

# Klinik laboratuvarlarda kullanılan otoantikör tanı testlerinin değerlendirilmesi

## *Evaluation of diagnostic autoantibody tests used in clinical laboratories*

Zeki Yumuk, Şeyda Çalışkan

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

İletişim / Correspondence: Zeki Yumuk Adres / Address: Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Umuttepe 41380, Kocaeli Tel: (0262) 303 74 48 E-mail: zyumuk@kou.edu.tr

### ÖZET

Sistemik lupus eritematozus gibi bir grup otoimmün hastalıkların teşhisinde anti nükleer antikor (ANA) testleri teşhise yardımcı olmaktadır. İndirekt immunfloresan (IIF) metodu yaklaşık 40 yıldır ANA testlerinde kullanılmaktadır. IIF yöntemi için yoğun iş gücüne ve ileri düzeyde eğitilmiş personele ihtiyaç duyulduğundan alternatif yöntemler geliştirilmiştir. Ancak yeni alternatif yöntemler IIF'dan daha iyi sonuç verme konusunda yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle otoantikör testlerinin yapıldığı klinik laboratuvarlarda yeni geliştirilen alternatif testlerin uygunluğu sürekli araştırılmalıdır. Bu çalışmada, rutin laboratuvarımızda uygulanan klasik otoantikör testleri ve eklenen yeni testlerin bir değerlendirmesi yer almaktadır. Sonuç olarak, dsDNA testi tek bir yöntemle bağlı kalarak sonuçlandırılmamalıdır. dsDNA için ilk aşamada IIF veya RIA tercihe edilmeli ve ELISA ile sonuçlar konfirme edilmelidir. Homojen patern pozitif sonuçlara mutlaka titrasyon uygulanmalıdır. ENA çalışmalarında, tarama testi olarak immunblotting yöntemi kullanılabilirliği halde konfirmasyon için ELISA yöntemi tercih edilmelidir. Otoantikör çalışacak klinik laboratuvarların, kullanılacak yöntem ve markayı tercih etmeden önce karşılaştırmalı ön çalışma yapmaları önerilmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Otoantikör, anti nükleer antikor, dsDNA

### SUMMARY

Anti nuclear antibody (ANA) tests are valuable in the diagnosis of autoimmune disease such as systemic lupus erythematosus. Indirect immunofluorescence (IIF) assay have been used more than 40 years for ANA tests. Because the use of IIF is time-consuming and requires highly trained personnel considerable effort has been put into developing simpler assays for routine use. However, newer tests can never be rated better than the old. Thus, laboratories performing autoantibody tests should continuously evaluate the newer alternative tests. In the present study, the classical autoantibody tests and the newer alternatives in our routine laboratory were evaluated. In conclusion, dsDNA test should be confirmed with a second test. For dsDNA, primarily IIF or RIA should be preferred and then confirmed with ELISA method. Titration should be performed to homogenous pattern positive results. ENA immunoblotting method might be used as a screening method and confirmation should be reached with an ELISA method. In a clinical laboratory, before performing autoantibody tests, a comparable study concerning commercial and methodological features should be done.

**Key words:** Autoantibody, anti nuclear antibody, dsDNA

### GİRİŞ

Otoantikör testleri sistemik lupus eritematozus (SLE) gibi bazı romatolojik hastalıkların teşhisinde kullanılmaktadır. Anti nükleer antikor (ANA) testi en sık kullanılan otoantikör testidir. ANA testi genellikle indirekt immunfloresan (IIF) tekniği ve Hep-2 hücreleri ile yapılmaktadır (1). Otoimmün hastalığı olduğu düşünülen bir hastadan alınan serum örneği Hep-2 hücreleriyle yaklaşık 30 dakika inkübe edilir, preparat yıkanır ve sonra floresan işaretli anti-insan globulin içeren

ayrıça inkübasyon işlemi tekrarlanır. Hazırlanan preparatta hasta serumunda bulunan otoantikörlerin yoğunluğuna paralel floresan boya bulunmaktadır. Preparat floresan mikroskopunda incelendiğinde, floresan boyanın yoğunluğuna paralel bir ışığa izlenir. Işımanın yoğunluğu fazla olduğunda patern belirlemek zorlaşmaktadır. Ayrıca, yoğun ışığın görüldüğü preparatlara ait serumlara dilüsyon yapılarak, aynı ölçüde serumda bulunan otoantikör miktarı belirlenmektedir (titre). Titre hastanın tedavisinde ve takibinde önemli yer tutmaktadır (2).

Otoantikör testlerinde ikinci aşamada, paterne neden olan antijenin (tipin) belirlenmesi işlemi gelmektedir. Konuyla ilgili araştırmaların sonucunda klinik önemi olan Sm, SS-A, SS-B, U1-snRNP, dsDNA ve Scl-70 gibi bazı antijen tipleri ayrıştırılabilmektedir (3). Gerekli taktirde, pozitif ANA sonucundan sonra antijenin belirlenebilmesi için ENA adı verilen test uygulanmaktadır. Örneğin, ANA test sonucu speckled pattern pozitif çıkan bir hastada, ENA testiyle de U1-snRNP pozitif bulunur ise hastanın SLE olasılığının yüksek olduğu düşünülmektedir. ENA testinin maliyeti yüksektir. Bir ENA testi maliyet olarak 10 – 15 arası IIF ANA Hep-2 testine karşılık gelmektedir. Bu nedenle, her ANA pozitif çıkan sonuca ENA yapılması önerilmemektedir. ENA testinin sadece yeni teşhis konulan hastalara uygulanması önerilmektedir (4).

IIF ANA Hep-2 pozitif sonuçlandığında, bir seri dilüsyon yapılarak (1:160, 1:320 ve 1:640 gibi) titre belirlenmekte, ayrıca otoimmün hastalığı olabileceği ilk defa düşünülen bir hastada pozitif sonuca ENA testi yapılmaktadır. Uluslar arası genel kabul gören algoritmik yaklaşım bu şekildedir (5). IIF ANA ve ENA testleri maliyetli ve uğraştırıcı yöntemler olduğu için bazı araştırmacılar, maliyeti düşürecek, iş yükünü azaltacak bir takım düzenlemeler üzerinde çalışmıştır. IIF ANA Hep-2 pozitif sonuçlandığında titre yerine floresan yoğunluğunun kullanılabilmesi önerilmiş ve teste pratiklik kazandırdığı için önemli ölçüde kabul görmüştür. Negatif ve pozitif kontrollere göre floresan yoğunluğu +1 ile +5 arasında puanlanmıştır (6).

Bu çalışmanın amacı, IIF yöntemiyle Hep-2 hücrede ANA sonucu homojen bulunan örneklerde genel kabul gören algoritmik yaklaşım dahilinde karşılaşılan problemlerin belirlenmesidir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Kocaeli Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Romatoloji, Dermatoloji ve Pediatri polikliniklerine başvurmuş toplam 90 hastadan alınmış ve anti nükleer antikör (ANA) homojen patern pozitif bulunmuş serum örnekleri çalışmaya dahil

edilmiştir. Anti nükleer antikör (ANA), ELISA ve ENA testleri üretici firmanın (Euroimmun, Lübeck, Almanya) önerisi doğrultusunda çalışılmıştır.

ANA testi şu şekilde yapılmıştır: Hep-2 antijen substratı ile dilüe edilmiş serum 30 dakika inkübe edilmiştir. Fosfat tamponlu serum fizyolojik solüsyonuyla (pH 7.2) üç defa ortalama 5 dakika yıkandıktan sonra floresan işaretli anti-insan globulin içeren ayıraçla 30 dakika daha inkübasyon yapılmıştır. Bu aşamadan sonra yıkama işlemi tekrarlanmış ve kuyucuklara alkalik gliserin tamponu damlatılarak 400 defa büyütmede Zeiss marka floresan mikroskopunda preparatlar değerlendirilmiştir.

ENA testi Euroimmun firmasına ait Euroline kitini kullanılarak yapılmıştır. 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), Nucleosome, Histones, Pyruvate dehydrogenase complex (AMA-2 antijenlerini içermektedir. Test üzerindeki antijenler, insanda IgG sınıfında bulunan otoantikörlerin kalitatif değerlendirilmesini 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 üzerinde ki herhangi bir antijene karşı varsa antikör (pozitiflik), spesifik IgG antikörleri (IgA ve IgM dahil) karşılığı olan bölgeye bağlanmaktadır. Bağlı antikörü saptamak için renk reaksiyonu oluşturma kapasitesi olan insan IgG (enzim konjugat) işaretli enzim ile ikinci bir inkübasyon yürütülmektedir. Sonuçlar çıplak gözle değerlendirilmiştir.

## BULGULAR

Otoimmün hastalık şüphesi olan hastadan alınan serum örneklerinde indirekt immunfloresan (IIF) yöntemiyle Hep-2 hücrede anti nükleer antikör (ANA) testi çalışıldı. Pozitif sonuçlardan homo-

jen patern gösteren ve floresan yoğunluğu 2+'in üzerinde olan örnekler çalışmaya dahil edildi.

Bütün örneklerde, IFF yöntemiyle *crithidia*'da dsDNA, ELISA yöntemiyle dsDNA, centromer ve anti mitekondriyal antikor (AMA), immünb-

lotting yöntemiyle dsDNA, nucleosome, histone Scl-70, PM-Scl, nRNP/Sm, SS-A, Ro52, RibP-pro, AMA, Jo-1 ve PCNA testleri çalışıldı.

(Tablo 1)

**Tablo 1.** ENA sonuçlarının gruplara arasında ki dağılımı

Serum No.	Flore. yoğun.	ds-DNA		ANA Profile 3 (anti-ENA, Immunblotting, Euroimmun) sonuçları (skor)												
		IFF	ELISA	Homojen					Speckled				Cytoplasm		Diğer	
				dsDNA	Nucle	Hist	Scl-70	PM-Scl	nRNP/Sm	Sm	SSA	Ro52	RibP-pro	AMA		PCNA
1	5+	po		1												
2	5+						3									
3	5+		845	3	3	2			3	1	3	3	2			
6	5+						3									
7	5+		886			1										3
8	5+		774			1					1		2			3
9	5+		227		2						2		3			
10	5+		131								3	3				
11	5+		116	1												
12	5+						3									
14	5+		215		2						3	3		3		
16	5+						3									
18	5+	po	229	1	2	1										
20	5+	po	779	1	3											
21	5+						3				3					
22	5+		395		3											
24	4+		144													
35	3+											3				
40	3+				3											
43	3+		226													
45	3+	po	239	1												1
47	3+															1
56	3+		129													
58	3+		178													
59	3+													1		
71	3+						2									
73	3+															
82	2+			1					3		3	3				
87	2+	po						1								1
89	2+									1						

Tablo 1’de ELISA ve IIF yöntemiyle bakılan dsDNA sonuçlarıyla birlikte ENA pozitif sonuçlar gösterilmektedir. Serumların 25’inde (%27,8), IIF homojen paternle uyumlu ENA sonucu bulundu. Buna ek olarak 17 serumda speckled, 10 serumda ise sitoplazmik paternle uyumlu ENA sonucu bulundu. Klinik ilişki kurulamayan 5 serumda PCNA pozitif bulundu. ENA floresan yoğunluğu 5+ olan serumlarda daha fazla pozitif bulundu. Centromer IIF, ELISA ve immunblotting ile bütün serumlarda negatif bulundu. AMA, ELISA ile bütün serumlarda negatif bulunurken immunblottin ile 2 serumda pozitif bulundu. IIF ile 5 serumda dsDNA pozitif bulundu. Buna karşılık ELISA ile 15, immunblottin ile 7 serumda dsDNA pozitif bulundu (Tablo 1). Sadece 18, 20 ve 45nci serumlarda IIF, ELISA ve immunblotting ile dsDNA eş zamanlı pozitif bulundu.

#### TARTIŞMA

Sistemik lupus eritematozus (SLE) gibi bir grup otoimmün hastalıkların teşhisinde anti nukleer antikor (ANA) testleri teşhise yardımcı olmaktadır. İndirekt immunfloresan (IIF) metodu yaklaşık 40 yıldır ANA testlerinde kullanılmaktadır. IIF yöntemi için yoğun iş gücüne ve ileri düzeyde eğitilmiş personele ihtiyaç duyulduğundan “gold standard” olan bu yöntem alternatif yöntemler geliştirilmiştir. Ancak yeni alternatif yöntemler IIF’den daha iyi sonuç verme konusunda yetersiz kalmaktadır (2). Bu nedenle otoantikor testlerinin yapıldığı klinik laboratuvarlarda yeni geliştirilen alternatif testlerin uygunluğu sürekli araştırılmalıdır. Bu çalışmada, rutin laboratuvarımızda uygulanan klasik otoantikor testleri ve eklenen yeni testlerin bir değerlendirmesi yer almaktadır.

Özgüllüğü yüksek olan dsDNA otoantikor testi, SLE hastalarının yaklaşık %60-80’inde pozitif bulunmaktadır (7). dsDNA’nın belirlenmesi için IIF, ELISA ve radioimmünassay (RIA) yöntemleri kullanılmaktadır (8). IIF dsDNA kolay yöntemlerden bir tanesidir ve özgüllüğü yüksektir. ELISA dsDNA non-spesifik reaksiyonlara ve dolayısıyla yanlış pozitifliklere olanak tanımaktadır.

RIA dsDNA için tercih edilen substrat, testin duyarlılığını ve özgüllüğünü belirgin bir şekilde etkilemektedir. Son yıllarda immunblotting yöntemi de dsDNA testi için geliştirilmiştir. Bu çalışmada, RIA haricinde, IIF, ELISA ve immunblotting metodları homojen patern ANA pozitif serumlarda çalışıldı. dsDNA testleri arasında tutarlı bir sonuç elde edilemedi. Testlerde kullanılan DNA kaynağı, tek veya çift zincirli olması, konjugat gibi faktörler sonucu etkilemektedir. dsDNA testini kullanan laboratuvarın optimum yöntemi seçebilmesi için klinikle yakın ilişki kurup benzer karşılaştırmaları yapması gerekmektedir.

ENA belirlenmesinde genellikle ELISA kullanılmaktadır. Son yıllarda immunblottin yöntemi geliştirilmiştir. İmmunblotting yönteminde nitrocelüloze kâğıt üzerine saflaştırılmış ENA’lar paralel şekilde yerleştirilmiştir. İmmunblotting yönteminde tek bir strip üzerinde 13- 14 kadar test aynı anda yapılabilir (9). Bu çalışmada homojen patern ANA pozitif serumlara ENA immunblotting yöntemi kullanılarak uygulandı. ENA sonuçları, homojen olarak belirlenmiş bazı paternleri, speckled ve sitoplazmik paternlerle karıştırdığı veya üst üste bindiğini göstermektedir. Homojen patern pozitif ANA sonucu alındığında, mutlaka titrasyona gidilmelidir. Titrasyon işleminin birkaç yararı bulunmaktadır. Bunlardan bir tanesi bu çalışmada da karşılaşıldığı gibi, homojen pater altında yatan diğer paterni örtebilmekte ve bu nedenle yanlış sonuç verilmesine neden olmaktadır, titrasyon bu karışıklığın çözülmesine yardımcı olur. Bazı koşullarda homojen pozitif sonuç alındığında ENA testinin uygulanabileceği önerilmektedir (10). Ancak bu çalışmada, ENA immunblotting yönteminin bu amaç için kullanılmaması gerektiği anlaşılmıştır. Çünkü ENA ile AMA pozitif bulunmasını rağmen ELISA’da sonuç negatif çıkmıştır. PCNA’ya, ENA immunblottingde yanlış pozitif sonuç olarak rastlanabilmektedir. Bu çalışmayla önerimiz, ENA immunblotting yönteminin maliyet göz önüne alınarak tarama testi olarak kullanılabileceğidir. ENA işleminin ELISA yöntemi kullanılarak yapılması önerilmektedir.

Sonuç olarak, dsDNA testi tek bir yöntemle bağli kalarak sonuçlandırılmamalıdır. dsDNA için ilk aşamada IIF veya RIA tercihe edilmeli ve ELISA ile sonuçlar konfirme edilmelidir. Homojen patern pozitif sonuçlara mutlaka titrasyon uygulanmalıdır. ENA çalışmalarında, tarama testi olarak immunblotting yöntemi kullanılabilceği halde konfirmasyon için ELISA yöntemi tercih edilmelidir. Otoantikör çalışacak klinik laboratuvarların, kullanılacak yöntem ve markayı tercih etmeden önce karşılaştırmalı ön çalışma yapmaları önerilmektedir.

### **KAYNAKLAR**

1. Muro Y. Antinuclear antibodies. *Autoimmunity* 2005;38: 3-9.
2. Ulvestad E, Kanestrom A, Madland TM, Thomassen E, Haga HJ, Vollset SE. Evaluation of diagnostic tests for antinuclear antibodies in rheumatological practice. *Scand J Immunol* 2000;52: 309-15.
3. Wenzel J, Gerdson R, Uerlich M, Bauer R, Bieber T, Boehm I. Antibodies targeting extractable nuclear antigens: historical development and current knowledge. *Br J Dermatol*. 2001;145: 859-67.
4. Phan TG, Wong RC, Adelstein S. Autoantibodies to extractable nuclear antigens: making detection and interpretation more meaningful. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9: 1-7.
5. Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, Solomon DH, Homburger HA. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. American College of Pathologists. *Arch Pathology Lab Med* 2000;124: 71-81.
6. 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.
7. Schiffer LE, Hussain N, Wang X et al. Lowering anti-dsDNA antibodies--what's new? *Lupus* 2002;11: 885-94.
8. Isenberg D, Smeenk R. Clinical laboratory assays for measuring anti-dsDNA antibodies. Where are we now? *Lupus* 2002;11: 797-800.
9. Prince HE, Hogrefe WR. Evaluation of a line immunoblot assay for detection of antibodies recognizing extractable nuclear antigens. *J Clin Lab Anal* 1998;12: 320-4.
10. Cordiali Fei P, D'Agosto G, Ameglio F et al. Determination of antibodies to extractable nuclear antigens by commercial kits: a multicenter study. *Int J Clin Lab Res* 1998;28: 29-33.