

Sistemik lupus eritematozus ön tanısıyla araştırılan hastaların serumlarında antinükleer ve anti-double stranded DNA antikorlarının saptanmasında iki farklı yöntemin karşılaştırılması

Comparison of two methods used in the detection of anti-nuclear and anti-double stranded DNA antibodies in the serum of patients with prediagnosed as sytemic lupus erythematosus

Fahriye Ekşi, Efgan Doğan Gayyurhan, Tekin Karşılıgil, Ayşen Bayram

Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gaziantep

İletişim / Correspondence: Yrd. Doç. Dr. Fahriye Ekşi Adres / Address: Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Üniversite Bulvarı, 27310 Gaziantep Tel: 0342 3603910/77763 Gsm: 0532 5239620 Faks: 0342 3601617 e-mail: fahriyeeksi@hotmail.com

ÖZET

Bu çalışmada, sistemik lupus eritematoza (SLE) ön tanısı almış hastalarda antinükleer antikor (ANA) ve anti-double stranded DNA (Anti-dsDNA) antikorlarının saptanmasında IFA ve EIA yöntemlerinin etkinliğinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada Temmuz 2005-2006 tarihleri arasında Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Seroloji laboratuvarına gönderilen, SLE ön tanısı almış 59 hastanın serum örnekleri indirekt floresan antikor (IFA) ve enzim temelli testler (EIA) ile eş zamanlı olarak incelenmiş ve sonuçlar değerlendirilmiştir. Çalışmamız sonucunda, 59 hastanın 50'sinde (%84.7) IFA testi ile, 35'inde (%59.3) EIA testi ile ANA pozitifliği tespit edilmiştir. Anti-ds DNA varlığı açısından 59 hastanın 21'inin (%35.6) IFA ile, 30'unun (%50.8) EIA ile pozitif olduğu görülmüştür. EIA testinin, ANA varlığı açısından duyarlılığı %70, özgüllüğü %100 olarak bulunurken, ds-DNA varlığı açısından duyarlılığı %90.5, özgüllüğü %71.1 olarak tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Sistemik Lupus Eritematozus, antinükleer antikor, anti-dsDNA, indirek immünfloresan, enzim immünassay.

SUMMARY

In this study, our objective is to compare the efficacy of the IFA and EIA methods in the detection of anti-nuclear antibodies (ANA) and anti-double stranded DNA (Anti-dsDNA) in patients with prediagnosed as systemic lupus erythematosus (SLE). All serum samples (n:59) obtained from patients with prediagnosed SLE and submitted to the Microbiology and Clinical Microbiology Laboratories between July 2005 and 2006 were examined by indirect fluorescent antibody (IFA) and enzyme immunoassay (EIA) tests and results were compared. The IFA test gave a positive ANA indication in 50 (84.7%) out of 59 patients, compared to 35(59.3%) with the EIA test. In terms of Anti-ds DNA existence, the IFA test gave a positive indication for 21 (35.6%) out of 59 patients whereas, using the EIA method, the number was 30 (50.8%) patients. We determined that the sensitivity of the EIA test to the presence of ANA was 70 %, and that its specificity was 100 %. We found that, in terms of ds-DNA existence, its sensitivity and specificity were 90.5% and 71.1%, respectively.

Key words: Systemic lupus erythematosus, anti-nuclear antibodies, anti-dsDNA, indirect immunofluorescence, enzyme immunoassay.

GİRİŞ

Sistemik lupus eritematozus (SLE), sıklıkla hücre çekirdeğindeki intrasellüler antijenlere karşı otoantikorların mevcut olduğu çok yönlü bir otoimmün hastalıktır. Nükleer komponentlere karşı oluşan otoantikorlar, antinükleer antikor (ANA)

olarak adlandırılır (1). ANA testi, konnektif doku hastalıklarında (SLE, skleroderma, CREST sendromu, Sjögren Sendromu, mikst konnektif doku hastalığı, poliomyozit, dermatomyozit) bir tarama testi şeklinde yaygın olarak kullanılır (2). ANA pozitif olan hastaların çoğu SLE değildir,

ancak SLE'li kişilerin çoğu (%95'ten fazla) ANA pozitif'tir (1,2). Antinükleer antikolların (ANA) SLE'de görülme oranı %100'e yakın olmasına karşın başka otoimmün hastalıklarda da bulunabileceğinden, ayırıcı değeri düşüktür. SLE'de bugün için tanısal değeri en yüksek sayılan antikollar çift zincirli DNA (ds DNA) ve Smith antijenine (Sm) karşı olanlardır (3). ANA ve anti-ds DNA antikollarının araştırılmasında indirekt floresan antikor (IFA), Western Blot (WB), Farr assay ve enzim immün assay (EIA) gibi farklı yöntemler kullanılmaktadır (4). Antinükleer antikolların tespiti için genellikle tercih edilen yöntem indirekt immünfloresan (IFA) yöntemidir (5). IFA-ANA yönteminin basit, uygulaması kolay ve maliyetinin düşük olması gibi avantajlarına karşın bazı önemli sınırlamaları vardır. Örneğin testin değerlendirmesi zaman alıcı ve subjektif olup, sonuçların geçerliliği büyük ölçüde değerlendiren kişinin bilgi, deneyim ve yeterliliğine bağlıdır. Bir başka dezavantajı ise çok sayıdaki nükleer antijenlerin tiplendirmesinin kesin olarak yapılamamasıdır. Son yıllarda; farklı nükleer antijenlerin tiplendirmesine olanak sağlayan; pratik ve değerlendirmesi objektif olan enzim temelli testler (EIA) ve western blot gibi moleküler temelli yöntemler uygulamaya girmiştir (6).

Bu çalışmada, SLE ön tanısı almış hastalarda ANA ve anti-ds DNA antikollarının varlığını IFA ve EIA yöntemleri ile araştırılması ve referans yöntem olarak kabul edilen IFA'ya göre, EIA'nın duyarlılık ve özgüllüğünün saptanması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya Temmuz 2005-2006 tarihleri arasında Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Seroloji laboratuvarına gönderilen ve klinik olarak SLE ön tanısı alan 59 hastanın serum örnekleri dahil edilmiştir. Çalışma grubu 18-70 yaşları arasında, 49'u (%83.1) kadın, 10'u (%16.9) erkek hastadan oluş-

muştur. Tüm serum örnekleri IFA ve EIA testleriyle eş zamanlı olarak incelenmiştir.

IFA testi ile ANA araştırılması. ANA varlığının araştırılması için standart IFA yöntemi (IMMCO Diagnostics, Inc. USA) kullanılmıştır. Hep-2 hücreleri ile kaplı özel lam alanları üzerine örneklerin 1/80 sulandırılmaları eklenerek, üretici firmanın önerileri doğrultusunda uygulanmıştır. Sonuçlar floresan mikroskopunda (Zeiss, Germany) 20X ve 40X objektiflerle ve en az iki farklı kişi tarafından incelenmiştir.

IFA testi ile anti-ds DNA araştırılması. IFA yöntemi ile anti-ds DNA araştırılmasında, antijenik substrat olarak Crithidia luciliae içeren lamlara (IMMCO Diagnostics, Inc. USA) serum örneklerinin 1/10 sulandırılmaları eklenmiş ve test üretici firmanın önerileri doğrultusunda uygulanmıştır. Sonuçlar floresan mikroskopunda (Zeiss, Germany) 20X ve 40X objektiflerle incelenmiştir.

EIA ile ANA ve anti-ds DNA tespiti. EIA testi, AESKULISA ANA-Hep2 (AESKU Diagnostics, Germany) ve AESKULISA ds-DNA Check (AESKU Diagnostics, Germany) kitleri kullanılarak TRITURUS Biotect (Grifols-USA) otomatize EIA sisteminde çalışılmıştır. ANA-Hep 2 testi dsDNA, histon, SS-A(Ro), SS-B(La), Sm, SnRNP/Sm, Scl-70, PM-Scl, Jo-1 ve sentromer antijenlerini içermektedir. Test üretici firmanın önerileri doğrultusunda uygulanmıştır.

BULGULAR

Çalışmamız sonucunda, 59 hastanın 50'sinde (%84.7) IFA testi ile, 35'inde (%59.3) EIA testi ile ANA pozitifliği tespit edilmiştir. Anti-ds DNA sonuçlarına bakıldığında 59 hastanın 21'inin (%35.6) IFA ile, 30'unun (%50.8) EIA ile pozitif olduğu görülmüştür (Tablo1).

EIA testinin, ANA varlığı açısından duyarlılığı %70, özgüllüğü %100 olarak bulunurken, ds-

Tablo 1. 59 hastanın IFA ve EIA yöntemleri ile ANA ve Anti ds-DNA sonuçları.

| Toplam hasta sayısı n=59 | IFA | | | | | | | | EIA | | | | | | | |
|-----------------------------|-----|------|-----|------|--------|------|-----|------|-----|------|-----|------|--------|------|-----|------|
| | ANA | | | | ds-DNA | | | | ANA | | | | ds-DNA | | | |
| | (+) | % | (-) | % | (+) | % | (-) | % | (+) | % | (-) | % | (+) | % | (-) | % |
| | 50 | 84.7 | 9 | 15.3 | 21 | 35.6 | 38 | 64.4 | 35 | 59.3 | 24 | 40.7 | 30 | 50.8 | 29 | 49.2 |

DNA varlığı açısından duyarlılığı %90.5, özgüllüğü %71.1 olarak tespit edilmiştir.

TARTIŞMA

Kollajen doku hastalığı olanlarda farklı hücre, doku ve antijenlerine karşı otoantikör oluşumu karakteristiktir (6). Dolaşımdaki otoantikörlerin tanımlanması, doğru tanı konmasında, prognozu göstermede ve tedavinin izleminde rehberlik etmede yararlıdır (7). SLE etyolojisi tam olarak bilinmeyen, klinik ve laboratuvar bulguları çok çeşitli ve değişken olabilen, kronik, otoimmün ve multisistemik bir hastalıktır (8). Otoantikörlerin varlığı, SLE'nin tanısı için önemli olup, antinükleer antikörler (ANA), anti-Sm veya anti-ds DNA antikörleri, SLE için tanı kriterleri arasında yer alır (9). IFA, bugün için klinik laboratuvarlarda çeşitli nükleer antijenlere karşı oluşan otoantikörlerin tespitinde en yaygın kullanılan metottur (10). Bununla birlikte zahmetli ve değerlendirilmesi subjektif bir test olması ve antijen tiplerinin kesin ayrımının yapılamaması gibi sınırlamalarından dolayı alternatif olarak enzim immünasay (EIA) yöntemi geliştirilmiştir (6,11).

Bugün için Kollajen Doku Hastalıkları'nda (KDH) tanımlanan otuzdan fazla antijen-antikör kompleksi bulunmasına karşın, EIA ve western blot (WB) ile 10-12 kadarını saptamak mümkündür. Ancak IFA ile çalışılan hücre hattı, teorik olarak hücresel otoantijenlerin hepsini içermektedir. Dolayısıyla, immün floresan yöntemi, KDH'da yeni antijen-antikör kompleksleri bulunsa da tercih edilen yöntem olma özelliğini yitirmeyecektir (4).

Antinükleer antikörler, SLE için çok duyarlı ol-

masına karşın, sağlıklı bireylerin üçte birinde, 1/40 dilüsyonla ANA tespit edilebilmekte, bu oran 1/160 dilüsyonda yirmi kişide bir olmaktadır (1). Tan ve ark (12)'nin yaptığı çalışmada, immünofloresan yöntemiyle, sağlıklı bireylerde 1/40 dilüsyonla %31.7 ANA pozitifliği bulunmuştur. Aynı çalışmada, 1/80, 1/160 ve 1/320 dilüsyonlarla sırasıyla %13.3, %5 ve %3.3 ANA pozitifliği saptanmıştır. Bu çalışmada görüldüğü gibi, ANA-IFA için başlangıç dilüsyonu olarak 1/40 oranı sağlıklı kişilerde de yüksek oranda pozitif olabildiği için, bizim çalışmamızda 1/80 dilüsyon oranı ile çalışılması tercih edilmiştir.

ANA tespitinde IFA ile EIA'nın karşılaştırıldığı çeşitli çalışmalara literatürde sıkça rastlamak mümkün olmakla beraber, sonuçlar oldukça değişik oranlarda bildirilmektedir. Emlen ve O'Neill (13) SLE'li hastalarda, Hep-2 hücreleri ile gerçekleştirilen immünofloresan test ile altı farklı EIA ANA kitini karşılaştırmış ve IFA ile %88 ANA pozitiflik saptamış, buna karşılık EIA ile ANA pozitifliği %62 ile %90 arasında değişiklik göstermiştir. Tonuttia ve ark (14) otoimmün hastalığı bulunan 315 kişide ANA için IFA ile beş ticari EIA kitini karşılaştırmış, IFA ile %92 ANA pozitifliğine karşılık, EIA ile bu oran %74 ile %94 arasında değişiklik göstermiştir. Aynı araştırmacılar ticari enzim immünasay testlerinin bazılarının IFA ile karşılaştırılabilir düzeyde, bazılarının daha yüksek tanısal doğruluk taşıdığını, bazılarının sonuçlarının kabul edilemez olduğunu belirtmekte, ancak sonuç olarak IFA'ya alternatif bir tarama testi olarak kullanılabileceğini söylemişlerdir. Alem ve ark (15) ANA IFA testine karşılık değişik nükleer antijenlere (SS-A, SS-B,

Scl-70, Sm, RNP, Jo-1, ENA, histone, ss-DNA ve ds-DNA) karşı otoantikörleri test eden üç farklı EIA-ENA kitini çalışmışlar, IFA-ANA pozitif örneklerin %97'sini, EIA ile pozitif bulmuşlar ve hasta örneklerinin taranmasında güvenilir olduğu sonucuna varmışlardır. Reisner ve ark (11), 808 serum örneğini taradıkları çalışmalarında ANA varlığı için IFA ve EIA testini karşılaştırmışlar, EIA'nın duyarlılık ve özgüllüğünü sırasıyla %94.6 ve %86.0 bulmuşlar, ek olarak; EIA testinin yüksek negatif prediktif değere sahip olmasından dolayı ANA-negatif sonuçlar için güvenilir olarak kullanılabilceği, ancak düşük pozitif prediktif değerinden dolayı EIA-pozitif örneklerin IFA ile doğrulanması gerektiği sonucuna varmışlardır. Gniewek ve ark (2) 467 hasta ve 98 sağlıklı kan vericisinin serumlarında ANA tespiti için IFA ve EIA ile çalışmışlar ve EIA'nın IFA ile eşit duyarlılığa sahip olduğunu, özgüllüğünün ise daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. Jaskowski ve ark (10) da 601 hasta ve 202 normal kan vericisinin serum örneklerinde ANA tespiti için IFA ve beş değişik EIA testi ile çalışmışlar ve EIA testlerinin, IFA ile karşılaştırıldığında hem duyarlı hem de özgül olduğu sonucuna varmakla beraber, beş değişik EIA testinin hiçbirinin %100 duyarlı olmadığını da vurgulamışlardır. Görüldüğü gibi çalışmalarda EIA testlerinin duyarlılık ve özgüllüğü oldukça geniş bir aralıkta tespit edilebilmektedir. Bununla birlikte özellikle Anti-ds DNA için IFA ve EIA yöntemlerini karşılaştıran çalışmalara literatürde çok fazla rastlanmamıştır. Tan ve ark (16), dokuz değişik EIA kitini değerlendirmişler ve sadece ikisinin anti-dsDNA için kabul edilebilir duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğunu tespit etmişlerdir, sonuç olarak özellikle anti-dsDNA ve anti-Sm için, EIA testlerinin geliştirilmeye ihtiyacı olduğunu belirtmişlerdir.

Bizim çalışmamızda, IFA ile karşılaştırıldığı zaman, EIA testinin duyarlılığı ANA için %70, anti-dsDNA için %90.5'tir, özgüllüğü ise ANA ve anti-dsDNA için sırasıyla %100 ve %71.1 olarak bulunmuştur. Bulgularımız, genel olarak lite-

ratürle uyumlu olmasına karşın çalışmamızın bazı sınırlamaları mevcuttur. Bunlar, olgu sayısının az olması ve kontrol grubu olarak sağlıklı birey serumlarının çalışılmamış olması şeklinde sayılabilir. Sonuç olarak, bu noktalar üzerinde durularak planlanan yeni çalışmaların daha iyi yol gösterici olacağı kanısına varılmıştır. Bununla birlikte, çalışmamızın anti-dsDNA saptanmasında IFA, EIA testlerinin karşılaştırılması amacıyla yapılan az sayıdaki çalışmaya katkı sağlayacağı düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Egner W: The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE. J Clin Pathol.2000; 53: 424-432.
2. Gniewek RA, Stites DP, McHugh TM, Hilton JF, Nakagawa M: Comparison of antibody testing methods: immunofluorescence assay versus enzyme immunoassay. Clin Diag Lab Immunol 1997; 4:185-188.
3. Ruacan Ş: Otoimmünite. "Ş Ustaçelebi (ed) Temel ve Klinik Mikrobiyoloji", Güneş Kitabevi: Ankara,1. baskı, 1999; S.247.
4. Yılmaz Ö, Karaman M, Ergon MC, Bahar İH, Yuluğ N: Konnektif doku hastalıklarının tanısında antinükleer (ANA) ve anti-double stranded DNA (anti-ds DNA) antikorlarının önemi. T Parazitoloj Derg 2005; 29:287-290.
5. Kern P, Kron M, Hiesche K: Measurement of antinuclear antibodies: assessment of different test systems. Clin Diag Lab Immunol 2000; 7: 72-78.
6. Yılmaz O, Karaman M, Koşar Y, Bahar İH, Yuluğ N: Antinükleer antikorların saptanmasında indirekt immunofloresan, enzim immunoassay ve western blot yöntemlerinin karşılaştırılması. Mikrobiyol Bül 2001; 35: 473-480.
7. Fritzler MJ: Clinical relevance of autoantibodies in systemic rheumatic diseases. Mol Biol Rep 1996; 23:133-145.
8. Sayarlıoğlu M, Topçu N: İleri yaşta başlayan Sistemik lupus eritematozus. Van Tıp Dergisi 2003; 10:83-87.
9. Hoffman IEA, Peene I, Meheus L, Huizinga TWJ, Cebecauer L, Isenberg D et al.: Specific antinuclear antibodies are associated with clinical features in systemic lupus erythematosus. Ann Rheum Dis 2004; 63:1155-1158.
10. Jaskowski TD, Schroder C, Martins TB, Mouritsen CL, Litwin CM, Hill HR: Screening for antinuclear antibodies by enzyme immunoassay. Am J Clin Pathol 1996; 105: 468-473.
11. Reisner BS, DiBlasi J, Goel N: Comparison of ana enzyme immunoassay to an indirect fluorescent immunoassay for the detection of antinuclear antibodies. Am J Clin Pathol 1999; 111:503-506.
12. Tan EM, Feltkamp TE, Smolen JS, Butcher B, Dawkins

- R, Fritzler MJ et al.: Range of antinuclear antibodies in "healthy" individuals. *Arthritis Rheum.* 1997; 40:1601-1611.
13. Emlen W, O'Neill L: Clinical significance of antinuclear antibodies: comparison of detection with immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assays. *Arthritis Rheum* 1997; 40:1612-1618.
14. Tonuttia E, Bassetti D, Piazza A, Visentini D, Poletto M, Bassetto et al.: Diagnostic accuracy of ELISA methods as an alternative screening test to indirect immunofluorescence for the detection of antinuclear antibodies. Evaluation of five commercial kits. *Autoimmunity* 2004; 37:171-176.
15. Alem M, Moghadam S, Malki J, Zaidi A, Nayak N, Li TM: Detection of autoantibodies to nuclear antigens by EIA and IF techniques. *Allerg Immunol (Paris)* 1997; 29:188-191.
16. Tan EM, Smolen JS, McDougal JS, Butcher BT, Conn D, Dawkins R et al.: A critical evaluation of enzyme immunoassays for detection of antinuclear antibodies of defined specificities. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 455-464.