

Standaryzacja metod oznaczania autoprzeciwciał markerowych w ramach ECFS – cele a realne efekty

Standardization of the methods of “markers” autoantibody assessment in the ECFS projects – aims and real achievements

Jakub Ząbek

Zakład Mikrobiologii i Serologii Instytutu Reumatologii im. prof. dr hab. med. Eleonory Reicher w Warszawie,
kierownik Zakładu doc. dr hab. biol. Jakub Ząbek, dyrektor Instytutu prof. dr hab. med. Sławomir Maśliński

Słowa kluczowe: autoimmunizacja, autoprzeciwciała markerowe, standaryzacja metod oznaczania.

Key words: autoimmunity, markers autoantibody, standardization methods of assessment.

Streszczenie

Autoimmunizacja to stan permanentnej obecności w surowicach pacjentów autoprzeciwciał i autoreaktywnych limfocytów T, które występują i są zaangażowane w patomechanizmy występujące także w chorobach tkanki łącznej. Poza tym przeciwciała te są uznane za markery ww. jednostek chorobowych.

Począwszy od roku 1980 r., klinicyści zajmujący się pracami badawczymi byli zaangażowani w prace, których celem była standaryzacja surowic wzorcowych dla oznaczania przeciwciał przeciwjądrowych. Także w 1980 r. Fundacja Reumatologiczna w USA we współpracy z CDC założyła Komitet ds. Serologii Przeciwciał Przeciwjądrowych. Już w 1982 r. dostępnych było 5 surowic standardowych. W następstwie tej inicjatywy pracę Komitetu ds. Serologii ANA poparły następujące organizacje: ILAR, IUIS i WHO, zaś bank surowic referencyjnych w CDC rozrósł się do 10.

Już w pierwszym z warsztatów standaryzacyjnych (*Workshop*) (1989–1992) uczestniczyły 3 państwa byłego bloku wschodniego (Czechosłowacja, Węgry i Słowenia) i to właśnie przedstawiciele tych państw ustanowili grupę inicjatywną, która w latach 1993–94 utworzyła *Central and East European Consensus Workshop for Standardization of Autoantibodies to Intracellular Antigens*.

Zakład Mikrobiologii i Serologii IR od samego początku aktywnie uczestniczy w pracach tej grupy i w 1995 r. zorganizował w Warszawie II *Spotkanie robocze ds. standaryzacji autoprzeciwciał dla antygenów wewnątrzkomórkowych*.

Zakład Mikrobiologii i Serologii IR, widząc oczywiste korzyści z udziału w pracach EFCS, jest zdecydowany nadal brać w nich udział.

Summary

Autoimmunity is a such state of the immune system when in the sera of patients suffering on CTD-s permanently persist autoantibodies and autoreactive lymphocytes T suspected to be involved in pathomechanisms of the disease. Beside, these autoantibodies are recognized as a “markers” for particular disease. Since 1980, clinical investigators in the United States have been engaged in efforts to standardize reference sera for antinuclear antibody determinations. In 1980, the Arthritis Foundations in the United States in collaboration with the Centers for Disease Control established a Committee on Antinuclear Antibody Serology. In 1982, five reference reagents were made available.

Following this initial activity several international organizations expressed support for expansion of these activities. These organizations were the ILAR, IUIS and WHO. The total number of reference reagents available in the CDC depository in 1988 comprised ten different sera.

In 1988-89 laboratories in Europe have established active collaborations with the purpose of standardizing ANA methodology. Four laboratories from Eastern-Block countries establish in 1993/4 Eastern and Central Group European Consensus Workshop for Standardization of Autoantibodies to Intracellular Antigens.

Department of Microbiology and Serology from the beginning actively participates in the projects of this Standardization Group, and in 1995 had organized in Warsaw Second Meeting of the CEECWSAIA.

Department of Microbiology and Serology IR see evident benefits from the participation in the EFCS works and is dedicated to remain an active participants of the EFCS.

Adres do korespondencji:

doc. dr hab. biol. Jakub Ząbek, Zakład Mikrobiologii i Serologii, Instytut Reumatologii im. prof. dr hab. med. E. Reicher, ul. Spartańska 1, 02-637 Warszawa

Praca wpłynęła: 1.06.2005 r.

Autoimmunizacja to stan permanentnego występowania w krążeniu przeciwciał (autoprzeciwciał) i komórek (autoreaktywnych limfocytów), skierowanych przeciwko antygenom własnoustrojowym gospodarza, spowodowany przez wrodzone lub nabyte defekty układu odpornościowego, a towarzyszący m.in. dużej grupie schorzeń układowych tkanki łącznej.

Szczególnie istotne znaczenie diagnostyczne mają przeciwciała skierowane przeciwko różnym składnikom białkowym i niebiałkowym jądra komórkowego (antygeny jądrowe – dsDNA, ssDNA, histon, nukleohiston, antygen Scl-70, białka centromerowe) oraz antygenom białkowym, występującym w cytoplazmie, organelach komórkowych lub błonie komórkowej, zaangażowanym w procesy zainicjowane w jądrze komórkowym (białka rybosomalne, antygen Jo-1 oraz inne aminoacrylo-tRNA-syntetazy) [1, 2].

Oznaczenie obecności oraz mian lub poziomów wyżej opisanych autoprzeciwciał przeciwko antygenom komórkowym wykonuje się zasadniczo z 3 następujących powodów: obecność autoprzeciwciał może być patognomoniczna dla danej choroby, miano zaś niektórych autoprzeciwciał odzwierciedla aktywność procesu chorobowego, a obecność danego przeciwciała koreluje z określonymi objawami klinicznymi (czyli ma znaczenie prognostyczne).

Liczba oznaczanych różnymi metodami autoprzeciwciał sięga kilkudziesięciu i stale się zwiększa.

Niestety, szeroko pojęte znaczenie diagnostyczne tylko niewielu autoprzeciwciał jest dobrze ustalone, a znaczenie pozostałych, zwłaszcza nowo odkrytych, jest przedmiotem dużych kontrowersji i wymaga dalszych badań. Na tę skomplikowaną sytuację nakładają się także 2 istotne czynniki, jak zróżnicowanie metod, jakimi można oznaczać dane autoprzeciwciała oraz różne źródła, stopień oczyszczenia, a także względna ilość danego autoantygeny w danym materiale, z którego izoluje się lub na którym oznacza się dany antygen [1].

Jest zrozumiałe, że stosując różne metody i różne materiały diagnostyczne, uzyskuje się dla tych samych surowic różne jakościowo wyniki, a to w przypadku groźnych dla życia i zdrowia chorób o podłożu autoimmunologicznym może prowadzić do nietrafnych rozpoznań i co za tym idzie, niewłaściwego leczenia.

Zatem ogromny postęp w diagnostyce autoprzeciwciał oraz antygenów, polegający na wprowadzeniu niezwykle czułych i złożonych technicznie metod, zmusza do szczególnego przestrzegania standardowych warunków oznaczeń oraz rozwinięcia szerokiego programu standaryzacji – obejmującego nie tylko standaryzację metodyki, ale także stosowanych odczynników i surowic wzorcowych [3, 4].

Narastające problemy związane z *jakością* danych, zwłaszcza w dużych, wielośrodkowych badaniach, gdzie zachodziła konieczność porównywania danych (nie tylko klinicznych, ale także i laboratoryjnych), w sposób dramatyczny uwidocznily konieczność dokonania standaryzacji podstawowych parametrów serologicznych, tj. poziomów autoprzeciwciał uznawanych za dodatnie, a to w sposób konieczny wiązało się ze standaryzacją metodyki ich oznaczania oraz jakości i źródeł substratów (preparatów autoantygenów) do tych testów. Do lat 80. XX w. stosowano standaryzację wewnątrzlaboratoryjną (wewnątrzśrodkową), a powszechnie stosowaną procedurą była wymiana między ośrodkami zajmującymi się oznaczaniem autoprzeciwciał surowic o niewątpliwie wysokich poziomach konkretnych autoprzeciwciał, co tylko częściowo pozwalało na standaryzowanie i porównywanie uzyskiwanych wyników.

Pierwszy skoordynowany program standaryzacji rozpoczął się w USA w latach 80. ubiegłego wieku i obejmował początkowo tylko obszar USA. W późnych latach 80., początkowo dzięki osobistym kontaktom badacza, został *przeszczepiony* do Europy, Japonii i Australii [5, 6].

W 1980 r., pod auspicjami *Fundacji na rzecz reumatyzmu* w USA i we współpracy z CDC w Atlancie, został powołany *Komitet ds. serologii przeciwciał ANA*. Zasadniczym celem nowo powstałego komitetu było zgromadzenie takiej liczby surowic ANA-dodatnich, aby można je było rozsyłać do laboratoriów w USA oraz w innych krajach jako standardy diagnostyczne, co faktycznie zorganizowano w 1982 r. – udostępniając początkowo 5 surowic standardowych. Były to surowice standardowe dla przeciwciał ANA-IIF, anty-dsDNA oraz anty-SSB, anty-RNP i anty-Sm [7–9].

Takie organizacje, jak ILAR, IUIS oraz WHO, widząc sukces oraz dostrzegając konieczność takiego programu, wsparły działalność Komitetu, co zaowocowało nie tylko ekspansją programu na inne kontynenty, ale także generacją 5 dalszych surowic standardowych, które są dostępne od 1988 r. Pula surowic standardowych zwiększyła się zatem o 5 dalszych, dających typowe świecenia w metodzie IIF (typ homogeny, 2 plamiste, jąderkowy i centromerowy) oraz świecenie standardowe anty-Scl-70, anty-Jo-1 i anty-SSB (La) [6, 8, 10].

Od wielu lat w Europie trwa aktywna współpraca między laboratoriami, której celem była standaryzacja metodyki oznaczania przeciwciał ANA; współpracy przewodzili: R.N. Maini (Londyn), V. van Venrooj (Nijmegen), J.S. Smolen (Wiedeń) i S. Bombardieri (Piza). Począwszy od 1989 r., zorganizowano 4 robocze spotkania standaryzacyjne (*Workshops*), a w spotkaniu w 1992 r. uczestniczyło już 35 laboratoriów z 17 państw europejskich. W pierwszych testach porównawczych odsetek surowic, co do których wyniki jakościowe były niezgodne (dla za-

danych tych samych surowic), wynosił powyżej 20% i obniżył się aż do 6% w wynikach zaprezentowanych na ostatnim spotkaniu standaryzacyjnym (*Workshop*) [8, 11].

W 1992 r. pod auspicjami IUIS nastąpiło przeorganizowanie *Komitetu ds. serologii autoprzeciwciał* i utworzenie podkomitetu, zwanego IUIS-ANA, w ramach *Komitetu standaryzacji IUIS*, w którego strukturę, poza ww. organizacjami, weszła Europejska Liga do Walki z Reumatyzmem (EULAR) [12].

Już w pierwszym spotkaniu standaryzacyjnym (1989–1992) uczestniczyły 3 państwa byłego bloku wschodniego (Czechosłowacja, Węgry i Słowenia) i to właśnie przedstawiciele tych państw ustanowili grupę inicjatywną, która w latach 1993–1994 utworzyła *Central and East European Consensus Workshop for Standardization of Autoantibodies to Intracellular Antigens* [4, 5].

Zakład Mikrobiologii i Serologii Instytutu Reumatologii od samego początku aktywnie uczestniczy w pracach tej grupy i w 1995 r. zorganizował w Warszawie *II spotkanie robocze ds. standaryzacji autoprzeciwciał dla antygenów wewnątrzkomórkowych*, w którym uczestniczyły reprezentacje z 10 laboratoriów z 7 państw centralnej i wschodniej Europy – w tym przedstawiciele 2 (oprócz Instytutu) ośrodków z Polski (Poznań i Lublin). Sprawozdanie z tego spotkania roboczego zostało opublikowane w 1995 r. w czasopiśmie *Reumatologia* [4]. Zakład Mikrobiologii i Serologii, niestety, jako jedyny w Polsce uczestniczył i nadal uczestniczy we wszystkich pracach zespołu *Workshop*, także po 1998 r., kiedy to *Central and East European Consensus Workshop for Standardization of Autoantibodies to Intracellular Antigens* został włączony do *European Consensus Finding Study* i prace są kontynuowane pod nową nazwą – *European Consensus Study on Autoantibodies* (ECSA). Cele i zamierzenia połączone warsztatów standaryzacyjnych (*Workshops*) w zasadzie nie zostały zmienione, a odbywające się co roku albo co 2 lata spotkania robocze służą omówieniu i weryfikacji uzyskanych wyników. W ostatnich pracach EFCS w latach 2003–2004 uczestniczyło ok. 40 laboratoriów europejskich, a wyniki są publikowane w raporcie przygotowanym przez obecnie prowadzącą EFCS grupę, w skład której wchodzi m.in. P.J. Charles (Anglia), V. van Venrooj (Holandia), R. Smeenk (Holandia), D. Hamann (Niemcy).

Komentując niewątpliwe sukcesy EFCS, wyrażając się malejącym odsetkiem błędnie rozpoznawanych (co do swoistości) surowic testowych (co roku do partycypujących laboratoriów wysyła się 10 surowic o nieznanym swoistościach) oraz rosnącą standaryzacją metod i substratów, na których oznaczane są autoprzeciwciała, konsensus ma wadę, którą można nazwać nadmierną centralizacją decyzji co do formy i kierunków rozwoju,

a wyrażającą się brakiem wpływu uczestników EFCS na tematykę wykładów i części praktycznej.

Liczne uwagi co do technicznej strony funkcjonowania EFCS, zostały skrótowo wyrażone w punktach:

- brak własnego banku surowic wzorcowych (dostępnego dla wszystkich laboratoriów),
- brak dostępności do surowic wzorcowych o znanych parametrach,
- brak rekomendacji metodycznych i firm (których testy są zlecane),
- brak dofinansowania ze strony Unii Europejskiej, co prowadzi do wysyłki surowic dodatknych, np. ostatnio aCl-dodatnych (czy od tego ma zależeć wielkie przedsięwzięcie, jakim jest EFCS?),
- wadliwe, skomplikowane i trudne do obsługi (tematy) programy komputerowe,
- brak nacisku na atestację w krajach (może EFCS sam mógłby wydawać atesty),
- arkusz badań obejmuje aż kilkadziesiąt przeciwciał, z czego znakomita większość nie ma istotnego znaczenia diagnostycznego – ze względu na niską czułość i swoistość, czego przykładem są choćby przeciwciała anty-Ku, anty-RA-33,
- oznaczanie większości z ww. autoprzeciwciał nie ma nawet waloru badawczego, ponieważ wyeksploatowano już wszystkie możliwości diagnostyczne i poznawcze płynące z oznaczania danego autoprzeciwciała,
- spotkania EFCS powinny się odbywać tylko w miejscach, do których dojazd będzie tani dla wszystkich uczestników.

Mimo tych wszystkich krytycznych uwag dotyczących EFCS w obecnym kształcie, a które są raczej teżami naprawczymi i usprawniającymi jego funkcjonowanie – zgłaszanymi już zresztą przez autora wielokrotnie (np. na spotkaniu EFCS w Budapeszcie), to ocena dotychczasowego dorobku kolejnych warsztatów standaryzacyjnych jest bardzo wysoka.

Wyrazem tego są chociażby coraz wyższe i ciągle rosnące indeksy zgodności oznaczeń poszczególnych autoprzeciwciał czy znaczna już standaryzacja metodyki, a zasadniczym problemem jest nieuwzględnianie różnicowanych możliwości finansowych, doświadczenia i potencjału poszczególnych jednostek (laboratoriów) biorących udział w pracach EFCS.

Pracownicy Zakładu Mikrobiologii i Serologii Instytutu Reumatologii, widząc ewidentne korzyści wynikające z udziału w pracach EFCS oraz z zadań wynikających ze statutu samego Instytutu oraz mając na uwadze kompletny brak skoordynowanego programu standaryzacyjnego w Polsce, biorą bezpośredni udział w pracach EFCS (także materialny w postaci dostarczenia surowic o znanej swoistości, np. surowice aCl-do-

datnie), ale także w propagowaniu na terenie Polski metodyki oznaczania uznanych już diagnostycznie autoprzeciwciał i nowo wprowadzanych autoprzeciwciał – czego wyrazem są liczne prace doświadczalne i przeglądowe dotyczące tych zagadnień. Organizujemy też, wspólnie z firmami sprzedającymi diagnostyki, zjazdy, których celem jest upowszechnianie metodyk zalecanych przez EFCS [1, 3, 4, 13].

Należy mieć nadzieję, że wejście Polski do Unii Europejskiej wymusi wszczęcie racjonalnego i dostosowanego do realnych możliwości polskich laboratoriów programu standaryzacji metod oznaczania autoprzeciwciał, który będzie prowadził do atestacji laboratoriów wykonujących oznaczanie autoprzeciwciał.

Piśmiennictwo

1. Metody diagnostyki serologicznej w reumatologii. Luft S (red.). Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1996.
2. Manual of biological markers of disease. van Venrooij WJ, Maini RN (eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London 1996.
3. Ząbek J, Luft S, Wojciechowska B. Problemy związane ze standaryzacją oznaczania przeciwciał antykardiolipinowych. *Reumatologia* 1998; 36: 5-14.
4. Ząbek J. Consensus Workshop for Standardization of Autoantibodies to Intracellular Antigens Second Meeting. *Reumatologia* 1995; 36: 461-2.
5. Maini RN, Smolen JS. Reports of the European Consensus Study Groups. *Clin Exp Rheumatol* 1992; 19: 505-6.
6. Tan EM. International cooperative activities in standardization of antinuclear antibodies. *Manual of Biological Markers of Disease*, 1993, 1-5, A1. Kluwer Academic Publishers, the Netherlands 1993.
7. Tan EM, Feltkamp TE, Alarcon-Segovia D, et al. Reference reagents for antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 1331.
8. Charles PJ, van Venrooij WJ, Maini RN, et al. The Consensus Workshop for the Detection of Autoantibodies to Intracellular Antigens in Rheumatic Diseases: 1989-1992. *Clin Exp Rheumatol* 1992; 10: 507-11.
9. Tan EM, Fritzler MJ, McDougal JS, et al. Reference sera for antinuclear antibodies. I. Antinuclear to native DNA, Sm, nuclear RNP and SS-B/A. *Arthr Rheum* 1982; 25: 1003-5.
10. Anderson SG, Bentzon MW, Houba V, et al. International reference preparation of rheumatoid arthritis serum. *Bull. WHO* 1970; 42: 311-18.
11. van Venrooij WJ, Charles P, Maini RN. The consensus workshop for the detection of autoantibodies to intracellular antigens in rheumatic diseases. *J Immunol Methods* 1991; 140: 181-9.
12. Kalden JR. WHO/IUIS Standardization Programme. *Clin Exp Rheumatol* 1992; 10: 513-14.
13. Ząbek J. Konferencja naukowo-szkoleniowa Nowoczesne metody diagnostyki autoprzeciwciał. *Reumatologia* 2003; 41: 3.