

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 آزمایشگاهی، 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 تشخیص زود به هنگام بیماری در شروع درمان مؤثر است. فردی که با احتمال داشتن بیماری SLE به پزشک مراجعه می‌کند بایستی تاریخچه کلینیکی و آزمایش‌های ایمونولوژیکال به طور دقیق برای بیمار بررسی شود تا بتوان متعاقباً پارامترهای هماتولوژیک و کلیوی بیمار را ارزیابی کرد. تشخیص 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 سطوح پایین اجزاء کمپلمان C3 و C4 به طور همزمان نشان دهنده عود اخیر بیماری SLE است. 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 یا لوپوس را توصیف کرده است و آن را هرپس استیومنوس 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 دیسکوئید تقسیم بندی کرد. سال

۱۹۵۴ لوپوس القاء شده توسط هیدرالازین توضیح داده شد و در سال ۱۹۸۲ معیارهای طبقه بندی شده توسط انجمن روماتولوژیست های آمریکایی جهت تشخیص بیماری لوپوس منتشر شد. از بعد درمانی داروهای گلوکوکورتیکوئید و سرکوب کننده سیستم ایمنی برای درمان بیماری لوپوس بین سال‌های ۱۹۹۰-۱۹۶۴ معرفی شدند و در سال ۲۰۱۱ اولین داروی بیولوژیک (Belimumab, Benlysta) به عنوان یک آنتی بادی منوکلونال انسانی مانع کننده از فعالیت لنفوسیت‌های B مورد تأیید قرار گرفت. بیماری لوپوس یا SLE یک بیماری پیچیده خود ایمن است که علائم بالینی متفاوتی دارد. در بیماری SLE انواع مختلف اتو آنتی بادی‌ها تولید می‌شود که این آنتی بادی‌های خودی با آنتی ژن‌های خودی تشکیل کمپلکس ایمنی می‌دهند رسوب کمپلکس‌های ایمنی در عروق ارگان‌های مختلف منجر به عملکرد نامناسب ارگان‌ها و ایجاد علائم بالینی مختلف می‌شود. وجود علائم بالینی پیچیده و متفاوت در بیماری SLE تعریف و تشخیص بیماری را تا حدی مشکل کرده است. علائم تیپیک و معیارهای کلی جهت تشخیص بیماری SLE در جدول یک آمده است. وجود معیارهای طبقه بندی شده به عنوان معیارهای ورودی در کلینیک و مطالعات تحقیقاتی حائز اهمیت است. معیارهای طبقه بندی شده‌ای که توسط انجمن روماتولوژیست های آمریکایی American College of Rheumatology (ACR) مورد بررسی قرار گرفته است در حال حاضر به صورت جهانی قابل ارجاع است. در ارتباط با معیارهای ACR متعاقباً بحث خواهد شد.

جدول یک- معیارهای کلی جهت تشخیص بیماری SLE

معیارها	توضیحات
Anti- nuclear antibodies (ANA)	تیترا ANA $\geq 1:80$ بر روی سلول‌های HEP-2 با استفاده از میکروسکوپ ایمونوفلورسانس
تب	دمای بیشتر از $38/3^{\circ}\text{C}$
لکوپنی	شمارش گلبول‌های سفید کمتر از $4000/\text{mm}^3$
همولیز خود ایمنی	موارد نشان دهنده همولیز شامل افزایش رتیکولوسیت‌ها، 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 کاردیولپین، 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.

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 تست بدون در نظر گرفتن علائم بالینی ارزش تشخیصی بالایی ندارد.

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

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

■ مشخصات کلینیکی و سرولوژیکال جهت تشخیص بیماری SLE

● از جمله اتوانتی بادی‌هایی که در بیماری لوپوس حائز اهمیت است anti-nuclear antibody (ANA) است که



مثبت شدن (LA) anti-cardiolipin (IgG, IgM) و lipid anticoagulant (LA) و anti-β₂ glycoprotein-1 (IgG, IgM) در دو زمان متفاوت با فاصله زمانی ۱۲ هفته از یکدیگر می‌باشد. از بین این سه تست LA test از اختصاصیت بالایی جهت تشخیص APS برخوردار است و افرادی که هر سه تست مربوط به پروفایل aPL آن‌ها مثبت بوده است در خطر بالای ایجاد ترومبوز بعد از ۱۰ سال بوده‌اند.

● در بیماران لوپوس سطوح پایین اجزاء کمپلمان شامل C3 و C4 دیده می‌شود که این کاهش به دلیل مصرف کمپلمان به وسیله کمپلکس‌های ایمنی می‌باشد. سطوح پایین کمپلمان در تشخیص بیماری SLE حائز اهمیت می‌باشد.

با توجه به مطالبی که در بالا به آن اشاره شد تنها معیارهای ایمونولوژیکال جهت تشخیص بیماری کافی نیست و مجموعه‌ای از یافته‌های ایمونولوژیک و بالینی در تشخیص بیماری لوپوس اهمیت دارند. همین طور که قبل تر به آن اشاره شد از معیارهای ACR طبق به روز رسانی ۱۹۸۲ به صورت جهانی جهت تشخیص بیماری SLE استفاده می‌شود که در جدول دو به یازده معیاری که مد نظر روماتولوژیست‌های آمریکایی است به آن اشاره شده است. از ۱۱ معیاری که توسط ACR در نظر گرفته شده‌اند اگر ۴ معیار در بیمار وجود داشته باشد دال بر وجود بیماری SLE است.

آنتی بادی‌ها اختصاصیت بسیار بالایی جهت تشخیص بیماری SLE دارند.

● حضور اتو آنتی بادی‌های دیگر مانند anti-ribonucleoprotein (RNP) و anti-Ro(SSA) و anti-La(SSB) جهت تشخیص بیماری SLE از اختصاصیت کمتری برخوردار است زیرا این اتو آنتی بادی‌ها در بیماری‌های خود ایمن دیگر هم دیده می‌شوند. اتو آنتی بادی‌های anti-Ro و anti-La، ارتباط قوی با بیماری primary Sjogren's syndrome (primary SS) دارد. اگر چه حضور این اتو آنتی بادی‌ها در بیماران لوپوس با مشکلات پوستی (subacute cutaneous lupus) نیز دیده شده است. 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 شود، بررسی اتو آنتی بادی بر علیه فسفولیپیدها (aPLs) در تمام بیماران لوپوس بایستی لحاظ شود، به ویژه در زنان با بارداری سخت که سابقه علائم ترومبوز را داشته‌اند. تست‌های تاییدی جهت تشخیص APS شامل

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 $100/000 \text{ mm}^3$
اختلالات خونی	مثبت بودن anti- sm, anti-ds DNA و همچنین مثبت بودن apls
ANA	تیترا بالاتر از ۱:۸۰ در تست ANA-HEP2 مثبت تلقی می‌شود.

مثال یافته‌های مربوط به بیوپسی کلیوی بیشترین درجه (score=8 or 10) 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.

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 تیترا ANA-Hep-2 بیشتر از ۱:۸۰ باشد این تیترا به عنوان تیترا 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



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 تیتراژ آنتی بادی بر علیه اجزاء هسته بیشتر و مساوی ۱/۸۰ بر روی سلول های HEp-2



اگر آنتی بادی بر علیه اجزاء هسته ای وجود داشته باشد به عنوان بیماری لوپوس طبقه بندی می شود و معیارهای تکمیلی در نظر گرفته می شود. 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 می شود.

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

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

تست ANA-IFA با وجود حساسیت بالایی که در شناسایی 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 ایمنی دارد زیرا که در بیماری‌های اتو ایمنی مختلف تعداد و نوع 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 پل آنتی ژنی ذکر شده آنتی بادی تولید می‌شود در حالی که در Connective tissue diseases دیگر مانند شوگرن و اسکرودرما بر علیه یک یا دو آنتی ژن، آنتی بادی وجود دارد. با توجه به دلایل فوق یعنی تولید فراوان آنتی بادی‌ها در بیماری SLE و بیان بالای 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 آنتی ژن‌ها و همچنین الگوی فلورسانس تأیید شود.





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, Alamlili 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.

