

Anti nükleer antikörlerin pozitif saptandığı hastalarda immunoblotting test sonuçlarının değerlendirilmesi (*)

Evaluation of immunoblotting test results in patients with positive antinuclear antibody

İlhan Afşar¹, Aslı Gamze Şener¹, Ahmet Vural¹, Nail Hızlı², Metin Türker¹

Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi¹, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, ²Romatoloji Kliniği, İzmir

İletişim / Correspondence: İlhan Afşar Adres / Address: Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Yeşilyurt, İzmir
Tel: 0.232. 244 44 44-2439 Gsm: 0.532. 605 67 70 E-mail: iafsar@yahoo.com

ÖZET

Otoimmün bağ dokusu hastalıklarının tanısında indirekt immun floresan (IIF) tekniği ile otoantikörlerin tespiti en çok tercih edilen yöntemdir. Otoimmün hastalıklarda otoantikörlerin ayırımını yapmak doğru tanı için temel oluşturur. Ekstrakte edilen nükleer antijenlerin kullanılmasıyla geliştirilen testler, otoantikörlerin ayırımını daha net olarak yapmıştır.

Çalışmamızda bir yıllık süreçte IIF testi ile anti nükleer antikoru (ANA) pozitif saptanan hastalarda immunoblotting (IB) testi ile yapılan çalışma sonuçları retrospektif olarak değerlendirilmiştir. Toplam 2587 hastada IIF ile ANA araştırması yapılmıştır. IIF ile 215 hastada +2< ANA pozitifliği saptanarak immunoblotting çalışılmıştır. IB testi ile 171 (%79.5) hastada en az bir antikör tespit edilmiştir, 44 (%20.4) hastada IIF testinde antikör saptanırken IB testinde hiçbir antikör tespit edilememiştir. En fazla SS-A/Ro-52 antijenine karşı antikör saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: Anti nükleer antikör, indirekt immun floresan, immunoblotting

SUMMARY

Determination of autoantibodies by the indirect immunofluorescent (IIF) technique is the most preferred method for the diagnosis of connective tissue disorders. Differentiation of autoantibodies is the basis of correct diagnosis in otoimmün diseases. This method allows the extracted antigens (ENA) to be used for the differentiation of autoantibodies clearly.

In our study, we evaluated the results of Immunoblotting (IB) test in patients with positive anti-nuclear-antibody (ANA) which was determined by the IIF technique during one year period retrospectively. A total of 2587 patients were evaluated for ANA positivity by the IIF technique. Of the 2587 patients, 215 were found to be positive for +2<ANA by the IIF method, and they were studied by the IB test. Of the 215 patients with ANA positivity, 171 (79.5%) were found to have at least one autoantibody, whereas 44 (20.4%) were found to have no autoantibody by the IB test. The autoantibody against SS-A/Ro-52 antigen was the most frequent autoantibody determined by the IB test.

Key words: Anti-nuclear-antibody, indirect immunofluorescent, immunoblotting

(*) Çalışma XXXII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi'nde (12-16 Eylül 2006 Antalya) sunulmuştur.

GİRİŞ

Serumda otoantikor aranması son 50 yıldır otoimmün hastalıkların tanı ve sağaltım takibinde önem kazanmıştır. Araştırmacıların istekleri doğrultusunda üretici firmalar geniş bir ürün yelpazesinde kullanımı, değerlendirmesi kolay ve maliyeti düşük testler üretmişlerdir. Ticari otoantikor test kitleri değişik teknikler ile geliştirilmiştir. İndirekt immünofloresan (IIF), immünodifüzyon (ID), immünoblotting (IB), ELISA ve son zamanlarda geliştirilen lazer antijen ölçüm teknikleri bu teknikleri kapsar (1).

Tanı kitleri içinde IIF testi tarama testi olarak kullanılmakta, antijen tipinin ortaya çıkarılması ve IIF testinin doğrulanması amacıyla diğer testler önerilmektedir (2). IIF testi anti nükleer antikor (ANA) varlığını ortaya koyar buna karşın bazı durumlarda antikorların hangi antijene karşı oluştuğu tam olarak ayırtılamayabilir. Bu durumda diğer yöntemlerle antijen tiplendirmesi yapılır. Antijen tiplendirilmesi klinik açısından önemlidir. Çünkü ANA'ya spesifik antijen, ilgili hastalığın tanısında özgüdür. Örneğin anti-dsDNA ve anti-Sm antikorları sistemik lupus eritematozus (SLE)'a spesifik görünürken, anti-Scl70 ve anti sentromer antikorları sistemik skleroz, anti-Jo1 polimiyozit, anti-SSA ve anti-SSB Sjögren sendromu, SLE, skleroderma ve romatoid artrit 'inde içinde bulunduğu romatizmal bağ dokusu hastalıklarında saptanabilir (3).

Otoantikorlar genellikle poliklonaldır ve sıklıkla antijenin bir çok hedefine karşı oluşur. Kullanılan testler antikorların farklı özel bölgelerini saptar. SLE'de anti-dsDNA 'nın %30-%70 gibi geniş bir aralıkta saptanabilmesi kullanılan testlerin farklılığına bağlanabilir. ID yüksek afiniteli antikorları, IIF ılımlı ve yüksek afiniteli antikorları, ELISA düşük ve yüksek affiniteli antikorları saptayabilir. Pürifiye antijenler kontaminant olabilir ya da doğal proteinin tüm komponentlerini kapsamayabilir. İdeal testi tanımlarken bu etkenleri göz önünde bulundurmalıyız(4).

ANA saptanan bir çok hasta SLE tanısı almazken SLE tanısı alan bir çok hastada ANA saptanmıştır. Sağlıklı toplumun 1/3'ünde 1/40 ve 1/20 dilüsyonlarda ANA pozitifliğine rastlanabilir (5). Sağlıklı bireylerde düşük oranlarda ANA pozitifliğine rastlanması klinik olarak değerlendirme güçlüğünü ortaya çıkarmıştır. Bölgeler, ülkeler, ırklar, cinsiyet farklılıklarının ortaya çıkarılması amacıyla prevalansa yönelik çalışmalar yapılarak demografik özellikler ortaya konmalıdır (2).

Bu çalışmanın amacı bir yıllık süreçte IIF testi ile ANA'u pozitif saptanan hastalarda IB testi ile yapılan doğrulama ve spesifik antijen sonuçlarının retrospektif olarak değerlendirilmesidir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada, Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi (İZMİR) Mikrobiyoloji laboratuvarında Haziran 2005- Haziran 2006 tarihleri arasında IIF tekniği ile çalışılan test sonuçları ve pozitif saptanan serumların IB test sonuçları değerlendirilmiştir.

IIF testinde (ANA profile 3, EUROIMMUN) 1/100 oranında dilüe edilerek çalışılmıştır. Üretici firma önerileri doğrultusunda hazırlanan preparatlar floresan mikroskopunda (ZEISS) X40 objektifde değerlendirilmiştir. Floresan keskinliği negatif kontrol (0) ve pozitif kontrol (+4) baz alınarak +1 den +5 aralığında semikantitatif olarak değerlendirilmiştir (3) IIF ile +2< pozitif olan serumlar IB testine alınmıştır.

IB testi (ANA profile 3 EUROLİNE, EUROIMMUN) kiti kullanılarak 1/100 dilüsyonda üretici firma önerileri doğrultusunda çalışılmıştır. IB testi sonucu IB striplerinde saptanan antikorlar bilgisayarda EUROLİNE SCAN programı kullanılarak (+,+ +,+++) kantitatif değerlendirilmesi yapılmıştır.

BULGULAR

Toplam 2587 hastada IIF ile ANA araştırması yapılmıştır. IIF ile 215 hastada +2< ANA pozitifliği saptanarak immünoblotting çalışılmıştır. Değerlendirme sonuçları Tablo 1'de görülmektedir.

Tablo 1. İmmunoblotting ile saptanan otoantikor tipleri.

	AMA M2	RIB. P PROT	HISTON	NUKLEOSOM	dsDNA	PCNA	SENTROMER-B	JO-1	PM-Scl	Scl-70	SS-B	RO-52	SS-A	Sm	RNP/Sm
+	7	8	7	36	14	15	4	7	10	5	15	24	15	7	13
++	11	2	6	7	4	1	3	2	1	1	4	5	6		3
+++	10	4	1	5	3	1	13		2	13	16	43	35	13	22
TOPLAM	28	14	14	48	21	17	20	9	13	19	35	72	56	20	38

Toplam 171 (%79.5) hastada IB testinde en az bir antikor tespit edilmiştir. 15 ayrı antijen tipi bulunan IB testinde toplam 402 antikor saptanmıştır. En fazla SS-A/Ro-52 antijenine karşı antikor saptanmıştır. Hastalarımızın bir çoğunda SS-A/Ro-52 ve SS-B beraberliği vardır.

Çalışmamızda 44 (%20.4) hastada IIF testinde antikor saptanırken IB testinde hiçbir antikor tespit edilememiştir.

TARTIŞMA

Kullanımı kolay ve ekonomik olması nedeniyle ANA tespitinde yaygın kullanılan yöntem IIF yöntemidir. Buna karşın sonuçların değerlendiren bireye göre değişebilmesi, subjektif olabilmesi ve zaman almasından dolayı dezavantaja sahiptir. Çalışanın bilgi ve deneyimi öne çıkmaktadır. Nükleer antijenlerin tiplendirmesinin bazen yapılamaması diğer bir dezavantajdır. IB yönteminde tek bir test stripi ile birden fazla antijenin saptanabilmesi, striplerin saklanıp tekrar değerlendirilebilmesi avantaj oluştururken, ekonomik olarak pahalı olması ve sınırlı sayıda antijeni tespit edebilmesi dezavantaj oluşturmaktadır (6).

Çalışmamızda 215 hastanın 171 'inde (%79.5) en az bir antijen tespit edildi. Yumuk ve ark.(2) yaptığı çalışmada 208 hastanın 126'sında (%60.5) antijen tipi belirlenebilmiştir. Berkem ve ark (6) 88 IIF pozitif örneğin 29'unda (%32.9) antijen tespit etmişler. İlk çalışma 1/100 dilüsyonu pozitif alırken ikinci çalışma 1/40'ı pozitif kabul etmiş. Çalışmamızda 1/100 başlangıç dilüsyonu alınarak +2< keskinliği IB testine alındı. Böylece 1/100'ün üstü hastaları IB testine almış ol-

duk. Bu sebepten dolayı çalışmamızda diğerlerine göre daha fazla antijen saptanmış olabilir. Bazı toplumlarda %40'a kadar düşük ANA pozitifliği olabileceği bildirilmiştir (7). Bu yüzden üretici firma önerileri de göz önünde tutularak 1/100 dilüsyon üstü pozitiflikleri IB testine aldık. Çünkü IB testi IIF testi gibi tarama amaçlı kullanıldığında ya da 1/20-1/40 gibi düşük pozitifliklerde kullanıldığında klinisyene önemli bir katkıda bulunmayacağı gibi maddi yük oluşturacağı düşüncesindeyiz. ANA tespitinde IIF etkili bir tarama testidir. Yalancı pozitiflikler fazladır ve klinik önemi titre ve patern ile açıklanamaz. Buna karşın 1/160 titre ve üzeri önemlidir. Hep-2 hücreleri ANA tespitinde çok duyarlı bir substrat olmasına karşın düşük pozitifliklere karşı iyi kalibre edilmelidir (4). IIF testinde Kang ve ark. (8) 1/160 titrenin altındaki ANA pozitifliklerini IB testine almaya gerek olmadığını homojen paterne sahip her hangi bir titredeki ANA pozitifliğinde Anti-dsDNA araştırması gerektiğini belirtmişlerdir.

IB testi ile en fazla Ro-52 antijenini ve beraber olarak da SS-A (60kDa), SS-B antijenini tespit ettik. SS-A/Ro antijeni küçük nükleostoplazmik RNA protein kompleksidir. 52kDa ve 60kDa ağırlığında iki proteini kapsar. SS-A veya SS-B antikorlarının saptanması Avrupa birliği çalışma grubu tarafından Sjögren sendromunun tanı kriterleri arasında kabul edilmiştir (9). Peene ve ark. (3) yaptığı çalışmada SS-A (%10.5) ve SS-B (%6.7) oranında tespit edilirken Faria ve ark. (10) SLE' li hastalarda Ro/SS-A 'ya antijenine karşı %47 oranında antikor saptamışlardır.. Tunusda yapılan diğer bir çalışmada SLE'li hasta-

larda en fazla SS-A anti-extractible nuclear antigens (ENA) karşı (%54.8) antikor tespit etmişlerdir (11). Hastalarımızın bir çoğu romatoloji kliniği ve polikliniği hastasıdır. Bu yüzden sık görülen hastalıkla beraber ilgili antijen saptanacaktır. SS-A ve SS-B SLE ve sjögren sendromunda görülebilir SLE için spesifik olmasa da Antids-DNA 'nın saptanamadığı durumlarda klinik önemi vardır (4). Çalışmamızın sonuçlarını değerlendirirken SLE ve sjögren sendromlu hastaların daha fazla olabileceğini göz önünde bulundurmalıyız. Peene ve ark. (3) IIF ile pozitif saptanan hastalarda ENA tespiti için ek testlere gereksinim olduğunu ve düşük titrelerdeki pozitifliklerde (SS-A antijeni kapsasa bile) gerek olmadığını ve ayrıca yukarıda belirttiğimiz gibi güçlü SLE şüphesi olmasa bile homojen paterne sahip ANA pozitifliğinde Anti-dsDNA araştırılması gerektiğini savunmaktadırlar. IB testinin güvenilirliği kullanılan antijenin kalitesine , gel elektroforesin ayırt etme gücüne ve nitroselüloz membrana antijen transfer yeteneği gibi üretim tekniğine dayalı özelliklere bağlıdır. Ayrıca çalışma hataları her zaman göz önünde bulundurulmalıdır (6). Çalışmamızda IIF tekniği ile pozitif olan 44 hastada IB ile herhangi bir antijene karşı antikor tespit edilmemiştir. Test striplerimizde tüm pozitif kontroller çalışmıştı ve bu yüzden çalışma hatası ekarte edilebilir. Sonuç olarak strip üzerindeki 15 antijen dışındaki antijen tipine karşı antikor pozitif olabilir. Böylece IIF testinde saptanan antijen IB testinde saptanmayabilir. Bu durum her zaman akılda tutulmalıdır.

ENA profil teknikleri ELISA, immunoblotting, line-blot assays, ve flow cytometric bead-based multiplex assays testlerini kapsamaktadır (12). Bu testleri kullanırken üzerinde önemle durulması gereken durumlar aşağıdadır.

(a) IIF ile pozitif ANA testi patern ve titreye bağlı olarak ENA (IB olabilir) testi ile çalışılmaktadır. (b)Yeni ENA antijen saptama testleri geniş çok merkezli çalışmalarla klinik değerlendirilmesi yapılmalıdır. (c) Klinisyene tam ve doğru yo-

rumla ENA testinin çalışıldığı bildirilmelidir (13).

Sonuç olarak, IIF testi ANA için tarama testi olarak kullanılırken, IB testini tanımlama ve doğrulama amacıyla kullanmalıyız. Patern farklılıklarına bağlı olarak IB testinin negatif olabileceğini unutmamalıyız.

KAYNAKLAR

1. Fritzler MJ, Wiik A, Fritzler ML, Barr SG. The use and abuse of commercial kits used to detect autoantibodies. *Arthritis Res Ther.* 2003; 5: 192-201.
2. Yumuk Z, Çalışkan Ş, Gündeş S, Willke A. Anti-Nükleer antikorların araştırılması ve saptanmasında kullanılan teknikler. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2005; 35: 40-44.
3. Peene I, Meheus L, Veys EM, De Keyser F. Detection and identification of antinuclear antibodies (ANA) in a large and consecutive cohort of serum samples referred for ANA testing. *Ann Rheum Dis* 2001; 60: 1131-6.
4. Egner W. The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE. *J Clin Pathol* 2000; 53: 424-32.
5. van Venrooij WJ, Charles P, Maini RN. The consensus workshops for the detection of autoantibodies to intracellular antigens in rheumatic diseases. *J Immunol Meth* 1991; 140: 181-9.
6. Berkem R, Gümüş T, Karakoç E, Acar N. Antinükleer antikorların tespitinde indirekt immunfloresan antikor ve immunoblot assay yöntemlerinin karşılaştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2004; 34: 124-130
7. Rosenberg AM, Semchuk KM, McDuffie HH, Ledingham DL, Cordeiro DM, Cessna AJ, Irvine DG, Senthilselvan A, Dosman JA. Prevalence of antinuclear antibodies in a rural population. *J Toxicol Environ Health A* 1999; 57: 225-36.
8. Kang I, Siperstein R, Quan T, Breitenstein ML. Utility of age, gender, ANA titer and pattern as predictors of anti-ENA and-dsDNA antibodies. *Clin Rheumatol* 2004; 23: 509-15.
9. Toker E, Yavuz S, Direskeneli H. Anti-Ro/SSA and anti-La/SSB autoantibodies in the tear fluid of patients with Sjögren's syndrome. *Br J Ophthalmol* 2004; 88: 3847.
10. Faria AC, Barcellos KS, Andrade LE. Longitudinal fluctuation of antibodies to extractable nuclear antigens in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2005; 32: 1267-72
11. Haddouk S, Ben Ayed M, Baklouti S, Hachicha J, Bahlou Z, Masmoudi H. Autoantibodies in systemic lupus erythematosus: spectrum and clinical associations] *Pathol Biol (Paris)* 2005; 53: 311-7. (Abstract)
12. Eissfeller P, Sticherling M, Scholz D, Hennig K, Luttich T, Motz M, Kromminga A. Comparison of different test systems for simultaneous autoantibody detection in connective tissue diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1050: 327-39.
13. Damoiseaux JG, Tervaert JW. From ANA to ENA: how to proceed? *Autoimmun Rev* 2006; 5: 10-7.