مروری بر معیارهای آزمایشگاهی و کلینیکی در تشخیص بیماری سیستمیک لوپوس اریتماتوز

● دکتر فاطمه نصری
دکترای تخصصی ایمونولوژی، دانشکده پیراپزشکی شیراز

● دکتر صدیقه شریف زاده
دکترای علوم آزمایشـــگاهی، دکترای تخصصی ایمونولوژی، استاد دانشکده پیراپزشکی شیراز، مرکز تحقیقات علوم و فناوری تشخیص آزمایشگاه
sharifsd@sums.ac.ir

❑ چکیده

بیماری Systemic Lupus Erythematosus (SLE) یک بیماری خود ایمن همراه با درگیری ارگان‌های مختلف است که تشـــخیص زود به هنگام بیماری در شروع درمان مؤثر اســـت. فردی که بـــا احتمال داشـــتن بیماری SLE به پزشـــک مراجعه می‌کند بایســـتی تاریخچه کلینیکی و آزمایش‌های ایمونولوژیکال به طور دقیق برای بیمار بررسی شود تا بتوان متعاقباً پارامترهای هماتولوژیک و کلیوی بیمار را ارزیابی کرد. تشـــخیص بیماری SLE بایستی حداقل در حضور یک اتو آنتی بادی anti-double stranded DNA (dsDNA) و یا سطوح پایین کمپلمان انجام شود. سطوح بالای anti-dsDNA و ســـطوح پایین اجزاء کمپلمان C3 و C4 بـــه طور همزمان نشـــان دهنده عـــود اخیر بیماری SLE اســـت. در حال حاضر جهت تشخیص بیماری SLE از معیارهای American College of Rheumatology (ACR) استفاده می‌شود.

کلمات کلیدی: SLE، ACR، ANA، anti-dsDNA، C3، C4

❑ مقدمه

اولین بار بقراط در سال ۴۶۰-۳۷۵ قبل از میلاد بیماری SLE یـــا لوپـــوس را توصیف کرده اســـت و آن را هرپس اســـتیومنوس یا درماتوز خراش دهنده نامیده است. بعد از آن Herbernus of Tours اصطلاح لوپوس را در سال ۹۱۶ بعد از میلاد به کار برد و کاپوسی در سال ۱۸۷۲ لوپوس را به دو دسته سیستمیک و دیسکویید تقسیم بندی کرد. سال ۱۹۵۴ لوپوس القاء شده توسط هیدرالازین توضیح داده شد و در سال ۱۹۸۲ معیارهای طبقه بندی شده توسط انجمن روماتولوژیســـت های آمریکایی جهت تشـــخیص بیماری لوپوس منتشر شد. از بعد درمانی داروهای گلوکورتیکوئید و سرکوب کننده سیستم ایمنی برای درمان بیماری لوپوس بین سال‌های ۱۹۹۰-۱۹۶۴ معرفی شدند و در سال ۲۰۱۱ اولیـــن داروی بیولوژیـــک (Belimumab, Benlysta) به عنوان یک آنتی بادی منوکلونال انســـانی ممانعت کننده از فعالیت لنفوســـیت‌های B مورد تأییـــد قرار گرفت. بیماری لوپوس یا SLE یک بیماری پیچیده خود ایمن اســـت که علائـــم بالینی متفاوتی دارد. در بیماری SLE انواع مختلف اتو آنتی بادی‌ها تولید می‌شود که این آنتی بادی‌های خودی با آنتی ژن‌های خودی تشـــکیل کمپلکس ایمنی می‌دهند رســـوب کمپلکس‌های ایمنی در عروق ارگان‌های مختلف منجر به عملکرد نامناســـب ارگان‌هـــا و ایجاد علائم بالینی مختلف می‌شـــود. وجود علائم بالینی پیچیـــده و متفاوت در بیماری SLE تعریف و تشـــخیص بیمـــاری را تا حدی مشکل کرده اســـت. علائم تیپیک و معیارهای کلی جهت تشـــخیص بیماری SLE در جدول یک آمده اســـت. وجود معیارهای طبقه بندی شـــده به عنوان معیارهای ورودی در کلینیک و مطالعات تحقیقاتی حائز اهمیت است. معیارهای طبقه بندی شـــده‌ای که توسط انجمن روماتولوژیست های آمریکایـــی American College of Rheumatology (ACR) مورد بررســـی قرار گرفته است در حال حاضر به صورت جهانی قابل ارجاع اســـت. در ارتبـــاط با معیارهای ACR متعاقباً بحث خواهد شد.

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2023-03-27]

جدول یک- معیارهای کلی جهت تشخیص بیماری SLE

معیارها	توضیحات
Anti- nuclear antibodies (ANA)	تیتر ANA $\geq 1:80$ بر روی سلول‌های HEP-2 با استفاده از میکروسکوپ ایمونوفلورسانس
تب	دمای بیشتر از 38/3°C
لکوپنی	شمارش گلبول‌های سفید کمتر از $4000/mm^3$
همولیز خود ایمنی	موارد نشان دهنده همولیز شامل افزایش رتیکولوسیت ها، کاهش هاپتوگلوبین افزایش بیلی روبین غیرمستقیم، افزایش LDH، تست کومبس مثبت
هذیان	تغییر در هوشیاری، کاهش توانایی جهت تمرکز، علائم عدم هوشیاری و کاهش حافظه. این علائم در کمتر از دو روز اتفاق می افتد.
زخم‌های دهانی	زخم‌های دهانی به وسیله پزشک تشخیص داده می‌شود.
لوپوس پوستی و یا لوپوس دیسکوئید	زخم‌های شبیه سوریازیس توسط پزشک دیده می‌شود که اگر بیوپسی پوست بررسی شود تغییرات تیپیکال بایستی مشاهده شود.
لوپوس پوستی حاد	malar rash یا rash پروانه‌ای روی صورت دیده می‌شود.
افیوژن قلبی و ریوی	تصویرهای گرفته شده با CT SCAN و MRI دال بر افیوژن قلبی و ریوی
درگیری مفاصل	سفت شدن مفاصل در صبحگاه و تورم یک یا دو مفصل
پروتئینوری	اندازه گیری پروتئینی در ادرار ۲۴ ساعته بیشتر از 0.5 gr
لوپوس نفریت	رسوب کمپلکس‌های ایمنی در سلول‌های اپیتلیال و اندوتلیال
آنتی بادی بر علیه فسفولیپیدها	آنتی بادی بر علیه کاردیولیپین، گلیکوپروتئین B2 و lupus anticoagulant مثبت شود.
Low C3 and low C4	سطوح کاهش یافته اجزاء کمپلمان C3 و C4
Anti- ds DNA or anti- sm antibodies	Anti- ds DNA و anti- sm antibodies جهت تشخیص SLE، ۹۰٪ اختصاصیت دارد.

بـا توجه به اینکه بیماری SLE یـک بیماری خود ایمن است در اینجا بیشتر در ارتباط با یافته‌های ایمونولوژیکال و سرولوژیکال مربوط به بیماری صحبت می‌کنیم.

❑ مشـــخصات کلینیکال و سرولوژیکال جهت تشخیص بیماری SLE

● از جمله اتو آنتی بادی‌هایی که در بیماری لوپوس حائز اهمیت اســت anti-nuclear antibody(ANA) است که در ۹۵٪ از بیماران مشکوک به بیماری لوپوس حضور دارند. اگر تست ANA منفی باشد احتمال اینکه از نظر کلینیکی فرد به عنوان بیمار SLE در نظر گرفته شود بسیار کم است. قابل ذکر است که ANA در ۵٪ از بزرگسالان مثبت است. مثبت بودن این تســت بدون در نظــر گرفتن علائم بالینی ارزش تشخیصی بالایی ندارد.

● از دیگر اتوآنتی بادی‌هــا anti-double stranded DNA (dsDNA) و anti-smith (sm) آنتی بادی‌ها هستند، که این

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2023-03-27]

آنتـــی بادی‌ها اختصاصیت بســـیار بالایی جهت تشـــخیص بیماری SLE دارند.

● حضـــور اتـــو آنتـــی بادی‌هـــای دیگـــر ماننـــد anti-La(SSB)، anti-Ro(SSA) و anti-ribonucleoprotein (RNP) جهت تشـــخیص بیمـــاری SLE از اختصاصیـــت کمتری برخوردار است زیرا این اتو آنتی بادی‌ها در بیماری‌های خود ایمـــن دیگر هـــم دیده مـــی شـــوند. اتو آنتـــی بادی‌های anti-Ro و anti-La، ارتبـــاط قـــوی بـــا بیمـــاری primary Sjogren's syndrome (primary SS) دارد. اگـــر چه حضور این اتو آنتی بادی‌هـــا در بیماران لوپوس با مشـــکلات پوســـتی (subacute cutaneous lupus) نیز دیده شـــده اســـت. علاوه بر این، در نوزادان متولد شده از مادران anti-Ro و anti-La مثبت، سندرم لوپوس نوزادی Congenital Heart Block(CHB) مشاهده شده است. آنتی بادی‌های anti-RNP بیشتر با Mixed Connective Tissue Disease (MCTD) مرتبط است.

● از آنجایی که بیماری SLE و anti- phospholipid syndrome (APS) با هم هم پوشانی دارند و APS ممکن است در بیماری SLE ایجاد شـــود، بررســـی اتو آنتی بادی بر علیه فسفولیپیدها (aPLs) در تمام بیماران لوپوس بایستی لحاظ شود، به ویژه در زنـــان با بارداری ســـخت که ســـابقه علائـــم ترومبوز را داشته‌اند. تســـت‌های تاییدی جهت تشخیص APS شامل مثبت شدن lipid anticoagulant (LA)، anti-cardiolipin(IgG,IgM) و anti-β2 glycoprotein-1 (IgG,IgM)در دو زمان متفاوت با فاصله زمانی ۱۲ هفته از یکدیگر می‌باشـــد. از بین این ســـه تست LA test از اختصاصیـــت بالایـــی جهت تشـــخیص APS برخوردار است و افرادی که هر سه تست مربوط به پروفایل aPL آن‌ها مثبت بوده اســـت در خطر بالای ایجاد ترومبوز بعد از ۱۰ سال بوده‌اند.

● در بیماران لوپوس سطوح پایین اجزاء کمپلمان شامل C3 و C4 دیده می‌شـــود که این کاهـــش به دلیل مصرف کمپلمان به وســـیله کمپلکس‌های ایمنی می‌باشد. سطوح پایین کمپلمان در تشـــخیص بیمـــاری SLE حائز اهمیت می‌باشد.

بـــا توجه بـــه مطالبی که در بالا به آن اشـــاره شـــد تنها معیارهای ایمونولوژیکال جهت تشخیص بیماری کافی نیست و مجموعه‌ای از یافته‌های ایمونولوژیک و بالینی در تشخیص بیماری لوپوس اهمیت دارند. همین طور که قبل‌تر به آن اشاره شـــد از معیارهای ACR طبق به روز رسانی ۱۹۸۲ به صورت جهانی جهت تشخیص بیماری SLE استفاده می‌شود که در جـــدول دو به یازده معیاری که مد نظر روماتولوژیســـت‌های آمریکایی اســـت به آن اشاره شده اســـت. از ۱۱ معیاری که توســـط ACR در نظر گرفته شـــده‌اند اگر ۴ معیار در بیمار وجود داشته باشد دال بر وجود بیماری SLE است.

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2023-03-27]

جدول دو- معیارهای ACR جهت طبقه بندی بیماری SLE طبق به روز رسانی ۱۹۸۲

معیارها	تعریف
راش پروانه‌ای	قرمزی ثابت صاف یا متورم بیشتر در اطراف بینی و روی گونه‌ها (راش پروانه‌ای)
راش دیسکوئید	لکه‌های قرمز رنگی که شبیه زخم‌های سوریازیس می‌باشد. اسکارهای آتروفی شده هم دیده می‌شود.
حساسیت به نور	راش‌های پوستی باعث ایجاد حساسیت به نور خورشید می‌شود.
زخم دهانی	زخم دهانی یا بینی که بدون درد است و توسط پزشک مشاهده می‌شود.
التهاب مفاصل	درگیری یک یا دو مفصل که به وسیله تورم و افیوژن مشخص می‌شود.
التهاب پرده ریه و قلب	افیوژن پلورال و پری کارد که توسط پزشک بررسی می‌شود.
اختلالات کلیوی	دفع پروتئینی از طریق ادرار بیشتر از 0.5 gr در روز و یا دفع پروتئین معادل ۳+
اختلالات عصبی	تشنج و psychosis که توسط پزشک تشخیص داده می‌شود.
اختلالات خونی	افزایش رتیکولویست ها، لکوپنی کمتر از $4000\ mm^3$ لنفوپتی کمتر از $1500\ mm^3$ ترومبوسیتوپنی کمتر از $100/000\ mm^3$
اختلالات خونی	مثبت بودن anti-ds DNA، anti- sm و همچنین مثبت بودن apls
ANA	تیتر بالاتر از ۱:۸۰ در تست ANA-HEP2 مثبت تلقی می‌شود.

طبق آخرین به روز رسانی که انجمن روماتولوژیست های آمریکایی در سال ۲۰۱۹ منتشر کرده‌اند و در جدول سه به آن اشاره شده است، اگر تیتر ANA-HEp-2 بیشتر از ۱:۸۰ باشد این تیتر به عنوان تیتر مثبت و معیار ورودی جهت تشخیص بیماری SLE محسوب می‌شود. در غیر این صورت، اگر بیماری ANA-HEp-2 منفی داشته باشد جهت تشخیص بیماری SLE وارد طبقه بندی معیارهای تکمیلی جهت تشخیص قطعی بیماری SLE نمی‌شود. بنابراین ANA-HEp-2 جهت ورود به طبقه بندی تکمیلی مربوط به تشخیص بیماری SLE ضروری است. معیارهای تکمیلی طبق جدول شماره سه به دو حوزه بالینی و ایمونولوژیکال تقسیم بندی می‌شوند. اختلالات هماتولوژی، اعصاب و روان، پوستی، مفصلی و کلیوی در حوزه یافته‌های بالینی قرار دارند که بسته به اهمیت یافته‌های بالینی بیشترین یا کمترین درجه را به خود اختصاص می‌دهند. به عنوان مثال یافته‌های مربوط به بیوپسی کلیوی بیشترین درجه (score=8 or10)و یافته‌های مانند تب و زخم‌های دهانی کمترین درجه(score= 2) را دارند. طبق جدول شماره ۳ آنتی بادی بر علیه فسفو لیپیدها، اجزاء هسته و کاهش سطح کمپلمان C3 و C4 در حوزه یافته‌های ایمونولوژیکال قرار می‌گیرند که بیشترین درجه مربوط به آنتی بادی بر علیه DNA دو رشته‌ای و آنتی بادی بر علیه آنتی ژن Smith (score= 6) می‌باشد. کمترین درجه اهمیت مربوط به آنتی بادی بر علیه فسفولیپیدها(score=2) می‌باشد. با توجه به توضیحات داده شده، طبق آخرین به روز رسانی که توسط انجمن روماتولوژیست های آمریکایی در سال ۲۰۱۹ انجام گرفته است، اگر مجموع یافته‌های بالینی و ایمونولوژیکال فردی معادل یا بیشتر از درجه ۱۰ (score=10 or >10) شود به طور قطع فرد به عنوان بیمار SLE در نظر گرفته می‌شود.

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2023-03-27]

جدول سه- آخرین به روز رسانی که جهت تشخیص بیماری SLE توسط انجمن روماتولوژیست های آمریکایی (ACR) در سال ۲۰۱۹ انجام گرفته شده است.

شناسایی تیتر آنتی بادی بر علیه اجزاء هسته بیشتر و مساوی ۱/۸۰ بر روی سلول‌های HEp-2

↓

اگر آنتی بادی بر علیه اجزاء هسته‌ای وجود داشته باشد به عنوان بیماری لوپوس طبقه بندی می‌شود و معیارهای تکمیلی در نظر گرفته می‌شود. در صورتی که آنتی بادی بر علیه اجزاء هسته وجود نداشته باشد وجود بیماری لوپوس رد خواهد شد.

↓

طبقه بندی بیماری لوپوس حداقل به یک معیار بالینی نیاز دارد و مجموع درجات بایستی ۱۰ یا بیشتر از ۱۰ شود. در هر حوزه فقط بالاترین درجه در شمارش کل در نظر گرفته می‌شود.

حوزه بالینی و معیارها	وزن دهی	حوزه ایمنی شناسی و معیارها	وزن دهی
تب مداوم	2	**Antiphospholipid antibodies** Anti- cardiolipin antibodies OR Anti-β2 GP1 antibodies Or Lupus anticoagulant	2
خونی لکوپنی ترومبوسیتوپنی همولیز خود ایمن	3 4 4	**Complement proteins** Low C3 OR low C4 Low C3 AND low C4	3 4
عصب و روان هذیان پسایکوز تشنج	2 3 5	**SLE- specific antibodies** Ant- ds DNA antibody * OR Anti- Smith antibody	6
پوستی- مخاطی کچلی بدون اسکار زخم‌های دهانی لوپوس پوستی تحت حاد و یا لوپوس دیسکوئید	2 2 4		
سروزی افیوژن قلبی- ریوی	5 6		
عضلانی درگیری مفاصل	6		
کلیوی پروتئینوری > 0.5g/24h بیوپسی کلیوی درجه دو یا چهار لوپوس نفریت بیوپسی کلیوی درجه سه یا پنج لوپوس نفریت	4 8 10		
مجموع درجات:			

اگر بیمار معیار ورودی را داشته باشد و مجموع درجات بیشتر و یا مساوی ۱۰ شود به عنوان بیماری لوپوس در نظر گرفته می‌شود.

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2023-03-27]

❑ مقایسه دو روش ELISA و ANA-IFA در تشخیص بیماری SLE

دو روش اصلی جهت ارزیابی ANA، ANA-IFA و تکنیک ELISA می‌باشد.

تست ANA-IFA در حال حاضر به عنوان تست طلایی (gold standard) جهت ارزیابی ANA در کلینیک استفاده می‌شود و انجمن روماتولوژیست های اروپایی و آمریکایی تست ANA-IFA را به عنوان تکنیک اصلی در تشخیص بیماری SLE در نظر گرفته‌اند. در این تکنیک می‌توان ۳۰ نوع متفاوت آنتی ژن‌های هسته‌ای و سیتوپلاسمی را با استفاده از سلول HEp-2 به عنوان سوبسترا، شناسایی کرد. نتایج تست ANA-IFA براساس چهار الگوی Homogenous، speckled، nucleolar و centromere گزارش می‌شود.

تست ANA- IFA حساسیت بالا و اختصاصیت پایینی دارد به همین دلیل جهت بالا بردن اختصاصیت تیتر $\frac{1}{80}$ در ANA-IFA به عنوان مثبت تلقی می‌شود به این دلیل که تیتر $\frac{1}{40}$ در ۳۰-۲۵ درصد افراد سالم مثبت است و این درصد با افزایش سن افراد، افزایش می‌یابد. تیتر $\frac{1}{80}$ به عنوان cut off جهت بالا بردن اختصاصیت تست در نظر گرفته می‌شود. اهمیت بالینی تست ANA-IFA با بالا رفتن تیتر افزایش می‌یابد و علاوه بر این بالا رفتن تیتر شانس شناسایی اتو آنتی ژن‌های اختصاصی را افزایش می‌دهد.

تست ANA - IFA با وجود حساسیت بالایی که در شناسایی اتو آنتی ژن‌ها دارد اما با یک سری محدودیت‌ها نظیر زمان بر بودن تست و همچنین روش طولانی انجام کار رو به رو است. از همه مهم‌تر نحوه دقیق گزارش اسلایدهای ایمونوفلورسانس بستگی به مهارت تکنسین آزمایشگاه دارد. در دو دهه اخیر، جهت انجام تست ANA، به منظور سهولت کار و ذخیره زمان از تکنیک ELISA استفاده می‌شود. با این وجود گزارش‌های اخیر نشان داده است که تکنیک ELISA در مقایسه با ایمونوفلورسانس غیرمستقیم از حساسیت پایین‌تری برخوردار است.

البته این نکته حائز اهمیت است که کیت‌های الایزا متفاوت از شرکت‌های سازنده مختلف، از درجات حساسیت و اختصاصیت متفاوتی برخوردار هستند که بعضی از کیت‌های الایزا از نظر صحت قابل مقایسه با IFA و یا حتی اختصاصیت و حساسیت بالاتری از IFA دارند. بنابراین مطالعات اخیر پیشنهاد می‌کنند که از ANA- ELISA جهت Screen بیماران مشکوک به بیماری SLE استفاده شود و جهت تأیید صحت نتایج ELISA از تست ANA- IFA جهت بالا بودن حساسیت و اختصاصیت استفاده شود.

علاوه بر این مطالعات نشان داده که حساسیت ANA-IFA بستگی به نوع بیماری اتو ایمیون دارد زیرا که در بیماری‌های اتو ایمیون مختلف تعداد و نوع اتو آنتی بادی‌ها کاملاً متفاوت است. به عنوان مثال حساسیت ANA-IFA برای تشخیص بیماری SLE، ۹۳ درصد است در صورتی که حساسیت این تست جهت تشخیص بیماری اسکرودرما ۸۴ درصد می‌باشد و این حساسیت برای دیگر بیماری‌ها Connective tissue diseases (CTD) از ۴۰ درصد تا ۶۴ درصد متغیر است.

دلیل این که تست ANA-IFA در تشخیص بیماری SLE حساسیت بالاتری دارد این است که در بیماری SLE آنتی ژن‌های هسته‌ای زیادی مانند ds-DNA، RO، RNP، Rip-P و Sm درگیر هستند و بر علیه پنل آنتی‌ژنی ذکر شده اتو آنتی بادی تولید می‌شود در حالی که در Connective tissue diseases دیگر مانند شوگرن و اسکلرودرما بر علیه یک یا دو اتو آنتی ژن، آنتی بادی وجود دارد.

با توجه به دلایل فوق یعنی تولید فراوان اتو آنتی بادی‌ها در بیماری SLE و بیان بالای اتو آنتی ژن‌ها در این بیماری انجمن روماتولوژیست های آمریکایی از تست ANA-IFA به عنوان تست Screen جهت تشخیص بیماران مشکوک به SLE استفاده می‌کنند. نتیجه کلی این است که طبق آخرین به روز رسانی که توسط انجمن روماتولوژیست های اروپایی و آمریکایی انجام گرفته است جهت ارزیابی ANA در بیماران SLE اگر از تکنیک ELISA استفاده می‌شود بایستی با تست ANA-IFA جهت تعیین نوع اتو آنتی ژن‌ها و همچنین الگوی فلورسانس تأیید شود.

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2023-03-27]

References:

1- Aringer M, Costenbader K, Daikh D, Brinks R, Mosca M, Ramsey-Goldman R, et al. 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology classification criteria for systemic lupus erythematosus. Arthritis & rheumatology. 2019;71(9):1400.

2- Hanly J. ACR classification criteria for systemic lupus erythematosus: limitations and revisions to neuropsychiatric variables. Lupus. 2004;13(11):861-4.

3- Fanouriakis A, Tziolos N, Bertsias G, Boumpas DT. Update on the diagnosis and management of systemic lupus erythematosus. Annals of the rheumatic diseases. 2021;80(1):14-25.

4- Gordon C, Amissah-Arthur M-B, Gayed M, Brown S, Bruce IN, D'Cruz D, et al. The British Society for Rheumatology guideline for the management of systemic lupus erythematosus in adults. Rheumatology. 2018;57(1):e1-e45.

5- Alsaed OS, Alamlih LI, Al-Radideh O, Chandra P, Alemadi S, Al-Allaf A-W. Clinical utility of ANA-ELISA vs ANA-immunofluorescence in connective tissue diseases. Scientific reports. 2021;11(1):1-7.

6- Copple SS, Sawitzke AD, Wilson AM, Tebo AE, Hill HR. Enzyme-linked immunosorbent assay screening then indirect immunofluorescence confirmation of antinuclear antibodies: a statistical analysis. American Journal of Clinical Pathology. 2011;135(5):678-84.

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2023-03-27]