال



مرکز روماتیسم ایران
 RHEUMATOLOGY CENTER of Iran

این کتاب با حمایت مالی مرکز روماتیسم ایران تهیه شده است.



www.noavarsina.ir

ISBN: 978-600-8534-59-4



9 786008 153459 4

فصل دوم:

آزمایشات اختصاصی مورد استفاده در روماتولوژی

آنتی‌بادی‌های ضد هسته‌ای

دکتر محمود اکبریان، دکتر سیده طاهره فائزی

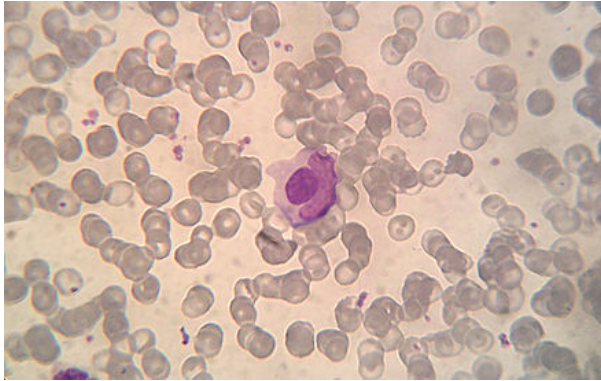
آنتی نوکلئار آنتی بادی‌ها (ANAS) به گروهی از اتوآنتی‌بادی‌ها گفته می‌شود که علیه آنتی ژن‌های داخل سلولی ایجاد می‌شود. بررسی این آنتی‌بادی‌ها به عنوان تست غربالگری در تعدادی از بیماری‌های اتوایمیون سیستمیک شامل لوپوس اریتماتوی سیستمیک، سندرم شوگرن، اسکلرودرمی سیستمیک، MCTD و میوپاتی التهابی ایدیوپاتیک انجام می‌شود. این آنتی بادی‌ها علاوه بر بیماری‌های اتوایمیون سیستمیک در تعدادی از بیماری‌های اتوایمیون اختصاصی ارگان (شامل بیماری‌های خود ایمنی کبد و تیروئیدیت هاشیموتو)، عفونت‌ها، کانسرها، داروها، افراد مسن و در تعدادی از افراد طبیعی جامعه نیز مشاهده می‌شود.^{۴-۱}

علیرغم گذشت بیش از ۵۰ سال از استفاده ANAS در روماتولوژی، هنوز خیلی از جوانب این تست نا مشخص و در هاله ابهام می‌باشد.^۵ در این مقاله سعی شده علاوه بر بررسی نقش تشخیصی ANAS در بیماری‌های روماتیسمی به چالش‌های نتایج این تست نیز پرداخته شود.

تاریخچه

بررسی ANAS اولین بار توسط Hargraves و همکارانش در سال ۱۹۴۸، با شناسایی سلول LE (Lupus Erythematosus) در نمونه مغز استخوان بیمار مبتلا به لوپوس انجام شد.^۶ در روش LE

cell که امروزه به ندرت استفاده می‌شود، نمونه خون درون یک لوله حاوی شیشه خرد شده، به هم زده می‌شود. سپس هسته آزاد شده سلول‌ها توسط ANA (آنتی ریبونوکلوپروتئین) و کمپلمان اپسونیزه می‌شود و توسط سلول‌های نوتروفیل فاگوسیتیه می‌شود و سلول LE به وجود می‌آید. تصویر شماره ۱.



تصویر شماره ۱: سلول LE را نشان می‌دهد. در اینجا هسته هموزن شده یک نوتروفیل، توسط یک سلول چند هسته ای بلعیده شده است.

سپس در سال ۱۹۵۷ از روش ایمنوفلورسانس غیرمستقیم (IFA) با استفاده از نمونه کبد یا کلیه موش‌ها (به جای سوبسترا)، به عنوان روش حساس‌تر نسبت به LE cell در تشخیص بیماری لوپوس و بیماری‌های مرتبط استفاده شد.

آنتی‌ژن‌های مورد هدف ANAS

آنتی‌ژن‌هایی که به ANAS باند می‌شوند در ابتدا در هسته سلول‌ها کشف شدند، به همین دلیل نام آنتی‌نوکلئار آنتی‌بادی‌ها به آن‌ها داده شد. اما سپس آنتی‌بادی علیه تعدادی از پروتئین‌های سیتوپلاسمی نیز مشخص شد و در زمره ANAS قرار گرفتند. ANAS به DNA، RNA، پروتئین‌ها، کمپلکس اسید نوکلئیک، پروتئین‌ها باند می‌شوند.^۷ ANAS به ۲ گروه تقسیم می‌شوند، شامل ANAS مرتبط با لوپوس و ANAS مرتبط با بیماری‌های اتوایمیون دیگر. گروه اول شامل آنتی‌بادی‌های علیه DNA، هیستون و نوکلئوزوم‌ها می‌باشد و گروه دوم شامل آنتی‌بادی‌هایی که به کمپلکس RNA و پروتئین‌های متصل به RNA (RBPs) باند می‌شوند. مثال ANAS که RBPs را شناسایی می‌کنند شامل آنتی‌بادی‌های anti-Sm، anti-RNP، anti-Ro و anti-La می‌باشند.^{۸،۹}

اختصاصیت ANA در بیماری‌های مختلف

ارتباط آنتی‌بادی‌های خاص با بیماری‌های خود ایمن شامل:
 DNA و anti-Sm با بیماری لوپوس ارتباط خاص دارد و برای تشخیص اختصاصیت بالا دارد.
 anti-topoisomerase I با بیماری اسکلوئودرمی سیستمیک پیشرونده، anti-centromer با نوع محدود پوستی اسکلوئودرمی سیستمیک ارتباط تنگاتنگ دارد.
 anti-Jo1 با میوزیت‌ها ارتباط دارد.

بررسی ANA به عنوان یک تست غربالگری در تعدادی از بیماری‌های خود ایمنی سیستمیک انجام می‌شود و در صورت مثبت شدن ANAs، در مرحله بعد با انجام تست تکمیلی و تشخیص اتوآنتی‌بادی اختصاصی آنتی ژنی که به ANA باند شده، می‌توان اطلاعات تشخیصی اختصاصی‌تر و مرتبط‌تر با بیماری را به دست آورد، شامل رابطه anti-DNA و anti-Sm با بیماری لوپوس، anti-topoisomerase I با بیماری اسکلوئودرمی سیستمیک پیشرونده، anti-centromer با نوع محدود پوستی اسکلوئودرمی سیستمیک و anti-Jo1 با میوزیت‌ها. اما تعدادی از ANAs از جمله آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن‌های Ro60، Ro52 و La، در بیش از یک بیماری اتوایمون سیستمیک مانند سندرم شوگرن، لوپوس و آرتریت روماتوئید ممکن است وجود داشته باشد. بنابراین در بیمار با تست ANA مثبت، بر اساس یافته‌های بالینی و پاراکلینیک دیگر می‌توان به بررسی ANA اختصاصی پردازیم. وجود ANAs مثبت در تشخیص تعدادی از بیماری‌های اتوایمون ضروری و در تعدادی کمک کننده است. (جدول شماره ۱)

Condition	Patients with ANAs (%)
Diseases for Which ANA Testing Is Helpful for Diagnosis	
Systemic lupus erythematosus	99-100
Systemic sclerosis	97
Polymyositis/dermatomyositis	40-80
Sjögren's syndrome	48-96
Diseases in Which ANA Is Required for the Diagnosis	
Drug-induced lupus	100
Mixed connective tissue disease	100
Autoimmune hepatitis	100
Diseases in Which ANA May Be Useful for Prognosis	
Juvenile idiopathic arthritis	20-50
Anti-phospholipid antibody syndrome	40-50
Raynaud's phenomenon	20-60
Some Diseases in Which ANA Is Typically Not Useful	
Discoid lupus erythematosus	5-25
Fibromyalgia	15-25
Rheumatoid arthritis	30-50
Relatives of patients with autoimmune diseases	5-25
Multiple sclerosis	25
Idiopathic thrombocytopenic purpura	10-30
Thyroid disease	30-50
Patients with silicone breast implants	15-25
Infectious diseases	Varies widely
Malignancies	Varies widely
Healthy ("Normal") Persons	
≥1:40	20-30
≥1:80	10-12
≥1:160	5
≥1:320	3

ANA, Anti-nuclear antibody.

Modified from Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, et al. Guidelines for clinical use of the anti-nuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. American College of Pathologists. Arch Pathol Lab Med 124:71-81, 2000.

جدول شماره ۱: بیماری‌ها و وضعیت‌های همراه با ANA نشان دهنده ارتباط فاکتورهای ضد سلولی و بیماری‌های خود ایمنی می‌باشد.

روش‌های سنجیدن ANA

از زمان استفاده از ANAS در تشخیص بیماری‌های اتوایمیون، روش‌ها و تکنولوژی‌های مختلفی برای سنجش ANAS مورد استفاده قرار گرفته است که به تفصیل به بیان این روش‌ها می‌پردازیم.

روش ایمنوفلورسانس (IFA)

از بیش از ۵۰ سال پیش، روش ایمنوفلورسانس (به عنوان IFA غیرمستقیم شناخته شده) به عنوان تکنیک اصلی و gold standard برای سنجش ANAS مورد استفاده قرار گرفته است.

IFA یک روش ساده است، در ابتدا سرم یا پلاسمای بیمار رقیق می‌شود (به‌طور تیپیک سریالی ۲ برابر رقیق می‌شود) و سپس به یک سوپسترای سلولی شامل نمونه بافتی یا لایه سلولی فیکس شده روی یک لام شیشه‌ای اضافه می‌شود. سپس لام شسته می‌شود. بعد از آن anti-IgG فلورسینه به آن اضافه می‌شود و مجدد لام شسته می‌شود. سپس لام زیر میکروسکوپ فلورسانس مشاهده می‌شود. (تصویر شماره ۲)

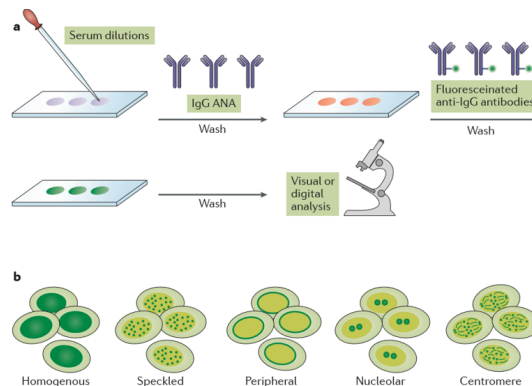


Figure 2 | IFA testing for identifying the presence of ANAs. a | In the top panel, the experimental procedure of an indirect immunofluorescence assay (IFA) is illustrated. A slide with tissue culture cells is exposed to dilutions of serum. Following washing steps to remove unbound antibodies, the slide is incubated with a fluoresceinated anti-IgG reagent. Following another washing step, fluorescence microscopy is performed. At present, in most laboratories, a technician visually inspects the slide to determine the presence and pattern of fluorescence. In determining the positivity of a sample, the dilution in which fluorescence is still visible is assessed. This end-point titre provides a quantitative measure of the amount of antinuclear antibodies (ANAs) present. In addition to visual inspection, the presence of fluorescence can be determined from digital images. **b** | The bottom panel illustrates some of the more common staining patterns of ANAs. Each pattern is associated with certain ANAs and, therefore, can occur more commonly in association with certain diseases. The results of IFA can be reported in terms of the end-point titre and staining pattern. For some sera, a mixture of different ANAs is present and, depending on their relative titre, more than one pattern can be observed. For example, a serum can be characterized as 1:640 homogenous and 1:2,560 speckled. As IFA kits can differ in features related to the cell line, conditions of fixation and properties of anti-IgG reagents, the results can vary. Therefore, it is important to know the characteristics of different assays for interpreting their results. In general, a titre of >1:40 or 1:80 is considered significant meaning that the serum is considered to be ANA positive.

تصویر شماره ۲: مراحل مختلف آزمایش انجام تست ANA با روش ایمنوفلورسانس را نشان می‌دهد.

استفاده از سلول‌های Hep-2 به عنوان سوبسترای سلولی با منشاء اپیتلیومای لارنکس به دلیل توانایی تکثیر سریع، هسته بزرگ، غلظت بالای آنتی ژن‌های هسته‌ای و سیتوپلاسمی و بیان کردن طیف وسیعی از آنتی ژن‌های مرتبط با بیماری‌های اتوایمیون سیستمیک و استاندارد شدن استفاده از آن به عنوان سوبسترای ارجح در تست FANA می‌باشد. اما تعدادی از آزمایشگاه‌ها از سوبستراهای هتروژن از قبیل بافت کبد یا کلیه چونندگان استفاده می‌کنند که مزیت آن حذف تداخلات آنتی بادی‌های گروه خونی و آنتی بادی‌های هتروفیل می‌باشد، اما حساسیت کمتری در سنجیدن آنتی ژن‌های وابسته به سیکل سلولی شامل Ro/SS-A دارد.

در نتایج تست FANA دو قسمت "الگو (Pattern)" و "تیتراژ" اهمیت دارد که به بحث در مورد آن می‌پردازیم.

الگو FANA: الگو (pattern) شامل توصیف شکل مشاهده شده در روش ایمنوفلورسانس می‌باشد. الگو FANA می‌تواند محل آنتی ژن و نیز اختصاصیت ANAS را نیز نشان دهد. (جدول شماره ۲) از آنجایی که تست FANA می‌تواند الگوهای متعددی را نشان دهد، تشخیص الگوهای مختلف نیاز به مهارت تکنیکی فرد مشاهده کننده دارد.^{۱۰} در ابتدا الگوهای هسته‌ای (شامل هوموژنوس، speckled، سنترومر و نوکلئولار) توسط آزمایشگاه‌ها گزارش می‌شد. با استفاده از HEp-2 cell به عنوان سوبسترا، الگوهای دیگر هسته‌ای و همچنین الگوی سیتوپلاسمی (واکنش نسبت به اجزای سلولی خارج هسته‌ای) و الگوی میتوتیک (تصویرهای همراه با مراحل مختلف میتوز) نیز مشاهده شدند. با توجه به تفاوت در گزارش الگوها از آزمایشگاه‌های مختلف، به منظور یکسان سازی در نام گذاری و گزارش استاندارد، اخیراً توسط International Consensus on ANA Patterns (ICAP) الگوها در ۳ گروه اصلی: نوکلئار، سیتوپلاسمیک و میتوتیک قرار داده شده‌اند.^{۱۱}

با مراجعه به سایت (www.ANAPatterns.org) کمیته ICAP همچنین ۲۸ الگوی مختلف براساس سوبسترای HEp-2 cell را شرح داده‌اند. از این ۲۸ الگو، الگوهای نوکلئار: هوموژنوس، speckled، سنترومر، discrete nuclear dots، نوکلئولار و dense fine speckled (AC-1 to AC-14) به عنوان الگوهای True ANA در نظر گرفته شدند. برای الگوهای سیتوپلاسمیک (AC-15 to AC-23)، الگوهای: فیبریلا، speckled، رتیکولار/آنتی میتوکندریال آنتی بادی (AMA) و الگوهای polar/Golgi-like را مطرح نموده‌اند. جدول شماره ۲ الگوهای نوکلئولار و سیتوپلاسمیک FANA و آنتی ژن‌ها و بیماری‌های مرتبط را نشان می‌دهد. تصویرهای شماره ۳ و ۴ الگوهای FANA اختصاصی لوپوس اریتماتوی سیستمیک و اسکرودرمی سیستمیک را نشان می‌دهد.

Table 2 IIFA nuclear/cytoplasmic patterns detected on HEp-2 substrates and related antigens/diagnosis

Most commonly recognised patterns		
Nuclear patterns	Related antigens	Related diagnosis
Homogeneous	dsDNA, histones, chromatin/nucleosomes, HMG	SLE, drug induced SLE/vasculitis, JIA
Coarse speckled	U1-SnRNP, U2-6 snRNP (Sm), nuclear matrix	MCTD, SLE, Raynaud, SSC, SS, UCTD
Fine speckled	SSA/Ro, SSB/La, Topo-1, common to many antigens	SLE, SS, SSC, IM, MCTD
Centromere	Kinetochores: CENP-A, B, C, F	SSc (limited), Raynaud's
Nucleolar	PM/ScI, RNA-polymerase, URNP, U3-RNP, To/Th, B23 phosphoprotein/numatrin	SSc, Raynaud's, IM, overlap
Cytoplasmic patterns	Related antigens	Related diagnosis
Diffuse	RibP, Jo-1, other tRNA synthetases, SRP	SLE, IM
Fine speckled	Jo-1, SRP, PDH (mitochondria)	IM, DM, PBC, interstitial lung disease
Less commonly recognised patterns		
Nuclear patterns	Related antigens	Related diagnosis
Peripheral/rim or nuclear envelope	Lamins, LAP1/2 gp210, nucleoporin p62; nuclear envelope and nuclear pore complex antigens	SLE, RA, PBC, IM autoimmune liver diseases
Dense fine speckled	DFS70/LEDGF-P75	Healthy subjects and other inflammatory conditions
Pleomorphic cell cycle speckled (PCNA)	Auxiliary protein proliferating cell nuclear antigen: elongation factor of DNA polymerase delta	SLE, lymphoproliferative diseases, SS
Nucleolar (clumpy)	U3-SnRNP (fibrillarin)	SSc
Multiple/few nuclear dots	Sp100, PML bodies, p80-coilin	PBC, CAH, SS
Centrosome/centriole (formerly:spindle apparatus)	Enolase, ninein, pericentrin	SSc, Raynaud's, inflammatory disease
MSA (mitotic spindle)	NuMA/centrophilin	RA, inflammatory conditions; pneumonia (mycoplasma)
Cytoplasmic patterns	Related antigens	Related diagnosis
Discrete speckled	Endosome (early endosome antigen 1), GW/Processing bodies, multivesicular bodies/lysosomes	Neurological conditions, SS, SLE, RA, PBC, UCTD
Golgi complex	Golgi proteins/golgins: giantin, golgin 245, golgin 110, golgin 97, golgin 95, others	SLE, SS, RA, overlap syndromes, cerebellar ataxia
Cytoplasmic fibres	Actin, cytokeratin, tropomyosin, vimentin	CAH, DM, infections and other inflammatory diseases

Within the many patterns that can be distinguished the ones specified in the upper part of the table are the most commonly recognised. The relationship between pattern and antigen specificity may differ in certain conditions. Similarly, the specific antigens marked in bold are the most commonly detected by reflex testing, although other antigens may be of importance in different clinical conditions. Less common pattern are specified in the lower part of this table.
CAH, chronic autoimmune hepatitis; CENP, centromere protein; DFS, dense fine speckled; DM, dermatomyositis; dsDNA, double-stranded DNA; GW, glycine—tryptophan; HMG, high mobility group; IM, inflammatory myopathies; JIA, juvenile idiopathic arthritis; MCTD, mixed connective tissue disease; MSA, mitotic spindle; NuMA, nuclear mitotic apparatus; PBC, primary biliary cirrhosis; PDH, pyruvate dehydrogenase; PM/ScI, polymyositis/scleroderma; RA, rheumatoid arthritis; RibP, ribosomal P protein; RNP, ribonucleoprotein; SLE, systemic lupus erythematosus; SRP, signal recognition particle; SS, Sjögren's syndrome; SSc, systemic sclerosis; Topo-1, topo-isomerase 1; tRNA, transfer RNA; UCTD, undifferentiated connective tissue disease.

جدول شماره ۲: الگوهای نوکلئولار و سیتوپلاسمیک **FANA** و آنتی ژن ها و بیماری های مرتبط

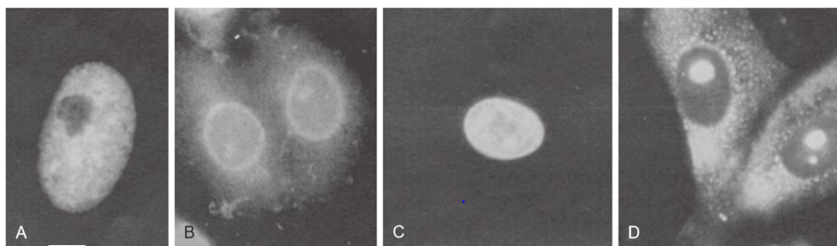


Figure 3 The fluorescent anti-nuclear antibody test: specificities of systemic lupus erythematosus. **A**, Speckled nuclear pattern of anti-Sm antibodies. **B**, Nuclear rim pattern of anti-DNA antibodies. **C**, Homogeneous nuclear pattern of anti-DNA antibodies. **D**, Discrete cytoplasmic and nucleolar pattern of antiribosome antibodies.

تصویر شماره ۳: الگوهای **FANA** اختصاصی لوپوس اریتماتوی سیستمیک

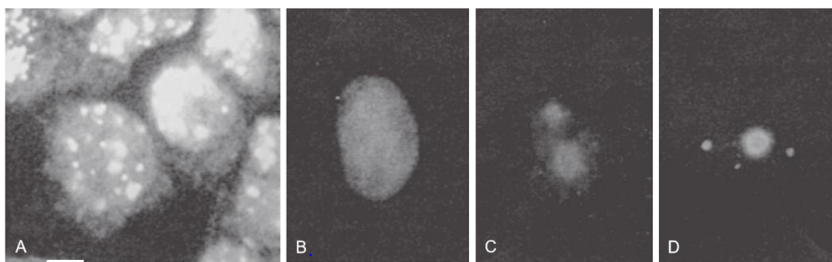


Figure 4 The fluorescent anti-nuclear antibody test: specificities of systemic sclerosis. **A**, Discrete speckled nuclear pattern of anti-kinetochore (centromere) antibodies. **B**, Grainy nuclear and nucleolar pattern of anti-topoisomerase I (sclerosis [Scl]-70) antibodies. **C**, Diffuse nucleolar and sparse nucleoplasmic pattern of anti-Th (ribonuclease mitochondrial RNA processing complex, 7-2) antibodies. **D**, Punctate nucleolar staining of anti-RNA polymerase antibodies. (A, From the Clinical Slide Collection on the Rheumatic Diseases; copyright 1991; used by permission of the American College of Rheumatology.)

تصویر شماره ۴: الگوهای FANA اختصاصی اسکلرودرمی سیستمیک

تیتتر FANA: موضوع دیگر در تست FANA، رقیق نمودن سرم بیمار می‌باشد. رقت اولیه که برای تست‌های اولیه استفاده می‌شود معمولاً ۱:۴۰ یا ۱:۸۰ است. در صورت شروع تست با رقت بالاتر، علاوه بر کاهش تعداد نتایج مثبت در جمعیت سالم، نتایج مثبت در بیماران نیز تحت تأثیر قرار می‌گیرد.^{۱۱،۱۲} رقت شروع کننده باید به‌طور موضعی تعریف شود و تیتري که بالاتر از تیتتر ۹۵٪ از افراد طبیعی آن جامعه است به عنوان تیتتر غیر طبیعی در نظر گرفته شود. توصیه می‌شود برای سنجش ANAs با سوبسترای HEP-2(000) در افراد بالغ رقت ۱:۱۶۰ مورد استفاده قرار گیرد.^۲ در مطالعه‌ای بر روی ۱۳۲۳۳ نمونه خون نشان داده شد که استفاده از رقت شروع کننده ۱:۱۶۰ برای تست FANA، ارزش پیش‌گویی کننده مثبت برای anti-dsDNA و anti-ENA را افزایش می‌دهد و همچنین فواید کلینیکی و اقتصادی به همراه دارد.^{۱۱} در گزارش تیتتر، معمولاً آخرین رقتی که الگوی ANA در آن قابل سنجش است را گزارش می‌کند اما این مسئله غیر دقیق و وابسته به نظر شخص است و معمولاً استاندارد کردن داخل آزمایشگاهی انجام نمی‌شود.

چالش‌های آنالیز FANA

عواملی که می‌تواند در نتایج تست FANA اثر بگذارد شامل نوع سوبسترای سلولی، غلظت سلولی، وضعیت فیکساسیون سلولی، نوع وسایل و نشانگرها از قبیل کیفیت anti-human IgG کونژوگ شده با فلورسئین، سرم رفرانس اختصاصی، میکروسکوپ مورد استفاده و مهارت شخص مشاهده‌کننده می‌باشد.^{۱۳}

میزان بعضی اتوانتی‌ژن‌ها از جمله آنتی‌ژن Ro60 در سوبسترای Hep-2 cells کم است، که می‌تواند سنجش آنتی بادی علیه این مولکول را محدود کند و باعث نتیجه FANA منفی در بیماران با anti-Ro شود. به همین دلیل اخیراً از یک لایه سلولی اصلاح شده با نام Hep2000 برای سنجش anti-Ro بوسیله IFA استفاده می‌شود. در این لایه سلولی، بیان شدن Ro60 به دلیل انتقال DNA مکمل Ro60 افزایش می‌یابد.^{۱۴} تعدادی از اتوانتی‌ژن‌ها در سوبسترای مورد استفاده در روش IFA به میزان کم وجود دارد که می‌تواند باعث منفی شدن تست FANA شود که در این شرایط از روش‌های دیگر از جمله ELISA استفاده می‌شود.

روش‌های جایگزین (Alternative) برای سنجیدن ANA

روش‌های جایگزین برای سنجیدن ANA، شامل روش‌های ایمنواسی منفرد (Single) یا متعدد (Multiple) مولتیپل (شامل ELISA، chemiluminescence immunoassays [CLIAs] و LIAs) می‌باشند. از فواید اصلی روش‌های جایگزین در مقایسه با روش ایمنوفلورسانس، آسانی انجام، توانایی انجام آنالیز کمی، قابلیت انجام تعداد زیاد نمونه و objective بودن بیشتر این روش‌ها برای بررسی ANA می‌باشد. از معایب روش‌های جایگزین، غیر قابل اعتماد بودن نتایج منفی به دلیل تعداد محدود آنتی‌ژن‌های مورد استفاده در این روش‌ها می‌باشد.

روش ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

ELISA یک روش حساس و سریع برای سنجیدن اتوانتی بادی‌ها می‌باشد. در ELISA از صفحات پوشیده با آنتی‌ژن استفاده می‌شود. هر صفحه microtitre می‌تواند با آنتی‌ژن منفرد (Single) برای سنجیدن آنتی‌بادی اختصاصی و یا آنتی‌ژن (Multiple Ag) برای غربالگری ANAs پوشیده شود. آنتی‌ژن‌ها یا مشتق از سلول و یا نو ترکیب (recombinant) هستند. سرم بیمار به صفحه آنتی‌ژنی اضافه می‌شود و سپس شسته می‌شود. اگر آنتی‌بادی باند شده به آنتی‌ژن وجود داشته باشد بعد از شستن هم باقی می‌ماند، سپس یک anti-human آنتی‌بادی کونژوگه به یک آنزیم از قبیل horseradish peroxidase به آن اضافه می‌شود. واکنش آنزیم باعث ایجاد تغییرات در رنگ محلول می‌شود که به میزان آنتی بادی متصل به آنتی‌ژن بستگی دارد.

محبوبیت روش ELISA به دلیل در دسترس بودن کیت ELISA، توانایی انجام این روش در چندین

platform، توانایی انجام تعداد زیاد نمونه کلینیکی و روش سریع آن در مقایسه با IFA می‌باشد، محدودیت این روش تعداد محدود اتوانتی‌ژن استفاده شده (به طور تیپیک ۸ تا ۱۰) می‌باشد که باعث کاهش حساسیت روش ELISA نسبت به IFA می‌شود. همچنین با توجه به این که روش ELISA می‌تواند اتوانتی‌ژن‌ها را دناچوره کند این روش ممکن است نتایج مثبت کاذب بدهد. از روش ELISA به طور معمول برای سنجیدن anti-DNA استفاده می‌شود. در روش ELISA آنتی بادی‌های با avidity پایین‌تر سنجش می‌کند اما با روش‌های Farr یا Crithidia luciliae می‌توان آنتی بادی‌های با avidity بالا را چک نمود. بنابراین روش ELISA منجر به میزان بالاتر نتیجه مثبت تست anti-DNA می‌شود. ارتباط بین اختصاصیت، avidity و پاتوژن‌سنجی آنتی‌بادی‌ها هنوز به‌طور واضح مشخص نیست.

روش‌های Multiplex

تعدادی از روش‌های multiplex برای سنجیدن اتوانتی‌ژن‌های هسته‌ای در دسترس می‌باشند، از بین این روش‌ها ایمونواسی خطی یک تکنیک مفید برای سنجیدن وجود آنتی بادی علیه اتوانتی‌ژن‌های اختصاصی است.^{۱۵} در این روش یک تعداد محدود آنتی ژن از قبیل پروتئین‌های تصفیه شده، پروتئین‌های نو ترکیب یا پپتیدهای سنتز شده در خطوط موازی به یک غشاء نایلونی باند می‌شوند تا سوبسترای لازم برای سنجش آنتی بادی‌ها را فراهم سازند، سپس غشاء نایلونی در معرض سرم رقیق شده بیمار قرار می‌گیرد و وجود آنتی بادی با یک شناساگر anti-human IgG کونژوگه با آنزیم مشخص می‌شود. این سیستم خودکار است و فایده آن سنجیدن همزمان چندین اتوانتی بادی که ارتباط کلینیکی با هم دارند می‌باشد.

روش دیگر، bead-based multiplex است که روش پیشرفته و جدید برای سنجیدن آنتی بادی‌ها علیه آنتی ژن‌های متعدد هسته‌ای غیر وابسته می‌باشد. در این روش آنتی بادی علیه آنتی ژن‌های مختلف به وسیله فلوسیتومتری به صورت کمی و کیفی گزارش می‌شود. نتایج روش multiplex می‌تواند به وسیله IFA تایید شود.^{۱۶} این روش‌ها باندشدن فقط تعداد محدودی از ANAS را بررسی می‌کند و بنابراین می‌تواند خیلی از انواع اتوانتی‌بادی اختصاصی را برای مثال در میوزیت التهابی از دست بدهد. بیماران مبتلا به پلی میوزیت، آنتی‌بادی‌های مختلفی علیه ترانسفر RNA سنتتاز (tRNA) و دیگر پروتئین‌ها را تولید می‌کنند اما روش multiplex می‌تواند فقط آنتی‌بادی علیه Jo-1 یا هیستیدیل tRNA سنتتاز را بسنجد. در بیماران مبتلا به لوپوس که بیش از ۲۰۰ نوع

ANAs را می‌توانند تولید کنند، با روش multiplex تعدادی از شایع‌ترین آنتی‌بادی‌ها از جمله آنتی بادی علیه DNA، کروماتین، Sm یا RNP69 را می‌توان تشخیص داد. هدف روش‌های multiplex فراهم نمودن تستی کمی و اختصاصی است. اما روش‌های multiplex تعدادی از ANAs پاتوژن را نمی‌توانند بسنجند. همچنین این روش‌ها مشکلی را که در مورد سنجیدن اتوآنتی‌بادی‌ها در افراد سالم داریم را نمی‌توانند به طور کامل حل کنند. بنابراین مثبت شدن ANA باید همیشه بر اساس وضعیت کلینیکی و احتمال بیماری قبل از انجام تست تفسیر شود.

اتوماتیزه کردن روش ایمنوفلورسانس برای ANA

با توجه به وجود چالش‌ها و مشکلات موجود در روش‌های دستی ایمنوفلورسانس، در سال‌های اخیر برای سنجیدن ANA به روش ایمنوفلورسانس روش‌های اتوماتیزه استفاده شده است و باعث کاهش چالش‌های موجود در روش‌های دستی شده است. تاکنون سیستم‌های مختلف اتوماتیزه برای سنجیدن ANA ایجاد شده است که تفاوت آن‌ها در تعداد نمونه انجام شده در ساعت توسط دستگاه، فول اتوماتیزه بودن یا نبودن و تعداد الگوی را که می‌تواند تشخیص دهد می‌باشد. برای مقایسه روش‌های اتوماتیزه با روش دستی مطالعات مختلفی انجام شده است که اکثراً نشان دادند که روش اتوماتیزه قابل مقایسه با روش دستی می‌باشد.^{۱۷،۴} جدول شماره ۳، مشخصات تکنیک‌های مختلف IFA اتوماتیزه را نشان می‌دهد.^{۱۸}

Table 3 Characteristics of automated readers for detecting antinuclear antibodies by IFA testing^a

Automated system	No. of samples/h	Full automation	No. of patterns recognized ^b	Nuclear stain ^c
Aklides	48–60	No	6 ^d	DAPI
EUROPattern	90	Yes	7 ^d	PI
Helios	150	Yes	7 ^d	None
Image Navigator	90	Yes ^e	Positive/negative	None
NOVA View	48–60	Yes ^e	5 ^d	DAPI
Zenit G-Sight	14–48	No	5 ^d	None
Cytospot	96	Yes	Positive/negative	None

^aAdapted from Tozzoli et al. (49) and Bizzaro et al. (50), with modification.

^bAklides: cytoplasmic, homogeneous, speckled, nucleolar, centromere, and multiple nuclear dots patterns; Helios: centromere, cytoplasmic, homogeneous, nuclear membrane, nuclear dots, nucleolar, and speckled (granular) patterns; EUROPattern: homogeneous, speckled, nucleolar, centromeric, nuclear dots, nuclear membrane, and cytoplasmic patterns; NOVA View: homogeneous, speckled, centromere, nucleolar, and nuclear dots cytoplasmic patterns; Zenit G-Sight: homogeneous, nucleolar, speckled, centromere, and mitochondrial patterns.

^cDAPI, 4', 6-diamidino-2-phenylindole; PI, propidium iodide.

^dTiter prediction capabilities.

^eConnection to pipetting station.

جدول شماره ۳: مشخصات روش‌های اتوماتیزه برای سنجیدن ANA به روش ایمنوفلورسانس

ANA در افراد طبیعی جامعه

مثبت شدن تست ANA در جمعیت عمومی جامعه نسبتاً شایع است. مطالعات نشان می‌دهند که حدود ¼ افراد طبیعی جوامع مختلف ANAS مثبت با تیتراهای ۱:۴۰ یا بیشتر را دارا می‌باشند و حدود ۵٪ از افراد طبیعی جامعه ANA مثبت با تیترا ۱:۱۶۰ دارند.^{۱۹} در افراد طبیعی جامعه الگوی نوکلئار speckled شایع‌ترین الگو است.^{۲۰}

هم چنین بر اساس کیت مورد استفاده در IFA، میزان مثبت شدن تست FANA در افراد طبیعی جامعه می‌تواند تا ۳۰-۲۰٪ هم گزارش شود. در تعدادی از مطالعات، تواتر مثبت شدن ANA در زنان بالاتر از مردان است و تفاوت‌های نژادی و قومی نیز روی نتایج تأثیر داشته است.^{۲۱} سن ممکن است یک فاکتور مهم نباشد از آنجایی که بچه‌ها نیز ممکن است پاسخ‌های ANA مهمی را نشان دهند.^{۲۲} دلیل مثبت شدن ANAS در افراد طبیعی جامعه هنوز ناشناخته است هر چند مثبت شدن ANA می‌تواند به عنوان استعداد زمینه‌ای برای اتوایمیونیتی در نظر گرفته شود.^{۱۹}

در یک مطالعه گذشته نگر، بیش از ۹۰٪ از افرادی که به دلیل ANA مثبت به درمانگاه روماتولوژی ارجاع شده بودند، بیماری روماتیسمی مرتبط با ANA نداشتند که نشان دهنده انجام تست در افراد با احتمال پایین بیماری روماتیسمی قبل از تست ANA می‌باشد. در این مطالعه ارزش پیش گویی کننده مثبت ANA برای بیماری لوپوس ۲/۱٪ بود و همچنین هیچ کدام از افراد با ANA با تیترا کم‌تر از ۱:۱۶۰ بیماری روماتیسمی نداشتند.^۵

مطالعات اخیر نشان داده‌اند که تعدادی از نتایج مثبت ANA در افراد طبیعی جامعه ممکن است در اثر وجود آنتی بادی علیه آنتی‌ژنی به نام DFSY۰ باشد.^{۲۳} anti-DFS70 باعث ایجاد الگو dense fine speckles (DFS) در IFA می‌شود که می‌تواند با الگوی هوموژن اشتباه شود. مطالعات بعدی نشان داد که پروتئین تشخیص داده شده به وسیله این آنتی‌بادی پروتئین PC4 و SFRS1 است (همچنین به عنوان فاکتور رشد مشتق از اپیتلیوم یا LEDGF شناخته شده است). هر چند آنتی بادی علیه DFSY۰ ممکن است با تعدادی از وضعیت‌های کلینیکی همراهی داشته باشد اما به طور شایعی در افراد سالم یافت می‌شود. بنابراین وجود anti-DFS70 ممکن است تشخیص بیماری اتوایمیون را رد کند.

معمای اختصاصیت ANA

در برخورد با هر تست ANA باید ۳ واقعیت را در نظر گرفت: اول اینکه تواتر مثبت شدن FANA در افراد طبیعی جامعه ممکن است بالا باشد، دوم اینکه بیماری‌های روماتیسمی در جامعه ناشایع هستند و سوم اینکه اغلب افراد با تست ANA مثبت هرگز مبتلا به بیماری روماتیسمی نمی‌شوند. این حقایق به ما نشان می‌دهد که در استفاده از تست ANA به عنوان تست غربالگری برای بررسی بیماران باید احتیاط شود به طوری که تعداد زیادی از نتایج ANA می‌تواند مثبت کاذب باشد. حتی با روش ELISA یا multiplex نیز نتایج مثبت کاذب ممکن است قابل توجه باشد. در پزشکی تواتر بالای مثبت کاذب در یک تست می‌تواند به انجام تست‌های گران قیمت و اغلب غیر ضروری، صرف هزینه و ایجاد نگرانی در بیماران منجر گردد. برای مثال، خیلی از روماتولوژیست‌ها بیماران را داشته‌اند که به آن‌ها گفته شده که به دلیل مثبت شدن ANA ممکن است مبتلا به لوپوس باشند و این امر باعث اضطراب پایدار در بیمار و درمان‌های غیر ضروری شده است. زمانی که برای بیمار تشخیص گذاشته می‌شود اغلب مشکل است که بیمار را متقاعد نمود پزشکی که تشخیص را برای وی گذاشته است اشتباه کرده است.^۱

از طرفی، بیماران مبتلا به بیماری اتوایمیون از جمله لوپوس سال‌ها قبل از تشخیص بیماری ممکن است تست FANA مثبت داشته باشند که به عنوان مرحله پره‌اتوایمونیتی شناخته می‌شود.^{۲۴} متأسفانه تست ANA معمولاً در افرادی انجام می‌شود که احتمال بیماری قبل از انجام تست پایین است (برای مثال شکایت‌های غیر اختصاصی مانند خستگی یا آرترارژی دارند). در این گونه موارد، ۲ روش برای نشان دادن ارزشمند بودن یا نبودن نتیجه تست FANA وجود دارد که شامل تیتروالگوی FANA و در نهایت بررسی آنتی‌بادی‌های اختصاصی شامل anti-DNA، anti-Ro و anti-La می‌باشد.^{۲۵} همچنین از آنجایی که اغلب افراد سالم که ANAs مثبت دارند مبتلا به بیماری همراه با ANA نمی‌شوند، استفاده از روش‌های multiplex درباره اینکه آیا فرد باید به دقت مورد توجه قرار گیرد یا خیر، اطلاعات ارزشمندی می‌تواند به ما بدهد.

توصیه‌های عملی

۱- اتوآنتی‌بادی‌ها (ANAs) در اکثر نزدیک به تمام بیماری‌های خودایمن دیده می‌شوند و گاهی در عفونت‌های مزمن، بیماری‌های لنوپرولیفراتیو، عفونت‌ها و حتی در افراد نرمال جامعه ممکن

است دیده شود.

۲- تست ANA از نظر تشخیصی حساسیت بالا دارد ولی اختصاصیت آن برای تشخیص پایین است.

۳- وقتی در یک بیمار مشکوک به بیماری خود ایمن هستیم، می‌توان برای غربالگری آزمایش ANA درخواست بشود.

۴- در مواردی که تست ANA مثبت می‌باشد، تیترا ANA و مدت زمانی که این تست مثبت می‌باشد، حائز اهمیت می‌باشد.

۵- در صورتی که تست ANA مثبت باشد، با توجه به شرح حال بیمار و معاینات بالینی و برحسب اینکه از نظر بالینی به کدام یک از بیماری‌های خود ایمن مشکوک باشیم، لازم است، آزمایشاتی را که برای آن بیماری اختصاصیت بیشتری دارد و در صفحات قبل توضیح داده شده است، درخواست بشود.

۶- اگر در یک بیمار، فقط تست ANA مثبت باشد و علائم بالینی و آزمایشگاهی التهاب وجود نداشته باشد، نیازی به تجویز دارو وجود ندارد و بیمار را بر حسب علائم بالینی می‌توان پیگیری کرد.

۷- گاهی در بعضی موارد، ANA با عیار بالا مثبت است و هیچگونه علائم بالینی و آزمایشگاهی به نفع بیماری‌های خود ایمن نداریم. در این موارد، در اکثر اوقات بعد از مدتی بیماری خودش را نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری

تست ANA هر چند به عنوان معیار تشخیصی در تعدادی از بیماری‌های اتوایمیون در نظر گرفته شده است اما از طرفی در افراد طبیعی جامعه نیز می‌تواند مثبت باشد. این موضوع باعث پیچیدگی استفاده از تست ANA در تشخیص بیماری می‌گردد به خصوص اگر احتمال بیماری قبل از انجام تست پایین باشد. به همین منظور تست ANA باید در افرادی استفاده شود که احتمال بیماری اتوایمیون برای آن‌ها بالا است. در صورت استفاده تشخیصی از تست ANA باید به موارد مثبت و منفی کاذب این تست و عوامل مؤثر بر این نتایج آگاهی داشته باشیم. در صورت مثبت شدن تست ANA در فردی که احتمال بیماری اتوایمیون در وی بالا است، بر اساس تظاهرات بالینی بیمار می‌توان از آنتی‌بادی‌های اختصاصی برای رسیدن به تشخیص استفاده نمود.

آنتی بادی ضد فسفولیپید

دکتر عبدالهادی ناجی

سندرم آنتی فسفولیپید (APS) یک بیماری مولتی سیستم اتوایمون می باشد که با ترومبوزهای عود کننده و مکرر شریان ها و وریدها و یا حوادث حاملگی مشخص می شود و همراهی با حضور آنتی بادی های آنتی فسفولیپید دارد. (aPL)

aPL یک گروه هتروژن از آنتی بادی می باشند که بر علیه فسفولیپیدهای آنیونیک یا کمپلکس فسفولیپید پروتئین ها ایجاد می شوند.^۱ در واقع بر علیه فسفولیپید چسبیده به پروتئین های پلازما عکس العمل نشان می دهند و عمدتاً بر علیه β_2 glycoprotein I (β_2 -GP1) و پروترمبین.^{۲,۳} به عبارت دیگر آنتی ژن اساسی که aPL به آن وصل می شود یک فسفولیپید نمی باشد بلکه فسفولیپیدی است که به پروتئین های پلازما اتصال دارند که اساساً شامل β_2 -GP1 و با شیوع کمتر Prothrombin، Annexin V، I، II، پروتئین های S و C، Kininogens، پلازمینوژن بافتی، Anti thrombin III، فاکتورهای XII و XI و VII انعقاد، کمپلمان C۴ و فاکتور کمپلمان H می باشد.^۲

تست های آزمایشگاهی که aPL را تشخیص می دهند شامل تست ایمونواسی مبتنی بر لخته (-Clot based Immunoassays) برای تشخیص لوپوس آنتی کوآگولانت (LA) و (ELISA) / enzyme-linked immunosorbent assays) برای تشخیص anticardiolipin Anti bodies (aCL) و Antibodies anti- β_2 GP1، Anti- β_2 glycoprotein I می باشد.^۱ تشخیص سندرم آنتی فسفولیپید (APS) مبتنی است بر وجود یک نشانه کلینیکی (ترومبوز یا حوادث حاملگی) و حضور دائم

aPL (که حداقل به فاصله ۱۲ هفته دوبار مثبت شوند).^{۱,۲,۳}

APS می‌تواند در افرادی که بیماری زمینه‌ای ندارند ایجاد شود که به نوع تنها و اولیه نامیده می‌شود (PAPS) و یا ثانویه به بیماری‌های اتوایمیون متعددی باشند که شایع‌ترین آن‌ها SLE و سپس RA می‌باشند (SAPS) APS شایع‌ترین علت ترومبوفیلیای (Thrombophilia) اکتسابی است.^۱

APS اولیه در ۲۰ تا ۱۵٪ افراد مبتلا به ترومبوز وریدهای عمیق (DVT) با یا بدون آمبولی ریه دیده می‌شود. در یک سوم بیمارانی که مبتلا به Stroke جدید می‌شوند و سن زیر ۵۰ سال دارند دیده شده و در ۱۵-۱۰٪ خانم‌های حامله‌ای که دچار سقط‌های مکرر می‌شوند دیده می‌شود. APS در بیماران مبتلا به SLE ایجاد بیماری ترمبوآمبولیک زیادی نموده و سبب سقط‌های مکرری در خانم‌های حامله می‌شود.

aPL در ۴۰ تا ۳۰٪ مبتلایان به SLE وجود دارد و ۱۵ تا ۱۰٪ مبتلایان به SLE علائم کلینیکی APS را دارند و aPL در حدود ۲۰٪ مبتلایان به RA وجود دارد.^۱

اپیدمیولوژی

aCL با تیترا پائین و غالباً گذرا در حدود ۱۰٪ افراد نرمال دهندگان خون دیده می‌شود. اگر چه حضور دائم با تیترا متوسط تا بالای aCL aβ2GP1 یا مثبت شدن LA در حدود کمتر از ۱٪ آن‌ها دیده می‌شود.^۳ شیوع مثبت شدن تست aPL با افزایش سن تا ۳٪ افزایش می‌یابد.^۱

aPL مثبت همراه عفونت‌ها، داروها و بدخیمی نیز وجود دارد، اگر چه در چنین مواردی تیترا aPL پائین بوده و گذرا (ناثبت) می‌باشد و لذا سبب افزایش ریسک ترومبوز و حوادث حاملگی نمی‌شود.^۴

بیماران aPL مثبت که بدون علامت می‌باشند احتمال ریسک ترومبوز سالانه آن‌ها کم است. اگرچه بیمارانی که بیماری‌های اتوایمیون دیگری دارند به خصوص SLE در ریسک خیلی بالائی (آخرین حد ریسک) جهت ایجاد ترومبوز قرار دارند.^۲ ریسک قابل تخمین ترومبوآمبولی وریدی با وجود aCL دو برابر و با وجود LA ده برابر می‌شود.

aPL همچنین سبب افزایش ریسک انفارکت قلبی اولیه (MI)، استروک اولیه و استروک‌های مکرر و مرگ می‌شود.^۵ ریسک ترومبوز وریدی در بیماران مبتلا به SLE با داشتن LA تا بیست سال بعد از تشخیص بیماری به ۵۰٪ خواهد رسید.^۵

APS فقط در گروه کوچکی از aPL مثبت‌ها رخ می‌دهد. بروز APS حدود ۵ مورد جدید در هر صد هزار نفر در سال می‌باشد. و شیوع APS حدود ۵۰-۲۰ مورد در هر صد هزار نفر است. APS عمدتاً افراد جوان و بالغین میانسال را مبتلا می‌نماید به‌طوری که ۸۵٪ این بیماران بین سنین ۱۵ تا ۵۰ سالگی مبتلا می‌شوند. APS در خانم‌های خیلی شایع‌تر است تا در آقایان و نسبت آقایان به خانم‌ها بر حسب فرم APS تنوع دارد. در نوع اولیه نسبت آقایان به خانم‌ها ۱/۵۳ بوده و در نوع APS ثانویه ۱/۷ می‌باشد که عمدتاً مبتلا به SLE می‌باشند.^۴ aPL همراهی با فرکانس بالای ترومبوزهای عروقی و حوادث حاملگی و سقط جنین به خصوص در افراد جوان دارد. aPL مثبت در:

- ۱۰٪ افرادی که به DVT مبتلا می‌شوند.
- ۱۱٪ افرادی که به MI مبتلا می‌شوند.
- ۱۳-۱۴٪ افرادی که به Stroke مبتلا می‌شوند.
- ۱۴٪ بیمارانی که دچار بیماری وریدی مکرر ترومبوآمبولیک می‌شوند.
- ۲۰٪ خانم‌های که سه بار یا بیشتر سقط را تجربه نموده‌اند.^{۳،۴}

همراهی aPL مثبت و حوادث حاملگی

- ۱٪ دچار Recurrent miscarriage (RM)
- ۱۱-۲۹٪ دچار پره اکلامپسی
- ۲۵٪ دچار عدم رشد جنین (growth-restricted fetuses) پس در مواقعی که حوادث فوق رخ می‌دهد حداقل باید aPL را ارزیابی نمائیم.^۴
- در ۵۰٪ بیماران مبتلا به SLE مثبت بوده در حالی که شیوع aPL مثبت در سایر بیماری‌های اتوایمیون نسج همبند شامل RA، درماتومیوزیت، Sjogren و سیستمیک اسکروزیس پائین بوده و حدود ۲۰-۵٪ می‌باشد. باید دانست که ۱/۳ افراد aPL مثبت حوادث ترومبوتیک یا عوارض حاملگی را تجربه می‌نمایند.^{۲،۴}
- LA مهم‌ترین عامل قدرتمند پیشگوئی کننده ترومبوز است. LA Positivity ریسک استروک را ۴۸ برابر و ریسک MI را ۱۱ برابر افزایش می‌دهد. Anti-β2GP1 ریسک استروک را دو برابر نموده ولی ریسک MI را تغییر نمی‌دهد.^۶

تشخیص بیماری

برای تشخیص بیماری هنوز از معیارهای تغییر داده شده سیدنی (۲۰۰۶) استفاده می‌شود که شامل:

I- حضور یک نشانه بالینی از نشانه‌های زیر:

۱- وجود نشانه‌های بالینی ترومبوز عروقی که در یک یا چند محل به صورت درگیری شریانی، وریدی یا عروق کوچک بوده و در هر بافت یا عضوی رخ دهد.

۲- الف- حوادث حاملگی که خود را به صورت مرگ یک بار یا بیشتر جنین بدون عوامل توجیه کننده (که از نظر مرفولوژیکی نرمال باشد) و در هفته دهم حاملگی یا بعد از آن رخ دهد.

ب- زایمان زودرس یک بار یا بیشتر که از نظر مرفولوژیکی نوزاد نرمال بوده و قبلاً از هفته ۳۴ حاملگی رخ دهد و به علت اکلامپسی، پره اکلامپسی شدید یا نارسائی جفت باشد.

ج- سقط‌های بدون علت مکرر سه بار یا بیشتر که قبل از هفته دهم حاملگی رخ می‌دهد.

II- معیارهای آزمایشگاهی شامل وجود LA، aCL و/ یا Anti-β2GP1 با تیترا متوسط یا بالا و به طور دائم مثبت باشند و در دو آزمایش به فاصله دوازده هفته مثبت شوند. حضور یک نشانه بالینی و وجود یکی از آنتی‌بادی‌های aPL سبب تشخیص قطعی APS می‌شود.^۲

همانطوری که دیده می‌شود تشخیص APS با این معیارها در حال حاضر صحیح نبوده و این معیار کمبودهای فراوان بالینی و آزمایشگاهی مهمی دارند و هر چه دانش ما در مورد APS بیشتر می‌شود پی به کمبودهای عمده و اساسی در این معیار می‌شویم.

بررسی‌های پاراکلینیکی

شامل تست‌های آزمایشگاهی به خصوص شناخت بیشتر aPL و اتوانتی‌بادی‌های جدید و دیگری که هم کمک به تشخیص نموده و هم پیش آگهی بیماری را رقم می‌زنند.

بررسی ضایعات ایجاد شده در جریان APS

استفاده از سونوگرافی داپلر عمدتاً جهت پیگیری وضعیت جنین و آگاهی از اختلالاتی که در بند ناف، عروق رحمی و جنین رخ می‌دهد.

استفاده از سونوگرافی داپلر برای بررسی DVT

بررسی ریه و کلیه

تست‌های آزمایشگاهی

ترومبوسیتوپنی یک تظاهر شناخته شده APS است و در ۴۶-۱۶٪ این بیماران دیده می‌شود. میزان پلاکت عمدتاً بالای ۵۰ هزار بوده و حدود ۱۰۰ تا ۱۵۰ هزار می‌باشد و به ندرت به کمتر از ۵۰ هزار می‌رسد. بیماری که aPL دارد و ترومبوسیتوپنی به عنوان APS کلاسیفیه نمی‌شود اگر چه این ترکیب به نظر می‌رسد یک حالت قبل از ایجاد ترومبوز باشد و مقدم است بر حمله APS که قرار است شروع شود (هماتولوژیک APS) و به همین دلیل است که قبلاً ترومبوسیتوپنی معیار بوده و هنوز هم به عنوان یک معیار بالینی پیشنهاد می‌شود.

High Mean Platelet Volumes (HMPV) نمایشگر افزایش فعالیت پلاکتی می‌باشد.

آنمی همولیتیک

حدود ۲۰-۱۰٪ مبتلایان به APS تست کومبس مثبت دارند آنمی همولیتیک تقریباً ناشایع است. همراهی ترومبوسیتوپنی و آنمی همولیتیک سندرم Evans را القا می‌کند که به ندرت در بیماران مبتلا به APS دیده می‌شود.^۱

بررسی aPL

آنتی بادی Anti-β₂GP₁ به نظر می‌رسد که نقش مرکزی را در پاتوژنز APS دارد آنتی بادی Anti-β₂GP₁ همراهی با ریسک بالای ایجاد ترومبوز نسبت به aCL یا آنتی بادی‌های بر علیه پروترومبین دارد. β₂GP₁ پنج domains دارد.

اولین دومن دارای سایتی است جهت اتصال برای اکثر Anti-β₂GP₁ در حالی که دومن پنج متصل می‌شود به فسفولیپید های شارژ منفی.

آنتی بادی β₂GP₁ اساسی‌ترین آنتی ژن در APS است و در ابتدا پیشنهاد شده بود به عنوان مهمترین پیشگوئی کننده حوادث بالینی در APS باشد و مطالعات اولیه گذشته نگر متعددی نشان دادند که این آنتی بادی ارتباط نزدیکی با ریسک ایجاد ترومبوز دارد ولی مطالعات جدید نشان می‌دهد

که نقش این آنتی‌بادی در ریسک ایجاد ترومبوز متوسط بوده و OR آن بین ۲/۵ تا ۱/۵ می‌باشد.^۷ به طور خیلی مشخص بیمارانی که دو یا بیش از دو aPL دارند ریسک خیلی بالایی برای ایجاد ترومبوز دارند.^{۷،۸}

مثبت بودن LA خیلی قوی تر با ترومبوزهای شریانی و وریدی نسبت به aCL یا anti-β2GP1 همراهی دارد. مطالعات گذشته نگر و آینده‌نگر همراهی ترومبوز را با حضور aCL نشان نداده‌اند.^{۷،۸} بیمارانی که LA و Anti-β2GP1 دارند به‌طور چشمگیری ریسک ترومبوز در آن‌ها بالا می‌رود (OR=1/4)^۷ بالاترین ریسک ترومبوز در افرادی است که هر سه آنتی‌بادی آن‌ها مثبت شود (aCL, LA, aβ2GP1) که به آن‌ها Triple Positive می‌گویند و بسیار پر خطر می‌باشند.^{۷،۸،۹،۱۰} به عنوان مثال بیماران کاتاستروفیک APS (CAPS) سه آنتی‌بادی مثبت داشته یا Triple Positive می‌باشند.^{۸،۹،۱۰}

در یک مطالعه گذشته نگر بر روی ۱۶۰ بیمار مبتلا به APS که Triple Positive بودند شیوع اضافه شوند ترومبوزهای مکرر در آن‌ها دیده شد: ۱۲/۲٪ بعد از یک سال، ۲۶/۱٪ بعد از ۵ سال و ۴۴/۲٪ بعد از ده سال بود. در دو مطالعه گذشته نگر با Case Control بیمارانی که APS داشته و Triple Positive بودند همچنان ریسک فاکتور بالایی برای حوادث حاملگی (Pregnancy Failure) داشتند. (OR ۴/۱).^{۷،۱۰} آنتی‌بادی Anti-β2GP1 domain ۱-IgG به نظر می‌رسد که به‌طور قدرتمندی همراهی با ایجاد ترومبوز و حوادث حاملگی در مقایسه با آنتی‌بادی‌هایی که بر علیه سایر مناطق این پروتئین ایجاد می‌شوند دارد.^{۷،۸،۹} Pengo و همکاران نشان دادند که Anti-β2GP1 domain 1-IgG تمایل زیادی به ازمان و دایمی بودن دارد و معمولاً تا ۱۲ هفته مثبت باقی می‌ماند و از طرفی با ریسک خیلی بالای ترومبوز و Triple Positive بودن ارتباط دارد.^۷

بررسی سایر اتو آنتی‌بادی‌ها (به جزء aPL) که در APS دیده می‌شوند

مسئله مهم در APS وجود آنتی‌بادی‌های متعددی است که اهمیت زیادی در این بیماری داشته ولی هنوز به عنوان معیار پذیرفته نشده‌اند.

اکثر محققین از آن‌ها به عنوان معیار آزمایشگاهی به خصوص در تشخیص و پیش بینی وخامت بیماری بیماران APS سرونگاتیو توصیه به استفاده می‌نمایند این اتو آنتی‌بادی‌ها شامل:

IgA anti-β2GP1، Anti- Phosphatidylserin/Pro thrombin(aPS/PT)، IgAaCL^{۱،۳،۴،۵} بعضی محققین توصیه می‌نمایند که aPS/PT در رأس تست‌های کلاسیک برای تشخیص APS باشد. این

اتو آنتی بادی به طور عمده همراهی دارد با بیماران Triple Positive^۸. مطالعات متعدد نقش مهم ایزوتوپ IgA را در aPL مشخص نموده‌اند و در صورتی که anti β 2GP1 IgG, IgM, aCL IgG, IgM منفی باشند می‌توان از ایزوتوپ IgA استفاده نمود.^{۱۱} نقش anti β 2GP1 در پاتوژنز APS و ایجاد ترومبوزهای شدید پر اهمیت می‌باشد.^{۱۱}

Non Criteria antibodies

که در پاتوژنز و تشخیص بیماری APS نقش مهم و پایداری دارند و شامل:

anti- Phosphatidylserine/ prothrombin (aPS/PT)
 anti-phosphatidic acid
 anti Vimentin/Cardiolipin Complex
 anti-protein C/S
 anti Factor XII,X
 anti-Annexin A5
 anti-Annexin A2

که در موارد aPL منفی می‌توانیم از آن‌ها جهت تشخیص استفاده نمائیم. در مطالعات سیستماتیک ریویوی جدید شیوع این آنتی بادی که هنوز معیار نمی‌باشند و مقاومت به خاصیت ضد انعقادی Annexin A5 را در مبتلایان به APS نشان داده‌اند. ۱۶ مطالعه گذشته‌نگر با ۱۴۰۴ بیمار مبتلا به APS در مقایسه با ۸۳۹ کنترل را بررسی نمودند، آن‌ها دریافتند که IgA anti β 2GP1 در ۵۶/۳٪ موارد مثبت شد (شایع‌ترین)، سپس Anx A5R در ۵۳/۴٪ مثبت شد و DI-IgG-a β 2GP1 در ۴۴٪ موارد مثبت گردید. که این مطالعات نقش این آنتی‌بادی‌ها در حضور و پاتوژنز APS نشان می‌دهند.^{۱۱}

پاتولوژی تظاهرات عروقی

اگر چه ترومبوز اولین نشانه بالینی APS می‌باشد ولی ضایعات عروقی مزمن نیز شایع می‌باشند. مکانیسم اصلی ضایعات عروقی نامعلوم است ولی تئوری‌های متعددی این واسکولوپاتی را توجیه می‌کنند. در حال حاضر شواهدی مبنی بر فعال شدن مسیر mammalian target of rapamycin (mTORC) وجود دارد که با همراهی aPL سبب ایجاد هیپرپلازی انتیمای عروقی

(پرولیفراسیون اندوتلیال) و فیبروز در کلیه می‌شود. پرولیفراسیون اندوتلیال یک یافته زمینه‌ای مهم در ارتباط با aPL بوده که موجب ایجاد نشانه‌های کلینیکی متعددی می‌شود. در بیماران aPL مثبت حامله حوادث حاملگی ایجاد می‌شود.

واسکولوپاتی (Decidual (DV) تابلوی اساسی است که شامل پرولیفراسیون اندوتلیال و هیپرپلازی آنتیمی سلول‌های عروقی است. واسکولوپاتی Decidual همراهی تنگ‌انگی با وقوع اکلامپسی در حاملگی، محدودیت رشد جنین در داخل رحم و مرگ پری ناتال (perinatal) در بیماران همراه با aPL دارد. اگر این یافته‌ها را کنار هم بگذاریم حضور واسکولوپاتی وابسته به APS را در محل‌های متفاوت با تظاهرات بالینی مختلف توجیه می‌نماید.^{۱۲}

چگونگی صدمات عروقی را ارزیابی نمائیم

۱- بررسی جریان خون شریان براکیال FMD (Flow-mediated dilatary) که بستگی به میزان قطر شریان دارد و شایع‌ترین تکنیکی است که از آن استفاده می‌شود. بررسی میزان جریان خون شریان براکیال با روش High-resolution vascular ultrasound قبل و در حال هیپرامی راکتیو، نشانگر وازودیلاتاسیون به علت تولید Nitric oxide به عنوان پاسخ به استرس می‌باشد که ایجاد افزایش جریان خون می‌کند. عدم گشاد شدن عروق نشانگر کم آزاد شدن مواد داخلی گشاد کننده‌ای عروقی است که به وسیله سلول‌های اندوتلیال ایجاد شده و نشانگر عملکرد نامناسب سلول‌های اندوتلیال می‌باشد. این یافته نشانگر ریسک بالای درگیری کاردیوواسکولار می‌باشد. در بیماران مبتلا به APS متوسط پاسخ FMD شریان براکیال به طور قابل توجهی در مقایسه با افراد سالم مختل می‌باشد. در بیماران مبتلا به APS اولیه کاهش FMD همراهی با مثبت بودن aCL دارد و به طور خیلی شایع‌تر در شرائین در مقایسه با وریدها دیده می‌شود.^{۱۳}

۲ - (PAT) Peripheral arterial tonometry

تکنیکی است که کمتر وابسته به شخص انجام دهنده بوده و اعمال اندوتلیال را بررسی می‌کند. نشان داده شده که هیپرامی در PAT یک مارکر مناسب جهت بررسی تغییرات اعمال عروق در طول زمان می‌باشد. بعلاوه ارتباط نزدیکی با ریسک فاکتورهای قلبی عروقی در مطالعات بزرگ گروه Framingham داشته است.^{۱۴} PAT در افرادی که تغییرات مهمی در اعمال سلول‌های اندوتلیال آن‌ها رخ داده ارتباط قوی با FMD دارد و به علاوه یک ریسک فاکتور قلبی عروقی است.^{۱۲}

۳- تست‌های آزمایشگاهی

یک سری تست‌ها می‌توانند اطلاعاتی در مورد بدکاری سلول‌های اندوتلیال ارائه دهند. - در بیماران مبتلا به APS میزان فاکتور Von- willebrand در پلاسمای خون بالاتر می‌باشد. (نسبت به افراد عادی)

- ملکول‌های چسبنده محلول (s-ICAM1) این بیماران نسبت به افراد کنترل بالاتر است. - افزایش سطح EVs (Extra cellular vesicle) در جریان خون در بیماری‌های متعددی مشاهده می‌شود، از جمله بیماری‌های قلبی عروقی و بیماری‌های ترومبوز وریدی. حضور EVs اندوتلیال و پلاکتی در بیماران مبتلا به APS شرح داده شده است و به نظر می‌رسد به طور مستقیم با aPL ارتباط داشته باشد.

آزمایشات جدیدی مثل سلول‌های اندوتلیال در گردش (Circulent) و اندازه‌گیری لایه‌های glyocalyx جانشین‌های پر قدرتی برای بررسی ضایعه در اندوتلیال در مبتلایان به APS می‌باشند.^{۱۲}

۴- اندازه‌گیری ضخامت انتیما مدیا (IMT) (Intima media thickness) باید دانست که علاوه بر درگیری اندوتلیوم، اختلال عمل سلول‌های عضلات صاف و پرولیفراسیون آن‌ها نیز در بیماران مبتلا به APS شرح داده شده است و یک پیشگویی کننده قابل اعتماد ریسک بیماری شریان‌های کرونر قلبی است.

افزایش IMT و حضور پلاک در شریان‌های کاروتید و فمورال یک ریسک فاکتور قابل پیشگویی برای حوادث بیماری‌های شریانی کرونر قلبی است.

IMT شریان‌های کاروتید در بیماران APS در مقایسه با افراد نرمال افزایش می‌یابد.^{۱۵}

۵- اندکس براکیال مچ پائی (ABI) (Ankle brachial index) یک پیشگویی کننده خوب و ثابت شده برای درگیری عروق محیطی و همچنین برای پیشگویی Storke و حوادث قلبی عروقی است. این روش خیلی ساده، غیره تهاجمی و اقتصادی است. وسایل مورد نیاز: دستگاه فشار خون و پروب داپلر اولتراسوند (Doppler Ultrasound) که به راحتی در مطب قابل اجرا می‌باشد.^{۱۲}

بررسی پاتولوژیک ارگان‌های مهم در جریان APS

۱- پاتولوژی درگیری عروق مغزی

اولین موردی که مورد بررسی پاتولوژیک قرار گرفت خانمی با انفارکت‌های متعدد مغزی و متراکم (Dense) همراه با aPL مثبت بود.

بیوپسی مغزی، هیپرپلازی واضح اندوتلیال عروق کوچک منتر و ناحیه کورتیکال را نشان داد و لومن عروق به وسیله ترومبوز بسته شده بود.

در اتوپسی‌های بعدی از بیماران دیگر، عروق کوچک مغز آن‌ها به وسیله ترومبوز غیر واسکولیتی درگیر شده بود که این درگیری در سایر ارگان مثل قلب، کبد، کلیه و غدد ادرنال نیز وجود داشت. در دیگر بیماران وجود فیبروز مسدود کننده لومن شریان‌ها و هیپرپلازی قابل توجه اندوتلیال نشانگر آن بود که اولین ضایعه به صورت صدمات اندوتلیال به شکل پرولیفراسیون وسیع بوده که منجر به انسداد عروق می‌شود.^{۱۲}

۲- پاتولوژی درگیری عروق ریوی

ترمبوآمبولی شایع‌ترین درگیری ریوی است و به ندرت هیپرتانسیون ریوی (PH) (Pulmonary- Hypertension) و خونریزی منتشر داخل آلوئولی (DAH) دیده می‌شود. هیپرتانسیون شریان ریوی (PAH) نیز یافت می‌شود.

ضایعات Plexiform مهم‌ترین تصویر واسکولوپاتی ریه می‌باشد که همراهی با افزایش شدید فشار شریان ریوی دارد.

پاتوژنز ضایعات Plexiform به صورت پرولیفراسیون غیر طبیعی سلول‌های اندوتلیال بوده که علل پاتوژنیک مختلفی دارد، چون در بیماران aPL مثبت دیده می‌شود، تصور می‌شود که ارتباطی بین aPL و Remodeling اندوتلیال وجود دارد. ضایعات Plexiform اختصاص به بیماری خاصی ندارد، چنانچه ایجاد آن ممکن است توسط آمبولی‌های متعدد ریوی (PE)، التهاب کاپیلرهای ریوی (Pulmonary Capillaritis) بوده یا ممکن است در PH (هیپرتانسیون ریوی) اولیه حضور داشته باشد.^{۱۶} PH می‌تواند به علت ترومبوز in-situ ایجاد شود و ترمبوآمبولی ریه ممکن است ثانویه "DVT" باشد.^۱

پاتولوژی درگیری عروق کلیوی

از نظر بالینی افزایش فشار خون، نارسایی حاد کلیه و پروتئینوری مزمن با شدت کم شایع‌ترین تظاهرات می‌باشند.

نفروپاتی مرتبط با APS از نظر هیستولوژی با ضایعات انسدادی عروقی (Vaso-occlusive Lesion) در عروق داخل کلیوی که همراهی با ترومبوز حاد و ضایعات عروقی مزمن دارد.

این ضایعات شریانی و شریانچه‌ای شبیه همان ضایعاتی است که در مغز، ریه و پوست بیماران مبتلا به APS رخ می‌دهد. در ضایعات مزمن به همان اندازه که در سلول‌های اندوتلیال ضایعه ایجاد می‌شود در سلول‌های عضلانی صاف نیز پرولیفراسیون ایجاد می‌شود.

در APS اکثر ضایعات انسدادی عروق در قسمت‌های پروگزیمال شریان‌های کلیوی بوده و این ضایعات در جدار عروق کاملاً صاف بوده که این نکته (برخلاف تنگی به علت آترواسکلروز می‌باشد که جداری ناصاف دارند).^{۱۲}

ترومبوز ورید کلیوی، تنگی شریان کلیوی، میکروآنژیوپاتی ترومبوتیک، انفارکت کلیه و در نهایت بیماری کلیوی End stage ایجاد می‌نماید.^{۱۷}

پاتولوژی درگیری قلبی

بین ۳۰ تا ۱۵٪ بیماران مبتلا به APS دچار بیماری‌های دریچه‌ای قلب می‌شوند که به نام اندوکاردیت Libman sack یا اندوکاردیت ترومبوتیک غیر باکتریائی شناخته می‌شود. منابع علمی جهان این درگیری را به صورت همراهی با aPL با بیماری‌های دریچه‌ای قلب می‌شناسند. معیارهای درگیری اندوکارد شامل: ضخامت دریچه بیشتر از ۳mm (۳-۴ mm) ضخامت لوکالیزه قسمت پروگزیمال یا میانی دریچه، ندول‌های نامنظم در قسمت دهلیزی دریچه میترال و سطح عروقی دریچه آئورت و / یا نارسایی یا تنگی متوسط تا شدید دریچه درگیر می‌باشد. این ضایعات استریل بوده و ژناسیون فیبرینوز و نئواسکولاریزاسیون نیز دارند. در مراحل پیشرفته: تشکیل پلاک‌های فیبروز، اسکار و کلسیفیکاسیون ممکن است دیده شود.^{۱۷} Ziporen و همکاران رسوب aPL و کمپلمان را در دریچه قلب تغییر شکل داده مبتلا به APS نشان دادند.^{۱۷} به طور کلی قلب یک هدف مهم در APS است.

بیماری شریان‌های کرونر، ترومبوز داخل قلبی، هیپرتروفی بطن چپ و افزایش شریان ریوی ممکن

است ایجاد شود. درگیری عروق کوچک میوکاردی می‌تواند در جریان APS به وفور دیده شود. جدیداً توانسته‌اند تصاویری از تنگی عروق کرونر را در Intracoronary Images نشان دهند.^{۱۲}

پاتولوژی حوادث حاملگی

حوادث حاملگی در بیماران مبتلا APS تصور می‌شود که ثانویه به نارسائی عروق جفت باشد. سقط زودرس (کمتر از ده هفته) در ۳۵٪ و سقط دیررس (بیشتر از ده هفته) ۱۷٪ موارد شایعترین عوارض حاملگی در APS می‌باشند. به دنبال آن‌ها زایمان زودرس ۱۱٪ پره اکلامپسی و/یا اکلامپسی ۵٪ و توقف رشد درون رحمی (IUGR) ۲٪ می‌باشند.^{۱۷}

انفارکت جفت در خیلی از بیماران مبتلا به APS و سقط جنین گزارش شده است. در بیماران aPL مثبت با حوادث حاملگی (Decidual Vaculopathy) DV شمای اصلی است و شامل پرولیفراسیون سلول‌های اندوتلیال یا هیپرپلازی آنتیمال سلول‌های عروقی است. DV همراهی با ایجاد پره اکلامپسی، IUGR، مرگ زودرس (قبل از تولد) در بیمارانی خصوصاً در بیماران که aPL مثبت دارد.

به‌طور میکروسکوپی خیلی از عروق Decidual واسکولوپاتی بارز را همراه با هیپرپلازی انتیما و رسوب فیبرینوئید در دیواره عروق نشان می‌دهند. مثبت بودن LA و aCL(double positivity) یک عامل مهم برای ایجاد انفارکت گسترده بوده که منتج از واسکولوپاتی دیسوال می‌باشد. اگر تمام یافته‌های را جمع بندی نمائیم به این نتیجه می‌رسیم که APS هم یک ترومبوفیلی (Thrombophilia) بوده و هم یک واسکولوپاتی می‌باشد (هر دو باهم).^{۱۲}

بررسی حوادث حاملگی

حاملگی در خانم‌های مبتلا به SLE و/یا APS همراهی با ریسک بالائی برای : سقط‌های مکرر و خودبه خودی، IUGR، زایمان قبل از ترم، پره اکلامپسی، HELLP و ترومبوز عروقی دارد.^{۱۸} در کشور فرانسه انجام آزمایش داپلراولتراسوند جنین به طور اولیه در جریان هر تریمستر در طول حاملگی انجام می‌گردد، زیرا ارزش پیشگویی کننده برای ایجاد حاملگی پرمخاطره به وسیله داپلراولتراسوند به اثبات رسیده است.^{۱۸}

در یک مطالعه دریافتند که بیمارانی که در تریمستر دوم در آزمایش داپلر انجام شده شریان بند ناف غیر طبیعی (waveform) یا سابقه ترومبوفیلیت داشتند ریسک فاکتورهای غیر انکاری برای

مرگ جنین و یا نوزاد محسوب می‌شوند.^{۱۹}

در یک مطالعه ۶ مرگ از ۸ مرگ جنین یا نوزاد در آزمایش داپلر اولتراسوند در تریمستر دوم داپلر غیر طبیعی داشتند.

مطالعات متعدد نشان دادند که جریان خون رحمی غیر طبیعی همراهی با افزایش ریسک پره اکلامپسی و محدودیت رشد جنین در خانم‌های مبتلا به افزایش فشار خون و همچنین در افراد نرمال دارد.^{۱۸} در چند مطالعه بزرگ با انجام آزمایش داپلر اولتراسوند در جنین در تریمستر دوم به عنوان پیش بینی (پیشگوئی) مرگ جنین / نوزاد تازه به دنیا آمده نتایج زیر به دست آمد. یا به عبارت دیگر یافته‌های غیر طبیعی در داپلر اولتراسوند به صورت زیر می‌باشند:

- ۱- بریدگی (دندانه) در شریان رحمی: حساسیت ۶۲/۵٪ و ویژگی ۸۹/۱٪
- ۲- غیر طبیعی بودن شریان بند ناف (waveform) حساسیت ۳۷/۵٪ و ویژگی ۹۴/۷٪
- ۳- محدودیت رشد جنین (IUGR): حساسیت ۲۵٪ و ویژگی ۹۷/۸٪ بود.^{۱۸}

Caruso و همکاران دریافتند که اندکس مقاومت غیر طبیعی شریان‌های رحمی در هفته‌ای ۲۴-۱۸ پیشگوئی کننده بزرگ جهت عوارض حاملگی است.^{۲۰}

Venkat و همکاران در ۱۷۰ بیمار مبتلا به APS دریافتند که وجود شکاف (Notched) مقاوم در شرائین رحمی در هفته‌ای ۲۴-۲۲ پیشگوئی کننده آینده پره اکلامپسی و محدودیت رشد جنین می‌باشند. (این احتمال برای پره اکلامپسی ۱۲/۸ و برای محدودیت رشد جنین ۱۳/۶ بود).^{۲۱}

Kerslake و همکاران نشان دادند که عدم وجود جریان End-diastolic در هفته ۲۰ حاملگی گزینه پیشگوئی کننده بهتر تا وجود aPL مثبت جهت بررسی مرگ جنین است.^{۱۸}

Carmona و همکاران در ۷۷ خانم حامله مبتلا به APS دریافتند که پیش آگهی جنین با غیر طبیعی بودن شریان بند ناف (Doppler velocimetry) در هفته‌های ۲۶-۲۳ ارتباط دارد.^{۲۲}

در جمع بندی: سابقه ترمبوفلیت و نتایج آزمایش داپلر اولتراسوند در تریمستر دوم بهترین پیشگوئی کنندگان برای پیش آگهی دیررس جنین در خانم‌های حامله مبتلا به APS / SLE می‌باشد.^{۱۸} نتایج داپلر اولتراسوند در خانم حامله مبتلا به APS، ممکن است پزشک را وادار به انجام آن حتی هفته‌ای چند بار بنماید.

سایر تست‌های پاراکلینیکی

DVT (Deep Venous Thrombosis) اندام‌های تحتانی شایع‌ترین درگیری وریدی در جریان APS است که می‌تواند منجر به ترومبوآمبولی ریوی بشوند.^{۱،۲،۳}

تشخیص غیر تهاجمی DVT و آمبولی ریه (PE)

اندازه‌گیری آنزیم D-dimer پلاسما به روش ELISA که در بیماران مبتلا به DVT و PE افزایش می‌یابد. حساسیت تست D-dimer در DVT بیشتر از ۸۰٪ بوده و این حساسیت در PE به بالاتر از ۹۵٪ می‌رسد.^{۲۳}

برای بررسی دقیق‌تر DVT می‌توان از اولتراسونوگرافی وریدی و یا سونوگرافی داپلر رنگی وریدی اندام تحتانی استفاده نمود. اگر از نظر بالینی قویاً مشکوک باشیم و با این روش‌ها نتوانیم آن را مشخص نمائیم می‌توان از CT یا Phlebography استفاده نمود.^{۲۳}

تشخیص (PE) (Pulmonary Thromboembolism)

CT ریه همراه با تزریق داخل وریدی ماده کنتراست گزینه اول تشخیص است. اگر بیماری به تزریق کنتراست داخل وریدی حساس باشد از اسکن ریه (Lung scan) استفاده می‌شود.^{۲۳}

بررسی ضایعات دریچه‌ای قلب

از اکوکاردیوگرافی ترانس اوزوفاژیال (Trans esophageal) که از حساسیت خیلی بالائی برخوردار است استفاده می‌شود. از روش (اکوکاردیوگرافی) نیز می‌توان استفاده نمود.^۱ MRI از قلب نیز می‌تواند ضایعات شدید اندوکاردیت Libman sack و ترومبوزهای داخلی قلبی را نشان دهد.^۳

بررسی شرائین مغزی

درگیری شرائین مغزی که عمدتاً منجر به stroke و TIA می‌شوند که شایع‌ترین درگیری شریانی در جریان بیماری APS می‌باشد.^{۱،۲،۳}

MRI انسداد عروقی و انفارکت را که همخوانی با علائم کلینیکی دارند ولی اختصاصی نمی‌باشند

نشان می‌دهد.^۳

در مراحل پیشرفته که بیمار به علت مولتی انفارکت‌ها دچار دمانس می‌شود، MRI می‌تواند تغییرات را که صورت یک یا چندین ضایعه Hyper intence در قسمت‌های سفید مغز ایجاد می‌شوند نشان دهد.^۱

گاهی تظاهرات MRI بیماری APS از MS قابل افتراق نمی‌باشد و گاهی در MRI مغز انفارکت بی‌پاریتال (Biparietal) دیده می‌شود.^۱

آنژیوگرافی یا MR angiography جایگاهی در بررسی ضایعات شریانی مغز در APS ندارد، مگر آن که یافته‌هایی به نفع بیماری درگیر کننده عروق متوسط یا بزرگ را داشته باشیم.^۳ با انجام بعضی تست‌های آزمایشگاهی حتی می‌توان پیش‌آگهی بیماری را هم پیش‌بینی نمود.

اتو آنتی‌بادی‌ها

(در بیماری‌های اتوایمیون مثل لوپوس، اسکلرودرمی، میوزیت‌های التهابی)

دکتر عبدالرحمان رستمیان، دکتر شفیع موثقی، دکتر علی افشاری

اتوآنتی‌بادی‌ها در لوپوس

لوپوس اریتماتوز سیستمیک (SLE) یک بیماری التهابی مزمن با علت ناشناخته است که در خانم‌ها به‌ویژه در سنین باروری شایع‌تر است و می‌تواند هر ارگان یا سیستمی را در بدن مبتلا کند. یکی از ویژگی‌های این بیماری اختلالات ایمونولوژیک و تولید انواع آنتی‌بادی است.

با استفاده از روش antigen-assay وجود یکصد و هشتاد اتو آنتی‌بادی در این بیماری به تایید رسیده است^۱ که شامل اتوآنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن‌های هسته‌ای، سیتوپلاسمیک، غشاء سلول، فسفولیپیدها، سلول‌های خونی، سلول‌های اندوتلیال، سیستم عصبی، پروتئین‌های پلاسما، پروتئین‌های ماتریکس و نیز اتو آنتی‌ژن‌های متفرقه هستند.

نقش پاتوژنیک بسیاری از این دسته‌ی بزرگ اتوآنتی‌بادی‌ها در لوپوس هنوز شناخته نشده و ارتباط آن‌ها با علائم بالینی و سیر بیماری مشخص نیست. در مقابل، برخی از این اتوآنتی‌بادی‌ها از جمله ANA، Anti dsDNA، Anti Sm و آنتی‌فسفولیپیدها علاوه بر اینکه بخشی از کرایتریای

تشخیص لوپوس هستند، در تعیین فعالیت و پیش‌آگهی بیماری نیز به کار می‌روند. شاخص‌ترین این اتوآنتی‌بادی‌ها آنتی‌بادی‌های ضد هسته‌ای (ANA) هستند که (hallmark) بیماری لوپوس می‌باشند و با توجه به این که در یکی از فصول گذشته به تفصیل مورد بحث قرار گرفته‌اند، در این بخش به اجمال به آن‌ها اشاره می‌گردد.

آنتی‌بادی‌های آنتی‌نوکلئار (ANAs)

آنتی‌بادی‌های آنتی‌نوکلئار، اتوآنتی‌بادی‌های متنوع و گسترده‌ای هستند که علیه آنتی‌ژن‌های متعدد داخل سلولی با خواص هسته‌ای مثل DNA یا ریبونوکلوپروتئین‌های کوچک هسته‌ای (SnRNPs) تولید می‌شوند.^۲

در حال حاضر روش استاندارد طلایی (gold standard) برای سنجش این آنتی‌بادی‌ها تست FANA است که ایمونوفلورسانس غیرمستقیم با سوبسترای HEP2 (Human epithelial cell tumor line) می‌باشد.

البته برخی آزمایشگاه‌ها از روش الایزا یا multiplex assay استفاده می‌کنند که صحت تشخیصی نسبت به روش ایمونوفلورسانس در استفاده از این روش‌ها کاهش یافته و با افزایش نتایج منفی کاذب همراه است.^۳

نتیجه‌ی تست FANA با دو پارامتر الگو و تیتراژ گزارش می‌شود.

الگو: در صورت رنگ شدن هسته با ایمونوفلورسانس اغلب از عناوین هموزن، speckled و rim یا پریفرال استفاده می‌شود اما الگوهای دیگری چون سیتوپلاسمیک، سنترال یا نوکلئولار در صورت وجود آنتی‌ژن‌های اینتراسلولار غیرهسته‌ای گزارش می‌شوند.

اگرچه الگوهای مختلف می‌توانند در تشخیص بیماری مولد آنتی‌نوکلئار آنتی‌بادی کمک کننده باشد مثل الگو هموزن یا پریفرال در بیماری لوپوس، اما تنها در حضور یافته‌های بالینی مناسب ارزش تشخیصی داشته و تنها با تکیه بر الگو FANA نمی‌توان بیماری را تشخیص داد.^۳

تیتراژ: تیتراژ برابر یا بالاتر از ۱ به ۴۰ مثبت تلقی می‌شود. اما تیتراژهای بالاتر از ارزش بالینی بالاتر برخوردار هستند.^۳ بعلاوه ممکن است FANA در افراد سالم جامعه به ویژه سالمندان، زنان و نیز اقوام بیماراران مبتلا به بیماری بافت همبند مثبت شود (تا ۳۰٪) که اغلب با تیتراژهای ۱ به ۴۰ تا ۱ به ۸۰ بوده و در تیتراژهای ۱ به ۳۲۰ این عدد به ۳٪ تقلیل می‌یابد که مؤید ارزش بالینی تیتراژهای بالاتر در تست ANA است.^۳

در بیماری لوپوس همان طور که ذکر شد ANA مشخصه بیماری است و با روش ایمونوفلورسانس تست ANA برای لوپوس بسیار حساس بوده و در بیش از ۹۵٪ بیماران مبتلا به لوپوس مثبت می‌شود.^۵

وجود ANA به روش ایمونوفلورسانس یا هر روش معادل دیگر، در صورتی که علل دارویی مطرح نباشد در حال حاضر یکی از معیارهای تشخیصی بیماری لوپوس است.^۶

اما باید در نظر داشت که تست مثبت ANA خاص بیماری لوپوس نیست و علاوه بر اینکه در تیتراهای پایین در افراد نرمال ممکن است مثبت باشد، در بسیاری از بیماری‌های اتوایمیون دیگر از جمله آرتریت روماتوئید، اسکلرودرمی، پلی‌میوزیت و تیروئیدیت اتوایمیون نیز می‌تواند مثبت شود.^۳ بنابراین یک تست مثبت برای اثبات تشخیص لوپوس کافی نیست.

از طرف دیگر، تست منفی ANA می‌تواند به رد تشخیص بیماری لوپوس کمک کند^۷ چون اگرچه لوپوس‌های ANA منفی گزارش شده‌اند، اما این موارد بسیار نادر بوده و به علاوه در این موارد نادر نیز Anti RO که مؤید وجود آنتی‌بادی‌های همراه لوپوس است مثبت می‌شود.

وقتی وجود آنتی‌بادی‌های آنتی‌نوکلئار (ANAs) در بیماری لوپوس تایید گردید، مهم است که مشخص گردد کدام یک از بخش‌های خاص هسته به عنوان آنتی‌ژن هدف تولید آنتی‌بادی است. این آنتی‌ژن‌ها به شکل کلی به دو دسته بزرگ Chromatin-associated و RNP antigens تقسیم می‌شوند.

Chromatin-associated antigens

۱- Anti DNA

- آنتی‌بادی علیه آنتی DNA تک رشته‌ای (ssDNA) برای لوپوس اختصاصی نیست و در بسیاری از بیماری‌ها ممکن است مثبت شود.

- آنتی‌بادی علیه آنتی DNA دو رشته‌ای (dsDNA) یکی از مهمترین تست‌ها در بیماری لوپوس است و اگرچه در تیتراهای پایین در بیماری‌های دیگر مثل شوگرن، آرتریت روماتوئید، اختلالات دیگر و حتی افراد سالم دیده می‌شود.^۸ اما تیترا بالای این آنتی‌بادی برای بیماری لوپوس بسیار اختصاصی است و می‌تواند در تایید تشخیص قطعی کمک کننده باشد^۹ از جایی که این آنتی‌بادی در ۶۰ تا ۷۰٪ بیماران مثبت می‌شود، بنابراین نبودن این آنتی‌بادی رد کننده بیماری لوپوس نیست.

در لوپوس آنتی‌بادی Anti dsDNA ارتباط قوی با نفریت و فعالیت بیماری دارد.^۹ اما باید توجه داشت که علی‌رغم اینکه وجود آنتی DNA درگیری کلیوی را مطرح می‌کند، اما همیشه نشانگر نفریت لوپوسی نیست و برعکس. بعلاوه آنتی dsDNA به تنهایی و بدون در نظر گرفتن مجموعه علائم بالینی ارزش پیش آگهی (Prognostic) بالایی ندارد.^{۱۰}

۲- Anti-histone (نوکلئوزوم)

وجود این آنتی‌بادی‌ها در لوپوس شایع است، اما ارتباط بالینی واضح به دست نیامده و معمولاً برای تشخیص لوپوس دارویی یک تست حساس به شمار می‌آیند. در عین حال در بیماری‌های روماتیسمی دیگر مثل میوزیت، شوگرن و نیز عفونت‌های مزمن مثل EBV دیده می‌شوند.^{۱۱}

۳- دیگر آنتی‌ژن‌های chromatin-associated

شامل PCNA، RNA پلیمراز II و ku هستند که علاوه بر لوپوس در دیگر بیماری‌های روماتیسمی یا غیر روماتیسمی دیده می‌شوند و ارتباط بالینی بین آن‌ها و لوپوس پیدا نشده است.

ریبونوکلئوپروتئین‌ها (Ribonucleic proteins)

۱- Anti-Small Nucleolar Ribonucleolar Proteins (SnRNP)

در بیماری لوپوس شناخته شده‌ترین توان‌آنتی‌بادی‌های SnRNP شامل آنتی Sm و U1RNP هستند. آنتی‌بادی‌های Anti-Sm تنها در ۲۰ تا ۳۰٪ بیماران مثبت می‌شوند، اما برای تشخیص بیماری لوپوس اختصاصی است،^{۱۲} گرچه ارتباط پروگنوستیک یا ارتباط این آنتی‌بادی با فعالیت بیماری لوپوس به دست نیامده است.^{۱۱}

در مقابل آنتی‌بادی‌های Anti U1RNP در ۳۰ تا ۴۰٪ بیماران لوپوس دیده می‌شود و برای این بیماری اختصاصی نیست.^{۱۱}

آنتی‌بادی‌های دیگری از گروه SnRNP ها در لوپوس وجود دارد که اغلب در سندرم‌های Overlap دیده می‌شوند، مثل U2SnRNP و انواع U5 یا U7

۲- anti- La/SS-B و Anti- Ro/SS-A

اغلب در بیماران لوپوس با تست ANA منفی و لوپوس نوزادی دیده می‌شود. در بیماری لوپوس آنتی‌بادی Anti Ro با تظاهرات بالینی مختلف به ویژه تظاهرات پوستی شامل حساسیت به نور، Chilblains و لوپوس پوستی و نیز علایم سندرم سیکا همراه است. در مقابل Anti La بیشتر با لوپوس‌های Late-Onset، شوگرن ثانویه، لوپوس‌های نوزادی همراه است و نیز وجود این آنتی‌بادی مانع ایجاد نفريت Anti Ro associated می‌شود.^{۱۲}

۳- Anti ribosome

شناخته شده ترین آنتی‌بادی آنتی‌ریبوزوم در بیماری لوپوس، آنتی ریبوزومال P پروتئین (anti-P) است که گرچه تنها در معدودی از بیماران مبتلا به لوپوس دیده می‌شوند. به‌ویژه در لوپوس نورو سایکیاتریک و به‌طور کلاسیک سایکوز بسیار اختصاصی هستند.^{۱۱} به علاوه ارتباط بین این آنتی‌بادی با فعالیت بیماری، ابتلای کلیوی، کبدی، هماتولوژیک، آلپسی، Anti DNA و آنتی‌بادی آنتی‌کاردیولیپین گزارش شده است.^{۱۳}

علاوه بر آنتی‌بادی‌های آنتی‌نوکلئولار که به طور خلاصه به آن‌ها اشاره شد و شاخص‌های بیماری لوپوس هستند، آنتی‌بادی‌های بسیار زیاد دیگری ممکن است در بیماران مبتلا به لوپوس مشاهده شوند که علیه اجزا دیگر سلول به جز هسته ایجاد می‌شوند.

آنتی فسفولیپید آنتی‌بادی

این آنتی‌بادی‌ها در ۲۰ تا ۳۰٪ بیماران مبتلا به لوپوس دیده می‌شود.^{۱۴} اما اختصاصی نبوده و در عفونت‌ها، بیماری‌های اتوایمیون، مصرف داروها و نیز در افراد سالم نیز مثبت می‌شود. ممکن است به تنهایی یا همراه با سندرم آنتی فسفولیپید وجود داشته باشند که حدود ۵۰٪ بیماران با آنتی‌بادی آنتی فسفولیپید دچار سندرم آنتی فسفولیپید می‌شوند.^{۱۴}

Anti-galectin

مطالعات در مورد آنتی‌بادی‌های Anti-galectin به عنوان بیومارکر جدید در ایجاد سندرم آنتی فسفولیپید ثانویه در بیماران بسیار مورد توجه قرار گرفته است.^{۱۴} گالکتین‌ها پروتئین‌های glycan-binding هستند و معمولاً پروسه‌های سلول-سلول و سلول-

ماتریکس را تنظیم می کنند و نیز در آپوپتوز و ترشح سیتوکین ها نقش دارند و آنتی گالکتین حدود ۴۰ تا ۸۰ % ممکن است در لوپوس مثبت شده و نوع ۲ این آنتی بادی با لوپوس آنتی کواگولان و آنتی کاردیولیپین آنتی بادی ارتباط دارد.

آنتی بادی های دیگری از جمله آنتی بادی علیه مولکول های سطح سلول، پروتئین های در گردش، آنتی بادی علیه عناصر خونی که می تواند منجر به آنمی همولیتیک، ترومبوسیتوپنی یا نوتروپنی شوند، آنتی بادی علیه جزء ۱ کمپلمان (anti C۱q)، آنتی بادی علیه آنکسین (anti-annexin)، آنتی بادی Anti-a-actinin و آنتی بادی علیه سیتوکین هایی چون IFN α در بیماری لوپوس شرح داده شده اند که در بسیاری از این اتوآنتی بادی ها هنوز ارتباط بالینی واضح با بیماری لوپوس تأیید نشده است.

اسکلرودرمی

اسکلرودرمی نامی است که برای گروه هتروژنی از بیماری هایی به کار می رود که شاخص ترین چهره بالینی آن اسکلروز پوست است، اما با رفتاری های ارگان های مختلفی همراهی دارد. شاخصه های اصلی این بیماری عبارتند از اختلال تنظیم ایمنی، اختلال عروقی و التهاب که منجر به تغییرات فیبروتیک در بافت ها می شود.^{۱۵،۱۶} با توجه به ماهیت سیستمیک این بیماری و نیز وجود موارد هر چند ناشیایی از بیماری سیستمیک بدون درگیری واضح پوستی بسیاری ترجیح می دهند از واژه اسکلروز سیستمیک (Systemic sclerosis یا به اختصار Ssc) به جای اسکلرودرمی استفاده کنند. همان طور که اشاره شد خود ایمنی نقش مهمی در Ssc دارد و به نظر می رسد در پاتوژنز این بیماری نیز نقش اساسی داشته باشد. اتوآنتی بادی های مختلفی در Ssc یافت شده است و تقریباً تمام بیماران یک یا چند اتوآنتی بادی مرتبط با اسکلروز سیستمیک را بروز می دهند. (جدول شماره ۱)^{۱۵}

Antigen	Subtype	Clinical Phenotype
Topoisomerase 1 (Scl70)	Diffuse	Pulmonary fibrosis, cardiac involvement
Centromere (protein B, C)	Limited	Severe digital ischemia, PAH, sicca syndrome, calcinosis
RNA polymerase III	Diffuse	Severe skin disease, tendon rubs, renal crisis ($\pm$ sine scleroderma)
U3-RNP (fibrillarin)	Diffuse or limited	Primary PAH; esophageal, cardiac, and renal involvement; muscular disease
Th/To	Limited	Pulmonary fibrosis, rare renal crisis, lower GI dysfunction
B23	Diffuse or limited	PAH, lung disease
Cardiolipin, β 2 GPI	Limited	PAH, digital loss
PM/Scl	Overlap	Myositis, pulmonary fibrosis, acro-osteolysis
U1-RNP	Overlap	SLE, inflammatory arthritis, pulmonary fibrosis

جدول شماره ۱: انواع اتوآنتی‌بادی‌ها و فنوتیپ‌های وابسته به آن‌ها در اسکلرودرمی

عمده این آنتی‌بادی‌ها علیه اجزائی از هسته عمل می‌کنند و در واقع زیر گروهی از آنتی‌بادی‌های ضد هسته‌ای (ANAs) هستند. ANA در بیش از ۹۵٪ مبتلایان به Ssc یافت می‌شود. با توجه به اینکه در فصول قبل مفصلاً در مورد ANA بحث شده است در این قسمت به آنتی‌بادی‌های اختصاصی Ssc که کاربرد بالینی بیشتری دارند خواهیم پرداخت:

سه آنتی‌بادی از نظر کاربرد بالینی مهم‌تر هستند، چرا که از یک طرف شیوع نسبتاً بیشتری داری دارند و از طرف دیگر با چهره‌های نسبتاً مشخص بیماری همراهی دارند.

این سه آنتی‌بادی عبارتند از: آنتی‌سانترومر (Anti Centromer, ACA)، آنتی توپو ایزومراز یک و آنتی RNA پولی مراز ۳.^{۱۷}

آنتی سانترومر

Ssc همراه با ACA مثبت بیشتر در زنان مسن تر رخ می دهد. درگیری پوستی در این بیماران از نوع محدود است و در برخی بیماران فقط اسکلووداکتیلی وجود دارد. سیر بیماری در بیماران ACA مثبت معمولاً بسیار تدریجی است. در برخی بیماران سندرم CREST با کلسیفیکاسیون های پوستی دیده می شود. پدیده رینود در بیماران ACA مثبت می تواند بسیار شدید باشد و منجر به نکروز انگشتان شود.

درگیری ریوی در صورتی که رخ دهد، به صورت هیپرتانسیون اولیه ریوی است و بیماری بافت بینابینی ریه در این بیماران کمتر دیده می شود.

درگیری کلیوی نیز در حضور ACA مثبت کمتر رخ می دهد. پیش آگهی کلی بیماری در Ssc با ACA مثبت در مقایسه با دو گروه با سایر آنتی بادی ها بعد بهتر است. ۱۵،۱۷،۱۸

آنتی توپویزومراز ۱

این آنتی بادی علیه توپویزومراز یک (Anti Scl 70) عمل می کند. درگیری پوستی در مبتلایان به Ssc با Anti Scl 70 مثبت بیشتر به شکل منتشر است. مهم ترین ارتباط بالینی این آنتی بادی در مورد درگیری ریوی است که به شکل بیماری بافت بینابینی و فیبروز ریه بروز می کند.

حضور همزمان Anti Scl 70 و ACA بسیار نادر است (تقریباً تمام بیماران ACA مثبت Anti Scl 70 منفی هستند و بالعکس)

در مجموع بیماران Anti Scl 70 مثبت پیش آگهی بدتری نسبت به بیماران فاقد این آنتی بادی دارند. ۱۵،۱۸،۱۹

آنتی RNA پولیمراز ۳

درگیری پوستی در همراهی با این آنتی بادی بیشتر به شکل منتشر است و ممکن بسیار سریع پیشرفت کند. بیشترین اهمیت بالینی این آنتی بادی در همراهی آن با درگیری کلیوی است به طوری که ایجاد کریز کلیوی در بیماران فاقد این آنتی بادی بسیار نا شایع است. ۱۵،۱۸،۲۰

کاربرد بالینی اندازه‌گیری اتوانتی بادی‌ها در اسکروز سیستمیک

تشخیص

در موارد کلاسیک اسکرودرمی با سفتی واضح پوست مطابق با الگوی این بیماری انجام تست‌های آزمایشگاهی برای تشخیص بیماری ضروری نیست، اما در مواردی که یافته‌های بالینی کاملاً مطابق با اسکرودرمی نباشد اندازه‌گیری ANA و آنتی بادی‌های سه گانه اختصاصی SSC می‌تواند کمک کننده باشد. در کرایتریای کلاسیفیکاسیون SSC حداکثر ۳ امتیاز برای وجود اتوانتی بادی‌ها در نظر گرفته شده است. (جدول شماره ۲)

با توجه به اینکه ANA در بیش از ۹۵٪ موارد SSC مثبت است در صورت منفی بودن آن باید بیشتر به تشخیص افتراقی‌های سفتی پوست از قبیل دیسکرازی‌های پلاسماسل توجه داشت، به خصوص اگر الگوی درگیری پوستی کاملاً با اسکرودرمی منطبق نباشد.^{۱۷}

Item	Sub-item(s)	Weight/ score¶
Skin thickening of the fingers of both hands extending proximal to the metacarpophalangeal joints (sufficient criterion)	—	9
Skin thickening of the fingers (only count the higher score)	Puffy fingers Sclerodactyly of the fingers (distal to the metacarpophalangeal joints but proximal to the proximal interphalangeal joints)	2 4
ingertip lesions (only count the higher score)	Digital tip ulcers Fingertip pitting scars	2 3
Telangiectasia	—	2
Abnormal nailfold capillaries	—	2
Pulmonary arterial hypertension and/or interstitial lung disease (maximum score is 2)	Pulmonary arterial hypertension Interstitial lung disease	2 2
Raynaud's phenomenon	—	3
SSc-related autoantibodies (anti-centromere, anti-topoisomerase I [anti-Scl-70], anti-RNA polymerase III) (maximum score is 3)	Anticentromere Anti-topoisomerase I Anti-RNA polymerase III	3

ACR: American College of Rheumatology; EULAR: European League Against Rheumatism; SSc: systemic sclerosis.

* These criteria are applicable to any patient considered for inclusion in an SSc study. The criteria are not applicable to patients with skin thickening sparing the fingers or to patients who have a scleroderma-like disorder that better explains their manifestations (eg, nephrogenic sclerosing fibrosis, generalized morphea, eosinophilic fasciitis, scleredema diabeticorum, scleromyxedema, erythromyalgia, porphyria, lichen sclerosis, graft-versus-host disease, diabetic cheiroarthropathy).

¶ The total score is determined by adding the maximum weight (score) in each category. Patients with a total score of ≥ 9 are classified as having definite SSc.

جدول شماره ۲: کرایتریای کلاسیفیکاسیون اسکلودرمی (ACR/EULAR)

رینود

در بررسی پدیده رینود پزشک باید بین رینود اولیه و ثانویه (عمدتاً ناشی از بیماری‌های کلاژن واسکولار از جمله اسکلودرمی) افتراق دهد.

جستجوی شواهد بالینی بیماری‌های روماتولوژیک در این زمینه نقش اصلی را دارد. نقش بررسی اتوانتی بادی‌ها در مواردی که هیچ یافته‌ای دال بر بیماری سیستمیک وجود نداشته باشد محل بحث است، چرا که در نبود شواهد درگیری سیستمیک وجود آنتی بادی (بیماری آزمایشگاهی) لزوماً به معنای بیماری کلاژن واسکولار نیست، اما با توجه به اینکه وجود این آنتی بادی‌ها با افزایش ریسک بروز بیماری سیستمیک در آینده همراه است، می‌تواند بر نحوه پیگیری این بیماران و توجه ویژه پزشک و بیمار به سر نخ‌های بروز بیماری سیستمیک مؤثر باشد، از این رو برخی متخصصین در بررسی رینود آنتی بادی‌های مرتبط به ویژه ANA را اندازه گیری می‌کنند.^{۱۷،۲۰}

اسکلروز سیستمیک بدون اسکلودرمی

در گروه کوچکی از مبتلایان به SSc درگیری‌های سیستمیک بدون درگیری واضح پوستی رخ می‌دهد. آنتی بادی‌های اختصاصی SSc در تشخیص این بیماران نقش مهمی دارند. این وضعیت بر اساس وجود گرفتای‌های سیستمیک (از قبیل اختلال حرکتی مری، درگیری‌های ریوی یا کلیوی منطبق با SSc) و شواهد واسکولوپاتی (رینود، تغییرات بستر ناخن و ...) و وجود

آنتی‌بادی‌های مرتبط با Ssc تشخیص داده می‌شود. ۱۵،۱۷،۲۱،۲۲

در مورد بیماری‌هایی که فقط درگیری سیستمیک و اتوآنتی‌بادی بدون شواهد واسکولوپاتی دارند اختلاف نظر وجود دارد (مثلاً مبتلایان به بیماری بینابینی ریه همراه با Anti Scl 70 مثبت). پرسشی که می‌توان مطرح کرد این است که آیا وجود آنتی‌بادی‌های اختصاصی Ssc در یک بیمار با درگیری ایزوله یک ارگان (مثلاً وجود Anti Scl 70 در بیماری بافت ریه) باعث می‌شود که روش درمان یا پیگیری بیماری تغییر کند؟

متأسفانه با توجه به شیوع پایین این وضعیت و نیز عدم توافق در تعاریف آن و فقدان شواهد کافی و مناسب در مورد سیر و پاسخ درمانی این بیماران در حال حاضر نمی‌توان به این پرسش پاسخی قطعی داد، با این حال شاید منطقی باشد تا زمانی که اطلاعات بیشتری در مورد روند و پاسخ به درمان این بیماران به دست آید ملاحظات مربوط به Ssc در آن‌ها لحاظ شود. ۲۳،۲۴،۲۵،۲۶

پیگیری

با توجه به اینکه حساسیت و اختصاصیت آنتی‌بادی‌های مرتبط با Ssc برای پیامدهای مرتبط بسیار بالا نیست در حال حاضر غربالگری درگیری ارگان‌ها از قبیل درگیری پارانشیم ریه، فشار شریان ریوی و درگیری کلیوی در همه مبتلایان به Ssc فارغ از پروفایل آنتی‌بادی آن‌ها توصیه می‌شود. البته وجود آنتی‌بادی‌های مرتبط با پیامدهای خاص به طور مثال Anti Scl 70 برای بیماری پارانشیم ریه، ACA برای فشار بالای شریان ریوی و آنتی RNA پلیمرز ۳ برای درگیری کلیوی می‌تواند باعث شود پزشک در مورد آن عارضه خاص حساس‌تر باشد و دقیق‌تر سر نخ‌های بالینی و آزمایشگاهی مرتبط با آن را پیگیری کند. این مطلب ممکن است مخصوصاً در مورد آنتی RNA پلیمرز ۳ صادق باشد، چرا که در برخی بررسی‌ها تا یک سوم مبتلایان به Ssc واجد این آنتی‌بادی دچار کریز کلیوی می‌شوند و از سوی دیگر بروز کریز کلیوی در فقدان این آنتی‌بادی بسیار ناشایع است.

به نظر نمی‌رسد اندازه‌گیری متوالی آنتی‌بادی‌ها در ارزیابی فعالیت بیماری کاربرد چندانی داشته

باشد. ۱۵،۱۸،۲۷

نتیجه گیری

در بسیاری از مبتلایان به اسکلوئودرمی با درگیری تیپیک پوستی بیماری به صورت بالینی قابل تشخیص است اما معمولاً ANA به عنوان مؤید بیماری درخواست می‌شود. اگر چه اسکلوئودرمی ANA منفی وجود دارد، در این موارد باید به تشخیص‌های دیگر سفتی پوست توجه ویژه داشت. در موارد آتیپیک که وجود اسکلوئودرمی در بالین قطعی نیست و نیز در مواردی که SSC بدون درگیری پوستی مطرح است اندازه گیری آنتی‌بادی‌های مرتبط با SSC می‌تواند بسیار مفید باشد. بسیاری از پزشکان ۳ آنتی بادی اختصاصی SSC (آنتی‌سانترومر، آنتی RNA پلیمراز ۳ و Anti Scl 70) را در این بیماران اندازه‌گیری می‌کنند. پروفایل آنتی بادی فوق می‌تواند دیدگاه پزشک را نسبت به پیش‌آگهی بیماری و نحوه درگیری‌های سیستمیک احتمالی روشن‌تر کند.

اتوانتی بادی‌ها در پلی میوزیت و درماتومیوزیت

پلی میوزیت یا درماتومیوزیت یک گروه بیماری‌های اتوایمون با درگیری عضلات و پوست هستند که درگیری عضله در آن‌ها به صورت درگیری عضلات قسمت فوقانی یا پروگزیمال اندام‌ها به صورت ضعف پیشرونده و قرینه است و می‌تواند علایم سیستمیک و درگیری اعضای دیگر بدن از جمله پوست، ریه و قلب و... داشته باشد و دارای زیر گروه‌های زیر می‌باشد: ۲۸،۲۹،۳۰

- I - Primary idiopathic polymyositis
- II - Primary idiopathic dermatomyositis
- III - Polymyositis or dermatomyositis associated with malignancy
- IV - Childhood polymyositis or dermatomyositis
- V - Polymyositis or dermatomyositis associated with another connective-tissue disease
- VI - Inclusion body myositis
- VII - Miscellaneous (eg, eosinophilic myositis, myositis ossificans, focal myositis, giant cell myositis)

Necrotizing autoimmune myopathy (NAM)

و anti-synthetase syndrome

تشخیص این بیمارهای اتوایمیون با تست‌های غیر تهاجمی حائز اهمیت است که یکی از راه‌های مهم تشخیصی غیر تهاجمی انجام تست‌های اتوآنتی بادی می‌باشد همچنین در مورد ارتباط علایم بالینی، تشخیص و شدت بیماری هم می‌توان از تست‌های اتوآنتی بادی کمک گرفت.^{۳۱}

حدود ۶۰٪ از بیماران اتوآنتی بادی دارند که یا اختصاصی برای بیماری هستند یا همراهی با این بیماری اتوایمیون دارند.

آنتی بادی‌های غیر اختصاصی در بیماری‌های دیگر اتوایمیون نیز دیده می‌شود مثل آنتی بادی آنتی نوکلئار و اختصاص به بیماری التهابی عضله ندارد.

معمولاً این آنتی بادی‌ها همراه با بیماری‌های دیگر بافت همبند و یا در مخلوط این بیماری‌های اتوایمیون دیده می‌شود.^{۳۲}

اتوآنتی بادی‌های اختصاصی

سه دسته بندی از این اتوآنتی بادی‌ها به شرح زیر است:

- Antibodies to Mi-2, a nuclear helicase
- Antibodies to signal recognition particle (SRP)
- Antibodies to aminoacyl-transfer (t)RNA synthetases (antisynthetase antibodies), including anti-Jo-1

Anti-Mi2 (۱)

این آنتی بادی بیشتر با درماتومیوزیت همراه است. بیماری معمولاً به صورت حاد است و ضایعات پوستی همچون گوثرن و ضایعات پوستی در قفسه سینه دارند و پاسخ به درمان کورتون خوب بوده و پیش آگهی بهتر را نیز نشان می‌دهد.^{۳۳ و ۳۴}

anti- SRP positivity (۲)

که نشانه پلی میوزیت شدید است و پلی میوزیت حاد فرم شایع آن است و مقاومت به درمان بیشتری از خود نشان می‌دهد. درگیری قلبی نیز همراه این فرم از پلی میوزیت می‌باشد.^{۳۶، ۳۵}

Anti-Jo1 myositis- specific antibody (۳)

از اتوانتی‌بادی‌های اختصاصی دیگری است که با سندرمی به صورت درگیری ریه، آرتریت، رینود، تب و همراه است. تا حدود ۲۳٪ از بیماران با پلی‌میوزیت این آنتی‌بادی را دارند. وجود این آنتی‌بادی در بچه‌ها نادر است و در درماتومیوزیت کمتر دیده می‌شود.^{۳۷،۳۸،۳۹} همانطور که گفته شد در دو اتوانتی‌بادی زیر پیش‌آگهی بدتر می‌شود.^{۴۰ و ۴۱}

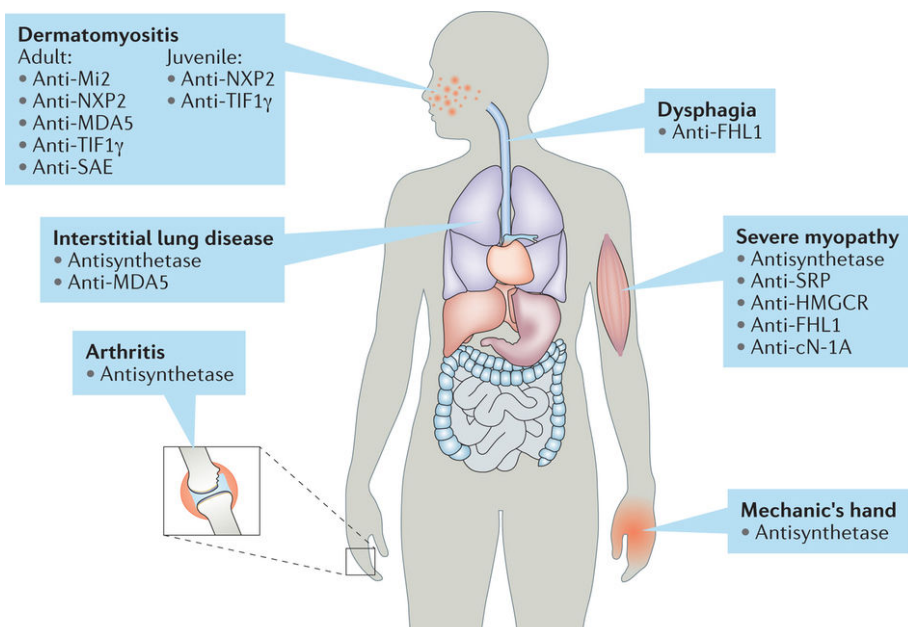
anti-Jo-1 (lung disease)

anti-SRP antibodies (severe muscle disease, cardiac involvement)

البته بعضی آنتی‌بادی‌ها نیز در همراهی با سرطان‌ها بیشتر دیده می‌شود.^{۴۲ و ۴۳} جدول شماره ۳: اتوانتی‌بادی‌ها و علائم همراه را نشان می‌دهد.

Autoantibody	Clinical Associations
Myositis specific autoantibodies	
Anti- tRNA synthetases (Jo-1, PL-7, PL-12, EJ, OJ, KS, Ha, Zo)	PM, DM, anti-synthetase syndrome
Anti-Mi-2	"Classic DM"; lung-sparing
Anti- CADM140 (MDA5)	Clinically amyopathic DM ILD; poor prognosis
Anti-SRP	Severe necrotising myopathy; association with ILD not described
Myositis associated antibodies	
Anti-Ro/SSA	PM/Sjögren's overlap; severe ILD
Anti-PM/Scl	PM/Scleroderma overlap; severe ILD
Anti-Ku	PM/Scleroderma overlap; severe ILD
Anti-U1RNP	PM/SLE overlap; ILD

جدول شماره ۳: اتوانتی‌بادی‌ها و علائم همراه را نشان می‌دهد.



تصویر شماره ۱: درگیرهای اعضاء و اتو آنتی بادی ها را نشان می دهد

آنتی‌بادی‌های ضد سیتوپلاسمی

دکتر سید رضا نجفی زاده، دکتر علی خلوت

گروهی از اتو آنتی‌بادی‌ها عمدتاً از نوع IgG هستند که بر علیه آنتی‌ژن‌های سیتوپلاسمی نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها سنتز می‌شوند. این آنتی‌بادی‌ها اولین بار در سال ۱۹۸۲ توسط Davies و همکارانش در بیمار مبتلا Segmental necrotising glomerulonephritis شناخته و شرح داده شد،^۱ وی در آزمایش ایمونوفلوئورسانس غیر مستقیم رنگ پذیری منتشر سیتوپلاسمی نوتروفیل‌های بیمار را مشاهده و گزارش نمود. در ابتدا تصور می‌شد که این آنتی‌بادی‌ها به دلیل عفونت با ویروس Rose river ایجاد شده‌اند تا این که در سال ۱۹۸۵ woude و همکارانش این آنتی‌بادی‌ها را در بیمار مبتلا به وگنر شناخته و شرح دادند.^۲ چند ماه بعد انواع دیگری از این آنتی‌بادی‌ها را با الگوی اطراف هسته‌ای در نوتروفیل‌های بیماران مبتلا به پلی آنژئیت میکروسکوپی (MPA) و گلومرولونفریت ایدیوپاتیک کرسنتریک نکروزانت مشاهده و شرح داده شدند.^{۳،۴}

اوایل تصور برخی محققین بر این امر بود که این آنتی‌بادی‌ها در همه بیماران رماتیسمی و غیر رماتیسمی فقط بر علیه گرانول‌های آزوروفیلیک سیتوپلاسمی نوتروفیل‌ها تولید می‌شوند، اما بعداً در سال ۱۹۹۸ مشخص شد که این تصور درست نیست و این آنتی‌بادی‌ها می‌توانند بر علیه آنتی‌ژن‌های دیگر نیز تولید شوند اما علیرغم این یافته، نامگذاری ANCA: (Anti neutrophil cytoplasmic antibody) که در اولین کارگاه بین‌المللی در سال

۱۹۸۸ در کشور هلند بیان شد، مورد قبول و استفاده قرار گرفت. آنتی ژن ها MPO و PR۳ نیز به ترتیب در سال های ۱۹۸۸ و ۱۹۸۹ شناخته شدند.

به طور اولیه ANCA به وسیله نوتروفیل های فیکس شده توسط الکل شناسایی می شود. بر طبق راهنمای اولین کارگاه ANCA در سال ۱۹۸۸، نوتروفیل های جدا شده از خون هپارینه شده، سانتریفیوژ شده و به وسیله اتانول بر روی لام فیکس می شود و سپس با رقت های مختلف از سرم بیمار در تماس قرار می گیرد. حال به این لام ها آنتی بادی فلورسئینه شده Anti – human اضافه شده و توسط میکروسکوپ فلورئورسانس دیده می شود.^۵ با این روش سه الگوی فلورئورسانس در زیر میکروسکوپ دیده می شود:

- ◆ فرم سیتوپلاسمیک به شکل (diffuse coarse granular cytoplasmic staining)
- ◆ فرم پری نوکلئار به صورت (perinuclear or nuclear fluorescence staining of the ethanol-fixed neutrophils)
- ◆ فرم آتیپیکال (fine-speckled, linear, or other cytoplasmic staining pattern of ethanolfixed neutrophils)

در حقیقت فرم پری نوکلئار یک آرتیفکت ناشی از ثابت کردن (FIX) نوتروفیل ها توسط الکل است که باعث می شود پروتئین های با بار مثبت در اطراف هسته با بار منفی تجمع و این الگو را ایجاد نمایند،^۶ در صورتی که فیکس کردن نوتروفیل ها را به وسیله فرمالین انجام دهیم این پدیده اتفاق نیفتاده و همه انواع این آنتی بادی ها به الگوی سیتوپلاسمی در زیر میکروسکوپ فلورئورسانس مشاهده خواهند شد. (جدول شماره ۱)

Antigen(s) targeted	Formalin fixation of neutrophils		Ethanol fixation of neutrophils	
	Staining	IIF	Staining	IIF
PR3	Diffuse granular cytoplasmic	c-ANCA	Diffuse granular cytoplasmic	c-ANCA
MPO, LF, LZ CG, AZ, BPI, EL, and others	Diffuse granular cytoplasmic	c-ANCA	Perinuclear cytoplasmic/nuclear	p-ANCA
Uncharacterized cytoplasmic proteins and lamins	Fine-speckled or linear cytoplasmic	a-ANCA	Fine-speckled or linear cytoplasmic	a-ANCA
Nuclear proteins or nucleic acids	Nuclear	ANA	Nuclear/perinuclear cytoplasmic	ANA

:elastase (EL), cathepsin G (CG), azurocidin (AZ), lactoferrin (LF), lysozyme (LZ), and bactericidal/permeability-increasing protein (BPI)

جدول شماره ۱: الگوهای رنگ پذیری ایمونوفلورسانس و اهداف آنتی ژنی اختصاصی ANCA

تفسیر نتایج تست ایمونوفلورسانس در آزمایشگاه‌ها با یکدیگر متفاوت بوده که دلیل آن تفاوت در کیفیت ثابت کردن (FIX) نوتروفیل‌ها، تفاوت در رقت سرم مورد استفاده و تجربه اپراتور انجام دهنده آزمایش می‌باشد.

همان طور که ذکر شد در طی چند سال ارتباط این آنتی‌بادی‌ها با گرانولوماتوز با پلی آنژیت (GPA)، پلی آنژیت میکروسکوپی (MPA) و واسکولیت‌های محدود به کلیه یا پاسی ایمون شناخته شد. این آنتی‌بادی‌ها در ۴۰٪ بیماران مبتلا به چرچ اشتراوس (eosinophilic granulomatosis with polyangiitis) نیز مشاهده می‌شود.

وجود یا عدم وجود این آنتی‌بادی‌ها نقش عمده‌ای در تقسیم بندی و تشخیص واسکولیت‌ها داشته، اگر چه هنوز بحث در مورد نقش این آنتی‌بادی‌ها در پاتوفیزیولوژی این بیماری‌ها وجود دارد.

روش‌های اندازه‌گیری: دو روش عمده اندازه‌گیری این آنتی‌بادی‌ها وجود دارد:

♦ روش ایمونوفلورسانس غیر مستقیم (Indirect Immunofluorescence) که در بالا شرح داده شد و در آن از یک لایه لکوسیت که به وسیله الکل بر روی لام فیکس شده‌اند استفاده می‌شود.

♦ روش Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) که به دو صورت انجام می‌گیرد در روش standard ELISA که آنتی‌ژن استاندارد روی دیواره لوله پلاستیکی مورد آزمایش را پوشانده است و روش capture ELISA که یک آنتی بادی ژن خاصی را شکار (capture) کند.

در این دو تکنیک، روش ایمونوفلوئورسانس حساس‌تر و روش الیزا اختصاصی‌تر است. بنابراین روش ارجح برای تشخیص آنتی‌بادی‌های ANCA انجام هر دو روش در یک بیمار می‌باشد. بدین ترتیب که ابتدا تست ایمونوفلوئورسانس انجام و در صورت مثبت شدن تست از روش الیزا برای تایید و تعیین نوع آنتی‌بادی استفاده می‌کنیم.

تست‌های آزمایشگاهی برای ANCA به صورت یکسان استاندارد نشده بنابراین حساسیت و اختصاصیت در آزمایشگاه‌های مختلف متفاوت بوده و میزان مرجع برای مقادیر نرمال این آنتی‌بادی‌ها نیز تعیین نشده است و بایستی به اعداد نرمال همان آزمایشگاه اکتفا نمود.

در روش ایمونوفلوئورسانس هنگامی که یکی از دو الگوی فلوئورسانس در زیر میکروسکوپ مشاهده شد، حال آزمایش به روش نیمه کمی یا Semi-Quantitative انجام می‌گیرد. بدین صورت که سرم بیمار به نسبت دو برابر با سرم نرمال رقیق شده و این رقیق کردن ادامه داده می‌شود و بعد از هر بار رقیق کردن مجدداً در زیر میکروسکوپ مشاهده می‌شود و عددی که در آزمایش اعلام می‌گردد آخرین رقتی است که هنوز الگوی ایمونوفلوئورسانس آن مثبت بوده است (مثلاً ۱/۲۰ یا ۱/۴۰ یا ۱/۸۰) هرچه تیتراژ آزمایش بالاتر باشد میزان آنتی بادی هم بیشتر بوده است.^{۵۶}

نهایتاً در آینده تست‌های الیزای جدید که استاندارد شده و خیلی حساس و اختصاصی برای تشخیص این آنتی بادی‌ها هستند (third generation ELISA and multiplex technology) جایگزین روش ایمونوفلوئورسانس و الیزا فعلی خواهند شد.

در واسکولیت‌ها دو آنتی‌ژن که بر علیه آن‌ها آنتی‌بادی ساخته می‌شود Proteinase 3 و Myeloperoxidase می‌باشد. این آنتی‌ژن‌ها در گرانول‌های آزوروفیلیک نوتروفیل‌ها و لیزوزم‌های حاوی پراکسیداز مونوسیت‌ها مشاهده می‌شوند. PR3 یک سرین پروتئاز با وزن مولکولی ۲۹ کیلو دالتون و ۲۲۹ اسید آمینه می‌باشد این ماده دارای خاصیت ضد باکتری بوده که این خاصیت جدا از خاصیت آنزیمی آن است به عنوان یک آنزیم می‌تواند باعث آسیب بافتی و تخریب باکتری‌های فاگوسیت شده شود.

میلوپراکسیداز (MPO) نیز با وزن مولکولی ۱۵۰ کیلو دالتون باعث تولید موادی مثل اسید

هیپوکلروس یا H_2O_2 توسط نوتروفیل ها می شود. هر دوی این آنزیم ها نقش مهمی در دفاع میزبان در از بین بردن میکروب ها و عوامل خارجی ایفا می کنند.^{۷,۸}

الگوهای ایمونوفلئورسانس در واسکولیت ها

وقتی سرم افراد مبتلا به واسکولیت های همراه با ANCA را در مجاورت نوتروفیل های ثابت شده با الکل قرار می دهند دو الگوی عمده ایمونوفلئورسانس مشاهده می شود:

♦ فرم سیتوپلاسمیک که در این الگو ماده فلئورسانس به صورت منتشر در سرتاسر سیتوپلاسم پراکنده شده است. در اغلب موارد عامل ایجاد این نوع الگوی فلئورسانس آنتی بادی بر علیه آنتی ژن PR3 می باشد، اما گاهی به دلایل ناشناخته آنتی بادی بر علیه MPO نیز می تواند این الگو را ایجاد نماید.^۹

♦ فرم اطراف هسته ای که ناشی از تجمع ماده فلئورسانس در آن ناحیه است و علت مشاهده آن اشکالی است که در هنگام ثابت کردن نوتروفیل ها با الکل ایجاد می شود. بدین ترتیب وقتی که نوتروفیل ها را به وسیله الکل ثابت می کنیم گرانول های حاوی پراکسیداز و سایر آنزیم هایی که هدف آنتی بادی های P-ANCA هستند در PH:7 قویاً دارای بار مثبت هستند پس در اطراف هسته که دارای بار منفی است جمع می شوند و ایجاد کننده این الگو در این آزمایش می شوند، در بیماران مبتلا به واسکولیت این الگوی فلئورسانس به خاطر وجود آنتی بادی بر علیه MPO است.^{۱۰}

الگوهای ایمونوفلئورسانس در بیماری های غیر واسکولیتی

الگوهای ایمونوفلئورسانس آتیپیک ANCA ممکن است در بیماری های غیر واسکولیتی ولی وابسته به سیستم ایمنی همچون بیماری های کلاژن واسکولار، بیماری های التهابی روده و هپاتیت اتوایمیون مشاهده شوند. این الگوهای آتیپیک ممکن است با الگوی پری نوکلئار اشتباه شوند اما در این بیماران انجام تست به روش الیزا بر علیه پروتئین های MPO و PR3 منفی خواهد بود.^{۱۱}

خطاها در تفسیر نتایج ایمونوفلئورسانس

به دلایل مختلف بایستی در تفسیر نتایج آزمایش ANCA به روش ایمونوفلئورسانس دقت مضاعف به خرج دهیم:

- ♦ جزئی از مشاهده و تفسیر نتایج آزمایش وابسته به تکنسین انجام دهنده آزمایش می‌باشد و الگوی مشاهده شده در زیر میکروسکوپ در بعضی مواقع خیلی واضح و مشخص نیست و وابسته به تفسیر فرد مشاهده کننده است. بنابراین مثبت یا منفی بودن این تست بستگی مستقیم به تجربه فرد آزمایش کننده دارد. بنابراین ارزش اخباری مثبت و منفی این آزمایش در یک آزمایشگاه تحقیقاتی، بهتر و بالاتر از یک آزمایشگاه عمومی و تجاری است.^{۱۲}
- ♦ تست ANCA هنوز استاندارد نشده و مرجعی برای مقادیر نرمال وجود ندارد. باید مدنظر داشت که در اغلب مطالعات بر روی ANCA آزمایشات در یک آزمایشگاه تحقیقاتی صورت گرفته و نتیجه و تفسیر این نتایج از چنین آزمایشگاهی به دست آمده است، اما ما در کار بالینی روزمره که چنین آزمایشگاه‌هایی در اختیار نداریم در تفسیر بالینی نتایج آزمایشگاه‌های عمومی بایستی قدری تأمل و دقت داشته باشیم.^{۱۳}
- ♦ برای تشخیص واسکولیت‌ها نتایج به دست آمده از روش ایمونوفلوئورسانس خیلی اختصاصی نیست. الگوی سیتوپلاسمیک اختصاصیت بیشتری نسبت به الگوی اطراف هسته‌ای برای تشخیص واسکولیت‌ها دارد. اما حتی در الگوهای سیتوپلاسمی تفسیر نتایج بایستی با دقت صورت گیرد به طور مثال، در یک مطالعه با روش ایمونوفلوئورسانس ANCA مثبت با الگوی سیتوپلاسمی تنها در ۵۰٪ موارد همراه با واسکولیت بوده است.^{۱۴}
- ♦ آنتی بادی بر علیه پروتئین‌های گرانول‌های آزوروفیلیک می‌تواند باعث ایجاد الگوی اطراف هسته‌ای ANCA شود. این آنتی بادی‌ها می‌توانند بر علیه آنتی ژن‌هایی مانند لاکتوفرین، الاستاز، کاتپسین G، کاتالاز، لیزوزیم یا بتا گلوکوروניداز باشد. یک تست ایمونوفلوئورسانس ANCA با الگوی اطراف هسته‌ای می‌تواند در گروهی از بیماری‌های التهابی مشاهده شده و اختصاصیت کمی برای واسکولیت‌ها دارد. در هر صورت هر تست مثبت ANCA به روش ایمونوفلوئورسانس نیازمند تایید به روش الیزا است تا آنتی‌بادی اختصاصی ایجاد کننده این الگوی ایمونوفلوئورسانس مشخص شود.^{۱۴}

افتراق ANCA مثبت با الگوی اطراف هسته‌ای از الگویی که آنتی بادی‌های ضد هسته (ANA) ایجاد می‌کنند بسیار سخت و دشوار است، به همین دلیل در افراد دارای ANA مثبت ممکن است در آزمایشگاه به طور کاذب برای آن‌ها P-ANCA مثبت گزارش شود. پس در بیماران با ANA مثبت تست ANCA مثبت با الگوی اطراف هسته‌ای بایستی مثبت کاذب تلقی شود. برای جلوگیری از

مشاهده نتایج P-ANCA مثبت کاذب بایستی لکوسیت ها را هم با فرمالین و هم الکل فیکس نمود. فیکس کردن لکوسیت ها به وسیله فرمالین مانع تجمع گرانول های آزوروفیلیک حاوی پراکسیداز با بار مثبت در اطراف هسته می شود. بنابراین نتایج با روش ثابت کردن فرمالین مثبت کاذب نخواهد داشت.

کیت های الیزا برای آنتی بادی بر علیه PR3 و MPO وجود داشته و بایستی جز آزمایشات ما باشد. نتایج مثبت به روش الیزا دارای اختصاصیت بیشتر و ارزش اخباری بالاتری نسبت به روش ایمونوفلورسانس می باشد. اما در این روش نیز امکان خطا در صورتی که توسط اپراتور با تجربه انجام نشود، وجود خواهد داشت.^۸

همراهی این آنتی بادی ها با بیماری ها

این اتو آنتی بادی ها در بسیاری از بیماران مبتلا GPA، MPA، چرچ اشتراوس، واسکولیت ایزوله کلیوی و بعضی از واسکولیت های دارویی دیده می شود. این آنتی بادی ها می توانند بر علیه PR3 یا MPO باشند اما تقریباً هیچ گاه همزمان بر علیه هر دو نوع آنتی ژن نخواهند بود. در یک حالت آن هم در مصرف لوامیزول، آنتی بادی به صورت همزمان می تواند بر علیه هر دو نوع آنتی ژن ایجاد شود در این فرم واسکولوپاتی ضایعات گانگرنه در پوست ایجاد می شود.^{۱۵}

بر خلاف این موارد، پان کلاسیک همراهی با این آنتی بادی ها ندارد و وجود یکی از این آنتی بادی ها نشان دهنده سایر تشخیص ها است. روز به روز محققین و کلینیسین های با تجربه بیشتر به این موضوع معتقد می شوند که در واسکولیت های همراه با ANCA یافتن اینکه این آنتی بادی بر علیه PR3 یا MPO است به همان اندازه که در بالین بین دو نوع واسکولیت GPA یا MPA افتراق قائل شویم با اهمیت می باشد.^{۱۶}

در یک مطالعه بر روی بیماران مبتلا به GPA یا MPA، وجود ANCA-PR3 بیشتر همراهی با درگیری گوش، بینی، گلو و دستگاه تنفسی داشته در حالی که MPO-ANCA بیشتر همراهی با درگیری کلیوی، پوستی و ریوی داشته است.

روش اندازه گیری

C-ANCA از نمونه سرمی که از خون بیمار به دست آمده است اندازه‌گیری می‌شود. عواملی که باعث مخدوش شدن نتایج آزمایش می‌شوند شامل لیپمی، همولیز شدید و آلودگی میکروبی می‌باشند. نمونه سرم تا هنگام آزمایش بایستی در یخچال نگهداری شود. در صورت مثبت بودن تست ایمونوفلوئورسانس غیر مستقیم جهت تایید آن آزمایش به روش الیزا بایستی تکرار شود.^{۱۷}

گرانولوماتوز با پلی آنژئیت

بیشتر از ۹۰٪ بیماران مبتلا به فرم‌های فعال و منتشر GPA دارای آنتی بادی ANCA هستند. روشن است که گروه کوچکی از بیماران فعال فاقد این آنتی بادی می‌باشند. علاوه بر این در فرم‌های لوکالیزه این بیماری که کلیه‌ها درگیر نیستند تا ۴۰٪ از بیماران فاقد این آنتی بادی می‌باشند. بنابراین فقدان این آنتی بادی در یک بیمار با علائم کلاسیک تشخیص GPA را رد نمی‌کند. در حقیقت حساسیت تست PR3-ANCA برای GPA مرتبط با میزان فعالیت بیماری در هنگام انجام آزمایش می‌باشد. هرچه بیماری فعال‌تر باشد احتمال مثبت شدن تست نیز افزایش می‌یابد. در بیماران مبتلا به GPA با ANCA مثبت در ۹۰-۸۰٪ موارد این آنتی بادی بر علیه PR3 است، در باقی موارد این آنتی بادی بر علیه آنتی‌ژن MPO خواهد بود. مثبت شدن همزمان تست‌های C-ANCA و PR3-ANCA در یک بیمار، اختصاصیت بیشتر از ۹۹٪ درصد برای GPA را دارد.^{۱۸} آزمایش C-ANCA دارای اختصاصیت بسیار بالا برای تشخیص گرانولوماتوز و گتر است اما در موارد بسیار نادری در بیماری سل، هوچکین، عفونت با HIV و میلوم مولتیپل نیز می‌تواند مثبت شود.

پلی آنژئیت میکروسکوپی

تقریباً ۹۰٪ بیماران MPA دارای آنتی بادی ANCA هستند. در این بیماران بر خلاف GPA اکثریت بیماران دارای MPO-ANCA بوده و گروه کوچکی از آن‌ها PR3-ANCA دارند. بنابراین تشخیص این دو واسکولیت تنها بر اساس نوع آنتی بادی ANCA امکان پذیر نیست. تشخیص آن‌ها بر اساس پاتولوژی و نوع درگیری بالینی حائز اهمیت می‌باشد زیرا در GPA عود بیماری بعد از کنترل بیماری شایع بوده در حالی که در MPA عود کمتر مشاهده می‌شود.

همچنین افتراق MPA از پان کلاسیک ضروری است زیرا در ۹۰٪ بیماران مبتلا به MPA آزمایش ANCA مثبت بوده در حالی که در پان کلاسیک این نوع از آنتی بادی‌ها منفی هستند.^{۱۹}

پلی آنژیت همراه با گرانولوماتوز ائوزینوفیلیک (چرچ اشتراوس)

ANCA از نوع MPO و PR3 در این بیماران با درصدهای متفاوت می‌تواند مثبت شود ولی به طور کلی حدود ۵۰٪ بیماران دارای ANCA مثبت هستند که در صورت فعال بودن بیماری این میزان افزایش خواهد یافت. به صورت کلی MPO-ANCA در این بیماران شایع‌تر می‌باشد. بعضی مطالعات نشان داده‌اند که مثبت یا منفی بودن ANCA با شکل‌های بالینی متفاوت همراه بود، طوری که در بیماران با ANCA مثبت احتمال گلودرولونفریت، خونریزی آلئولی و درگیری نورولوژیک بیشتر بوده در حالی که در بیماران با ANCA منفی احتمال درگیری قلبی و ریوی بیشتر خواهد بود.^{۲۰}

Anti-GBM autoantibody diseases

بین ۴۰-۱۰٪ از افراد مبتلا به بیماری‌های مرتبط با این اتوانتی‌بادی دارای آنتی‌بادی ANCA هستند، این نوع آنتی‌بادی بیشتر نوع MPO-ANCA می‌باشد. در این بیماری کسانی که دارای هر دو نوع آنتی‌بادی Anti-GBM و ANCA هستند، احتمال عود بیماری بعد از کنترل شدن حمله اولیه بیشتر از کسانی است که تنها Anti-GBM مثبت دارند. اما در این دو گروه از بیماران علائم اولیه و شروع کننده بیماری یکسان خواهد بود. همچنین در بعضی مطالعات نشان داده شده که در بیماران با مثبت بودن هر دو نوع آنتی‌بادی پیش‌آگهی درگیری کلیه بدتر خواهد بود.^{۲۱}

واسکولیت‌های ناشی از دارو همراه با ANCA مثبت

داروهای خاصی می‌توانند باعث واسکولیت همراه با ANCA مثبت شوند. در این بیماران آنتی‌بادی از نوع MPO-ANCA و با تیترا بالا دیده می‌شود. همچنین در تعدادی از این بیماران آنتی‌بادی ANCA بر علیه الاستاز و لاکتوفرین نیز قابل مشاهده می‌باشد.^{۲۲}

داروی پروپیل تیوآوراسیل و داروهایی مثل متی مازول می‌توانند باعث مثبت شدن تست ANCA بدون علائم بالینی شوند، حدود یک سوم از این افراد دچار گلودرولونفریت خواهند شد. اغلب بیماران دچار واسکولیت‌های دارویی که با ANCA مثبت همراه می‌باشد علائم بدنی، آرترالژی یا آرتریت و واسکولیت‌های پوستی را خواهند داشت اما گلودرولونفریت‌های کرسنتیک (Crescentic) و خونریزی آلئولی نیز می‌تواند ایجاد شود.

داروهایی که بیشتر باعث واسکولیت و ANCA مثبت می‌شوند شامل پروپیل تیوآوراسیل،

متی مازول، کاربی مازول، هیدرالازین و مینوسیکلین هستند. اما داروهای دیگری نیز می‌توانند باعث ایجاد واسکولیت همراه با ANCA شوند، این داروها شامل آلپورینول، پنی سیلامین، پروکاینامید، کلوزاپین، فنی توئین، ریفامپین، سفوتاکسیم، ایزونیازید و ایندومتاسین هستند. اما ارتباط ایجاد واسکولیت با این داروها به خوبی داروهای بالا مشخص نیست.^{۲۲}

سایر بیماری‌های رماتیسمی

ANCA تقریباً در تمامی بیماری‌های التهابی رماتیسمی می‌تواند مشاهده شود الگوی فلوئورسانس در این بیماری‌ها به صورت اطراف هسته‌ای است اما فرم‌های سیتوپلاسمی بسیار نادر می‌باشند. در خیلی از این بیماران ANCA تنها در روش ایمونوفلوئورسانس مثبت بوده و در روش الیزا، نتیجه منفی گزارش خواهد شد. که دلیل آن نیز وجود آنتی بادی بر علیه سایر آنتی ژن‌های گرانول‌های آزروروفیلیک نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها می‌باشد.^{۲۳}

بیماری‌های غیر رماتیسمی

آزمایش ANCA در ۶۰-۸۰٪ بیماران مبتلا به کولیت اولسراتیو و کلانژیت اسکروزان اولیه می‌تواند مثبت شود. این آزمایش در ۲۷-۱۰٪ از بیماران مبتلا به کرون مثبت خواهد بود. الگوی فلوئورسانس از نوع اطراف هسته‌ای بوده و هدف این آنتی‌بادی، آنتی‌ژن‌های دیگر غیر از MPO خواهد بود.^{۲۴}

آزمایش مثبت ANCA با الگوی سیتوپلاسمی و بر علیه PR3 در بیماران مبتلا به آندوکاردیت باکتریال تحت حاد و دیگر فرم‌های باکتری می‌تواند مشاهده شود. بنابراین منطقی است در بیماران که می‌خواهیم تشخیص واسکولیت‌های همراه با ANCA را بگذاریم یا بیماران که تنها ANCA مثبت دارند علاوه بر بررسی‌های لازم کشت خون نیز انجام گردد.^{۲۵}

همچنین در کسانی که دچار عفونت‌های مزمن هستند یا کسانی که مقاومت طبیعی مقابل میکروب‌ها را ندارند مثل بیماران سیستمیک فیبروزیس یا برونشکتازی، آنتی بادی P-ANCA که بر علیه آنتی‌ژن MPO نیست می‌تواند مشاهده شود.^{۲۶}

کاربرد بالینی

با توجه به استفاده‌های فراوان از تست ANCA به صورت درست و نادرست نکاتی را در ذهن ایجاد شده که بایستی به آن‌ها پاسخ داد:

۱. آزمایش مثبت ANCA به روش ایمونوفلورسانس حتماً بایستی توسط الیزا تایید شود.^{۲۷}
۲. آزمایش ANCA منفی رد کننده واسکولیت های عروق کوچک نیست، حدود ۴۰٪ بیماران مبتلا به GPA که درگیری ارگان‌های حیاتی را ندارند و ۱۰٪ از این بیماران با درگیری ارگان‌های حیاتی آزمایش ANCA منفی دارند. همچنین ۳۰٪ از بیماران مبتلا به MPA و بیماران مبتلا به چرچ اشتراوس ANCA منفی خواهند داشت.^{۲۸}
۳. مثبت بودن تست ANCA با هر دو روش الیزا و ایمونوفلورسانس، دارای اختصاصیت بالا برای تشخیص در بیمار مشکوک به GPA می‌باشد و تنها در هنگامی که علائم بالینی به صورت کلاسیک بوده و شکی باقی نماند می‌توان از بیوپسی بافتی برای تایید تشخیص خود داری نمود در غیر این صورت، با وجود علائم غیر کلاسیک و صرفاً با وجود آزمایش مثبت تایید تشخیص منوط به بیوپسی بافتی است.^{۲۸}
۴. در بیمار مبتلا به GPA صرف افزایش ANCA بدون شواهد بالینی را نباید عود بیماری تلقی نمود زیرا تشدید درمان با افزایش دوز کورتون و سیتوتوکسیک در ۳۰٪ از بیماران باعث تحمیل درمان سنگین بدون عود بالینی خواهد بود.^{۲۹}
۵. منفی شدن آزمایش ANCA در بیمار مبتلا به GPA زیر درمان طبی می‌تواند معیار خوبی برای خاموشی بیمار باشد اما باید در نظر داشت ۸٪ از بیماران علیرغم ANCA منفی حین درمان عود بیماری را تجربه نموده‌اند.^{۳۰}