

Anti-Nükleer Antikorların (ANA) Araştırılması ve Saptanmasında Kullanılan Teknikler

Zeki YUMUK(*), Şeyda ÇALIŞKAN(*), Sibel GÜNDEŞ(**), Ayşe WILLKE(*)

(* Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
(**) Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Bakterioloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışmanın amacı, otoantikor testleri konusunda elde edilen tecrübeleri, bu alanda çalışan araştırmacılara aktarmaktır. Bu amaç için, yaklaşık iki yıllık otoantikor test sonuçları retrospektif olarak değerlendirilmiştir. Laboratuvarımızda bu süre zarfında, 2869 serumda ANA testi çalışılmıştır. Serumların 810 tanesinde ANA pozitif (%28,2) bulunmuştur. ANA pozitif 208 serumda anti-ENA testi çalışılmıştır, bunlardan 126 (%60,5) tanesinde antijen tipi belirlenebilmiştir. ANA negatif bulunan 313 olgunun ise yalnızca 4 (%1,3) tanesinde anti-ENA pozitif bulunmuştur. Otoantikor test sonuçlarına zaman zaman güvensizlik olmakla birlikte, klinik ve laboratuvar arasındaki iletişim ve testi değerlendiren hekimin deneyiminin bu güvensizliğe çözüm getirebileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Antinükleer antikor

SUMMARY

Investigation of Antinuclear Antibodies (ANA) and Techniques for Detection

To report our experiences to the investigators in the field of testing autoantibodies is the aim of this study. Therefore, laboratory data collected during two years has been evaluated retrospectively. In this period of time, 2869 sera have been tested for ANA existence. Of these 810 (28.2%) sera were found to be ANA positive. Anti-ENA test was performed to 208 ANA positive sera, of those 126 (60.5%) were found to be positive. Anti-ENA test was also performed to 313 ANA negative sera, of those only 4 (1.3%) were found to be positive. Although, sometimes the results of ANA test were evaluated as distrustful, it is thought that the experiences of the physician interpreting the results could solve the inconvenience situation.

Keywords: Antinuclear antibody

GİRİŞ

Yaklaşık 50 yıldır, otoimmün hastalıkların teşhisinde ve tedavisinin takibinde otoantikor testleri kullanılmaktadır (4). İlk yıllarda otoantikor testlerinde kullanılan malzemelerin bir çoğu elde hazırlanırken, son yıllarda ticari firmaların bu alandaki girişiyle kitler geliştirilmiştir (6;12). Günümüzde ticari kitler, elde hazırlanandan daha ekonomik, daha kolay kullanıma sahip ve daha standardize test imkanları sunmaktadır (4). Kitler genellikle otoantikor

testlerinin yapılabilmesi için gerekli tüm malzemeleri içermektedir ve uygulanması bu nedenle kolaylaştırılmıştır. Ancak, ticari kitlerin sağladığı kolaylıkların yanında, doğru sonucun verilebilmesi için kullanılan teknoloji hakkında tecrübe sahibi olmak gerekmektedir (1).

Ticari otoantikor test kitleri, indirekt immunofloresan (IIF), immunodiffüzyon, immunoblotting, enzyme-linked immunoassay (ELISA) ve son zamanlarda geliştirilen lazer antijen ölçüm gibi teknolojileri sunmaktadır (2;10). ELISA, otoantikor testleri arasında en fazla tercih edilenlerden bir tanesidir,

İletişim : Zeki Yumuk
e-posta: zyumuk@isbank.net.tr

çünkü duyarlı, ekonomik ve az ekipman gerektiren bir test şekli sunmaktadır (1). Ancak ELISA testlerinin standardizasyonu için günümüze kadar çok az çalışma yapılmıştır, bu nedenle kalite kontrolü gibi işlemlerin tamamı üretici firmaya bırakılmıştır. Farklı firmalara ait ELISA kitleri kullanılarak elde edilen sonuçların, IIF kitleri kullanılarak elde edilen sonuçlardan farklı çıktığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (4). IIF teknolojisi, ELISA'dan daha çok tecrübe gerektirmektedir. IIF'da testin duyarlılığı, değerlendiren kişinin tecrübesiyle doğru orantılı olarak artmaktadır. ELISA'dan farklı olarak IIF standardizasyonu için bir çok değerli çalışma yapılmıştır. İmmunoblotting ve laser teknolojisi, antijenin belirlenmesine yönelik kullanılmaktadır (9). Bir çok araştırmacı tarafından önerilen yöntem, IIF teknolojisi kullanılarak otoantikör varlığının belirlenmesi ve antijen tipinin ortaya çıkartılması için immunoblotting yönteminin kullanılması şeklinde olmuştur (1). Laser teknolojisi, geliştirilme aşamasında olduğu için henüz yaygın olarak tercih edilmemektedir.

Bu konuda güçlük yaşanan diğer bir özellik de sağlıklı bireylerde otoantikör test sonuçları pozitif çikabilmesidir (1). Otoantikör pozitiflik oranı, bölgeler, ülkeler, ırklar, cinsiyetler arasında farklılık gösterebilmektedir (12). Bu nedenle, demografik kriterlerin göz önüne alındığı otoantikör prevalansının belirlenmesine yönelik çalışmalar önem taşımaktadır. Ancak ülkemizde bu yönde yapılmış geniş kapsamlı bir çalışma, yaptığımız literatür taramasında bulunamamıştır. Sağlıklı kişilerin %30'unda (1/40 dilüsyon) ANA testinin hiçbir otoimmün hastalığa bağlı olmadan pozitif olabileceği yurtdışı dergilerde yayınlanmıştır (2), bu oranın %40 civarına çıktığını gösteren yayınlar da bulunmaktadır (11).

Bir kişinin kanında belirli düzeylerde otoantikör bulunması, o kişide otoimmün bir hastalığın olabileceğini düşündürmektedir veya otoimmün bir hastalığı olan kişide hastalığın şiddeti ve hastalığa karşı gelişen immün yanıtın şiddeti hakkında bilgi vermektedir (5). Bu nedenle, otoantikör testleri önem kazanmıştır. Her laboratuvarın, otoantikör belirlemede kullandığı teknikleri, bu tekniklerin avantajlarını ve

dezavantajlarını, sınırlamalarını iyi araştırması ve klinikle birlikte en uygun yöntemi kendi bölgesi için seçmesi gerekmektedir (12). Geliştirilen ve uygulana yöntemlerin detaylarının yayınlanması, elde edilen tecrübenin pekiştirilmesi açısından önem taşımaktadır (4). Bu çalışmanın amacı, otoantikör testleri konusunda elde edilen tecrübelerin, bu alanda çalışan araştırmacılara aktarmaktır. Bu amaç için, yaklaşık iki yıllık otoantikör test sonuçları retrospektif olarak değerlendirilmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez laboratuvarı, Ekim 2002-Haziran 2004 kayıtları otoantikör test sonuçları açısından değerlendirilmiştir. Kayıtlardan, ANA test sonucu, pozitif sonuçların dilüsyonu, anti-ENA sonucu, testin istenildiği bölüm ve testin çalışılmasında kullanılan ticari kit bilgileri alınmıştır.

IIF Testi

Kayıtların değerlendirildiği periyotta, Euroimmune (Almanya), Binding Site (İngiltere), Zeus (ABD) firmalarına ait IIF kitleri kullanılmıştır. Ekim 2002 – Haziran 2003 tarihleri arasında Euroimmune, Haziran 2003 – Şubat 2004 tarihleri arasında Binding Site, Şubat – Haziran 2004 tarihleri arasında Zeus firmasına ait kit kullanılarak ANA çalışılmıştır. Tüm ticari kitlerde hasta serumları 1/100 oranında dilüe edilerek çalışılmıştır. 1/100 dilüsyonda ANA pozitif çıkan serumlar için 1/500 ve 1/1000 dilüsyonda test tekrarlanmıştır. Tüm ticari kitlerin çalışma şekilleri birbirine benzer özellik taşımaktadır ve kısaca kitler şu şekilde çalışılmıştır: Serum örnekleri fosfat tamponlu izotonik solüsyon (PBS) ile 1/100 oranında dilüe edilmiştir. Slayt üzerindeki her bir kuyucuğa 70 ml dilüe edilmiş serum damlatılmıştır. Otuz dakika oda ısısında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda slaytlar 5 dakika aralıklarla iki defa PBS ile yıkanmıştır. Flöresan işaretli anti-human immünoglobulin (konjugat) ile kuyucuklar tekrar doldurulmuş ve 30 dakika oda ısısında inkübe edilmiştir. PBS ile tekrar yıkanmıştır. Kuyucuklara mounting medium doldurularak lamel ile kapatılmıştır. Hazırlanan slaytlar 400x büyütmede flöresan mikroskopunda incelenmiştir. Ekim 2002 – Kasım

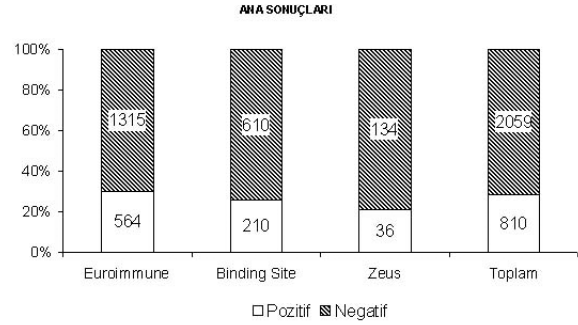
2003 tarihleri arasında çalışılan testler Leica DML marka, Kasım 2003 – Haziran 2004 tarihleri arasında çalışılan testler ise Olympus marka flöresan mikroskop kullanılarak değerlendirilmiştir.

Anti-ENA testi

Anti-ENA testi Euroimmune firmasına ait Euroline® kiti kullanılarak yapılmıştır, başka yöntem veya ticari kit çalışmada kullanılmamıştır. Bu kit Immunblotting prensibine göre üretilmektedir. Testte kullanılan her bir strip, nRNP/Sm (U1-nRNP), Sm, SS-A, Recombinant Ro-52 (Ro-52, 52kDa), SS-B, DNA-Topoisomerase I (Scl-70), PM-Scl, Histidyl-tRNA Synthetase (Jo-1), Centromer protein B (CENP B), Double-stranded DNA (dsDNA), Nucleosomes, Histones, Pyruvate-dehydrogenase complex (AMA-2) antijenlerini içermektedir. Test üzerindeki antijenler, insanda IgG sınıfında bulunan otoantikorlarının kalitatif değerlendirmesini yapabilecek nitelikte bulunmuştur. İlk reaksiyon basamağında 1/100 oranında dilüe edilmiş hasta serumları immünblot striplerle inkübe edilmiştir. İnkübasyon için firma tarafından sağlanan kuvvetler kullanılmıştır. Test üzerindeki herhangi bir antijene karşı varsa antikor (pozitiflik), spesifik Ig G antikorları (Ig A ve Ig M dahil) karşılığı olan antijenik bölgeye bağlanmaktadır. Bağlı antikor saptamak için renk reaksiyonu oluşturma kapasitesi olan insan IgG (enzim konjugat) işaretli enzim ile ikinci bir inkübasyon yürütülmektedir. Sonuçlar çıplak gözle değerlendirilmiştir.

BULGULAR

Ekim 2002-Haziran 2004 tarihleri arasında 2869 serumda ANA testi IIF yöntemi kullanılarak çalışılmıştır. Testlerin 1879 (%65,4) tanesi Euroimmune,



Şekil 1. ANA test sonuçlarının kullanılan ticari kitlere göre oranları.

820 (%28,6) tanesi Binding Site, 170 (%6) tanesi ise Zeus ticari firmalarına ait kitler kullanılarak çalışılmıştır. Değerlendirme, 2241 (%78,1) testte Leica DML, 628 (%21,9) testte ise Olympus marka flöresan mikroskop kullanılarak yapılmıştır. Serumların, 810 (%28,2) tanesinde ANA test sonucu pozitif bulunmuştur. Kullanılan ticari kitlere göre pozitiflik oranı Şekil 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1'de serumların gönderildiği bölümler gösterilmektedir. En fazla serum dermatoloji ve dahiliye bölümlerinden gönderilmiştir. Serum, başlangıçta 1/100 oranında dilüe edilerek çalışılmıştır. Bu dilüsyonda pozitif bulunan serum daha sonra 1/500 ve 1/1000 oranında dilüe edilerek tekrar çalışılmıştır. 1/100 dilüsyonda pozitif çıkan 540 sonuç bir üst dilüsyonda negatif çıkmıştır. Dilüsyonlarla birlikte 2869 serum için, toplam 3628 otoantikor testi harcanmıştır (Tablo 1). Anti-ENA testi, ANA pozitif bulunan 208, negatif bulunan 313 toplam 521 serumda çalışılmıştır (Tablo 2). Bu çalışmada 208 ANA pozitif bulunan serumda anti-ENA çalışılmış ve 126 (%60,5) tanesinde pozitif sonuç bulunmuştur, buna rağmen 313 negatif ANA sonucu için anti-ENA istenilmiş ve sadece 4 (%1,3) tanesinde po-

Tablo 1. ANA pozitif sonuçlarının dilüsyon ve bölümlere göre dağılımı.

ANA	DİLÜSYON						BÖLÜMLER							
	1/100 (n: 2599)		1/500 (n: 759)		1/1000 (n: 270)		Dermatoloji (n: 1670)		Pediatri (n: 214)		Dahiliye (n: 1570)		Diğer* (n: 174)	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Pozitif	540	20.77	219	28.9	51	18.9	360	21.56	66	30.8	345	21.97	39	22.4
Negatif	2059	79.33	540	71.1	219	81.1	1310	78.44	148	69.2	1225	78.03	135	77.6

*Genel Cerrahi, Nöroloji, İnfeksiyon Hastalıkları, KBB Bölgeleri

Tablo 2. Anti-ENA pozitif sonuçlarının dilüsyon ve bölümlere göre dağılımı.

Anti-ENA**	DİLÜSYON			BÖLÜMLER			
	1/100	1/500	1/1000	Dermatoloji	Pediatri	Dahiliye	Diğer*
anti-nRNP/Sm (U1-nRNP)	13	2	7	11	2	9	0
anti-SS-A	17	7	9	15	5	11	2
anti-SS-B	4	1	3	3	1	3	1
anti-Scl-70	0	0	3	1	0	1	1
anti-CENP-B	4	3	0	4	0	4	0
anti-dsDNA	7	3	4	8	1	4	1
anti-nucleozom	6	3	2	4	0	5	2
anti-Histon	13	0	8	8	1	10	2
anti-AMA-M2	3	2	2	3	0	4	0

*Genel Cerrahi, Nöroloji, İnfeksiyon Hastalıkları, KBB Bölümleri

**Anti-ENA, Euroline profilinde 13 antijen bulunmaktadır, Sm, Ro-52, PM-Scl, Jo-1 antijenlerine karşı hiçbir serumda antikor bulunmamıştır.

zitif sonuç bulunmuştur.

TARTIŞMA

Otoimmün hastalıklar, erken teşhis edilmediği zaman ölüme ve kalıcı sekellere neden olabilmektedir (5). Otoimmün hastalıkların teşhisinde, otoantikor testleri genellikle tercih edilmektedir (3). Güvenilir otoantikor test sonuçları hastanın sağlığına önemli katkıda bulunmaktadır (12). Çalışılan testin güvenilir sonuçlar verebilmesi için laboratuvarında kullanılan yöntem konusunda bilgi ve tecrübe sahibi olunması, testin istendiği kliniklerle iletişim kurulması, hasta ve hastalığa ait bilginin edinilmesi gerekmektedir (1).

Pozitif sonucun her zaman bir hastalığı yansıtmadığı, yüksek dilüsyonlarda elde edilen pozitif sonucun otoimmün hastalıklar açısından daha anlamlı olabileceği bilinmektedir (7). Buna rağmen, sonuçların değerlendirilmesi aşamasında klinisyen ANA pozitif sonucu herhangi bir otoimmün hastalıkla ilişkilendiremediği durumda testin yanlış çalışıldığını düşünmektedir (12). Ülkemizde, toplumda pozitif ANA prevalansını gösteren bir çalışma araştırmamız sonucu bulunamamıştır. Bazı yurtdışı yayınlarda bu oranın %30-40 civarında olabileceği gösterilmiştir (2;11). Hastanemiz kliniklerinden laboratuvarımıza gelen eleştirilerin başında, pozitif ANA sonuçlarının yüksek oranda çıktığı şeklinde olmaktadır. Bu çalışmada pozitif ANA oranı 1/100 serum

dilüsyonu kriter alındığında, çalışılan 2869 testte %28,2 olarak bulunmuştur. Bu değer, hastanemiz kliniklerine tedavi amacıyla başvuran hasta serumlarından elde edilmiştir ve normal toplumu yansıtmamaktadır. Normal popülasyonda, 1/40-1/80 serum dilüsyonu kriter alınarak yapılan yurtdışı kaynaklı çalışmalarda, ANA pozitifliği %30-40 oranında bulunmuştur. Otoantikor testlerinde genel olarak serumların başlangıç dilüsyonu 1/80 olarak önerilmektedir. Klinikten gelen eleştiriler dikkate alınarak, bizim laboratuvarımızda bu oran 1/100 olarak belirlenmiştir.

Otoantikor testlerinin en sık dermatoloji ve dahiliye bölümlerinden istendiği bildirilmiştir (12), bu araştırmada da en sık dermatoloji ve dahiliye bölümlerinden otoantikor testleri istenmiştir. Klinik uygulamada, ANA testi pozitif bulduktan sonra anti-ENA testi istenmektedir. Ancak bazen, anti-ENA ANA ile birlikte istenmiştir, bu şekilde testin güvenilirliğinin artırılması amaçlanmıştır. IIF tekniğinde ANA varlığı Hep-2 hücreleri kullanılarak araştırılmaktadır. Bu teknoloji aracılığıyla bilinen ve bilinmeyen tüm antijenlere karşı var olan otoantikorlar değerlendirilebilmektedir. Anti-ENA testi ise sadece bilinen bir antijenin kullanıldığı bir yöntemdir. Bu nedenle, anti-ENA'nın ANA testinden daha duyarlı olabileceği düşünülmemelidir (8;12). Diğer yandan, anti-ENA testleri pahalıdır ve çalışılması zaman almaktadır.

Bir laboratuvar sonucunun başka bir laboratuvarda tekrarlanması, klinisyenlerin nadiren de olsa başvurabileceği güven artırma yöntemleri arasında bulunmaktadır (1). Farklı firmalara ait ELISA kitleri kullanılarak elde edilen sonuçların, IIF kitleri kullanılarak elde edilen sonuçlardan farklı çıktığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (4). Otoantikör testleri açısından, bir sonucun laboratuvarlar arasında farklı çıkabileceği unutulmamalıdır.

Euroimmune kitlerine ait slaytların her bir kuyucuğunda 4 doku (Hep-2 hücresi, primat karaciğeri, sıçan böbrek ve mide dokusu) bulunmaktadır. Binding Site ve Zeus kitlerine ait slaytların her bir kuyucuğunda Hep-2 dokusu bulunmaktadır ve çalışmada bu kitler kullanılarak ANA testi çalışılmıştır. Bu çalışmada, yansıtılan tecrübenin önemli bölümü Euroimmün kiti çalışılarak elde edilmiştir. Test kuyucuğunda bulunan 4 doku sonuca bütünlük katmaktadır. Aynı serum ve testte ANA ve ASMA sonucu birlikte çalışılabilmektedir. Binding Site kitinde kuyucuklarda sadece Hep-2 dokusu bulunmaktadır ve dokunun daha büyük olması değerlendirilmesinde güven vermektedir.

Otoantikör testleri, IIF ticari kitlerin içinden çıkan kılavuz aracılığıyla kolaylıkla çalışılabilmektedir. Ancak elde edilen sonucun güvenilir olabilmesi için tecrübe ve klinikle koordinasyon gerekmektedir (1). Bu çalışmada, laboratuvarımızda elde edilen tecrübe yansıtılmıştır. Bölgemizde ve ülkemizde otoantikör testlerine daha fazla önem verilmesi gerektiği düşünülmektedir. Ülkemizde, normal toplumda ANA prevalansını ortaya koyacak çalışmaların yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Bradwell AR. Immunofluorescent antinuclear antibody tests. "Rose NR, ed. Manual of Clinical Laboratory Immunology." 6 edn, p.922, ASM Press, Washington, DC (2002).
2. Egner W. The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE. *J Clin Pathol* 53: 424 (2000).
3. Fritzler MJ, Salazar M. Diversity and origin of rheumatologic autoantibodies. *Clin Microbiol Rev* 4: 256 (1991).
4. Fritzler MJ, Wiik A, Fritzler ML, Barr SG. The use and abuse of commercial kits used to detect autoantibodies. *Arthritis Res Ther* 5: 192 (2003).
5. Leslie D, Lipsky P, Notkins AL. Autoantibodies as predictors of disease. *J Clin Invest* 108: 1417 (2001).
6. McFarlane IG. The relationship between autoimmune markers and different clinical syndromes in autoimmune hepatitis. *Gut* 42: 599 (1998).
7. Mohan C, Alas E, Morel L, Yang P, Wakeland EK. Genetic dissection of SLE pathogenesis. Sle1 on murine chromosome 1 leads to a selective loss of tolerance to H2A/H2B/DNA subnucleosomes. *J Clin Invest* 101: 1362 (1998).
8. Paulus HE, Wiesner J, Bulpitt KJ et al. Autoantibodies in early seropositive rheumatoid arthritis, before and during disease modifying antirheumatic drug treatment. *J Rheumatol* 29: 2513 (2002).
9. Peene I, Van Ael W, Vandenbossche M, Vervaet T, Veys E, De Keyser F. Sensitivity of the HEp-2000 substrate for the detection of anti-SSA/Ro60 antibodies. *Clin Rheumatol* 19: 291 (2000).
10. Pollock W, Toh BH. Routine immunofluorescence detection of Ro/SS-A autoantibody using HEp-2 cells transfected with human 60 kDa Ro/SS-A. *J Clin Pathol* 52: 684 (1999).
11. Rosenberg AM, Semchuk KM, McDuffie HH et al. Prevalence of antinuclear antibodies in a rural population. *J Toxicol Environ Health A* 57: 225 (1999).
12. Tan EM, Feltkamp TE, Smolen JS et al. Range of antinuclear antibodies in "healthy" individuals. *Arthritis Rheum.* 40: 1601 (1997).