



T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KLİNİK ÖRNEKLERDE DFS PATERNİNİN VE ANTİ- DFS70 ANTİKORUNUN ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

Dr. Pelin ONARER

Antalya, 2019



T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KLİNİK ÖRNEKLERDE DFS PATERNİNİN VE ANTİ- DFS70 ANTİKORUNUN ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

Dr. Pelin ONARER

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Esvet MUTLU

“Kaynak gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

Antalya, 2019

Bu araştırma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TTU-2018 -3625 proje numarası ile desteklenmiştir.

TEŐEKKÖR

Lisans eğitimimi tamamladığım Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakóltesi'nde araştırma görevlisi olarak görev yapmanın ne kadar doğru bir tercih olduğunu anladığım bu zaman dilimi içerisinde bilgisi ve ışığıyla her zaman yanımda olan başta Doç. Dr. Esvet MUTLU hocama, bölüm başkanı Prof. Dr. Derya MUTLU ve tüm öğretim üyesi hocalarıma; ayrıca her zaman yanımda olan ve desteklerini hiç esirgemeyen canım aileme sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	vi
Şekiller Dizini	x
Tablolar Dizini	xii
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1.İmmün Sistem	2
2.1.1. Doğal İmmünite	2
2.1.2. Edinsel İmmünite	2
2.2. İmmünolojik Tolerans	3
2.2.1. Santral Tolerans	3
2.2.2. Periferik Tolerans	4
2.3. Otoimmünite Mekanizmaları	6
2.3.1. Genetik Yatkınlık	6
2.3.2.Çevresel Etkiler	6
2.3.3.Moleküler Taklit	7
2.4. Otoimmünite ve Mikrobiyota	7
2.5. Otoimmünite ve Hijyen Hipotezi	7
2.6 Anti Nükleer Antikorlar (ANA)	8
2.6.1 Ekstrakte Edilebilir Nükleer Antijenler (ENA)	9
2.7. Sistemik Otoimmün Romatizmal Hastalıklarda ANA ve ENA	10
2.7.1. Sistemik Lupus Eritematozus	10
2.7.2. Sjögren Sendromu	10
2.7.3. Sistemik Skleroz	11

2.7.4. Polimiyoit	11
2.7.5. Miks Bağ Doku Hastalığı	11
2.8. ANA IIF Testinde Boyanma Paternleri	12
2.8.1. Homojen Boyanma (AC-01)	13
2.8.2. Yoğun İnce Benekli Patern (DFS70 Benzeri Boyanma / Anti-LEDGF Benzeri Boyanma) (AC-02)	13
2.8.3. İnce Benekli (Granüler) Patern (AC-04)	14
2.8.4. Kaba Benekli (AC-05)	16
2.8.5. Sentromer Paterni (AC-03)	17
2.8.6. Nükleer Noktalanma (AC-06, 07)	18
2.8.7. Nükleolar Patern (AC-08, 09, 10)	19
2.8.8. Anti-Scl70 Benzeri Boyanma / Topo I (AC-29)	20
2.8.9. Nükleer Membran Paterni (Periferal Boyanma) (AC-11, 12)	21
2.8.10. Anti-PCNA Benzeri Boyanma (AC-13)	22
2.8.11. Sitoplazmik Boyanma (AC-15 / 23)	22
2.9. Otoantikorların Laboratuvar Tanısı	26
2.10. Otoantikor Saptamada Kullanılan Yöntemler	29
2.10.1. İndirekt İmmunofloresan (IIF)	30
2.10.2. Multiparametrik Yöntemler	30
2.11. DFS-70 Antijeni ve Antikoru	35
3. GEREÇ ve YÖNTEM	38
3.1 Gereç	38
3.1.1 Hasta Grubu	38

3.1.2 Serum Örneklerinin Toplanması ve Saklanması	38
3.1.3 Laboratuvar Gereçleri	39
3.1.4 Kullanılan Kitler	39
3.2 Yöntem	39
3.2.1.İndirekt Immunofloresan (IIF) Yöntemi	39
3.2.2 Line Immunoassay (LIA) Yöntemi	41
3.2.3 CytoBead ANA DFS70	42
3.2.4 Anti-DFS/70 ELISA (IgG)	44
3.2.5. İstatistiksel Analiz	45
4. BULGULAR	46
5. TARTIŞMA	54
6. SONUÇLAR	65
7. ÖZET	67
8. ABSTRACT	69
9. KAYNAKLAR	70
10. EKLER	87

SİMGELER VE KISALTMALAR

AARD	ANA İlişkili Otoimmün Romatizmal Hastalık (ANA Associated Autoimmune Disease)
AC	Anti-Cell
ACA	Anti-Sentromer Antikor
ACR	American College of Rheumatology
ALBIA	Addressable Laser Bead Assay
AMA-M2	Anti-Mitokondrial Antikor-M2
ANA	Anti-Nükleer Antikor
ANCA	Anti-Nötrofilik Sitoplazmik Antikor
Anti-dsDNA	Anti-double Stranded Deoxyribonucleic Acid
Anti-Sm	Anti-Smooth Muscle
Anti-RNAP III	Anti-RNA Polimeraz 3
Anti-U1-RNP	Anti-U1 Ribonükleoprotein
APC	Antijen Sunan Hücre (Antigen Presenting Cell)
ARA	Akut Romatizmal Ateş
BCR	B Hücre Reseptörü (B Cell Receptor)
CCD	Charged-Coupled Device
CD	Cluster of Differentiation
CIA	Chemiluminesant Immunoassay
CLIA	Chemiluminesant Immunoassay
CLIFT	<i>Crithidia luciliae</i> Immunofluorescence Test
CREST	Kalsinozis, Raynaud fenomeni, Özefagus dismotilitesi, Sklerodaktili, Talenjektazi
DFA	Direkt Floresan Antikor
DFS 70	Yoğun İnce Benekli 70 (Dense Fine Speckled 70)
DG	Doku Transglutaminaz
DIA	Dot Immunoassay
DM	Diabetes Mellitus
DNA	Deoksiribonükleik Asit

EBV	Ebstein Barr virüs
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ENA	Ekstrakte Edilebilir Nükleer Antijen (Ekstraktable Nuclear Antigen)
EULAR	European League Against Rheumatism
FasL	Fas Ligand
FITC	Flourescein Isothiocyanate
GBM	Glomerüler Bazal Membran
HBV	Hepatit B virüsü
HCV	Hepatit C virüsü
HEp-2	İnsan Epitelyal Karsinom Hücresi 2 (Human Epitelial Cell-2)
HIV	İnsan İmmünyetmezlik Virüsü (Human Immunodeficiency Virus)
HLA	İnsan Lökosit Antijeni (Human Leukocyte Antigen)
IB	Immunoblot
ICAP	International Consensus on Antinuclear Antibody Pattern
IFN	İnterferon
Ig	İmmünoglobulin
IgG	İmmünoglobulin G
IgM	İmmünoglobulin M
IIF	İndirekt İmmünofloresan (Indirect Immunofluorescence)
IL	İnterlöklin
IVIG	İntra Venöz İmmünoglobulin
İTP	İdiopatik Trombositik Purpura
KO	Knock Out
LE	Lupus Eritematozus
LEDGF	Lens Epiteli Kökenli Büyüme Faktörü (Lens Epithelium-Derived Growth Factor)
LIA	Line Immunoassay
MCTD	Miks Bağ Dokusu Hastalıkları (Mixed Connective Tissue Disease)

MHC	Majör Doku Uygunluk Kompleksi (Major Histocompatibility Complex)
MIA	Microbead Immunoassay
MPO	Myeloperoksidaz
MS	Multiple Skleroz
NK	Doğal Öldürücü hücre (Natural Killer Cell)
NPD	Negatif Prediktif Değer
PBS	Fosfat Tuz Tamponu (Phosphate Buffered Saline)
PM / DM	Polimiyozit / Dermatomyozit
PMMA	Polimetil Metakrilat
PPD	Pozitif Prediktif Değer
PR3	Proteinaz 3
PS	Polistiren
PSA	Polisakkarit A
PSIP1	PC4 ve SFRS1 Interacting Protein
RA	Romatoid Artrit
RIA	Radio Immunoassay
RNA	Ribonükleik Asit
SARD	Sistemik Otoimmün Romatizmal Hastalıklar (Systemic Autoimmune Rheumatic Diseases)
SELDI-TOF	Surface-Enhanced Laser Desorption Ionization-Time of Flight
SLE	Sistemik Lupus Eritematozus
SLICC	Sistemik Lupus Uluslararası Klinikler İşbirliği (Systemic Lupus International Collaborating Clinic)
SS	Sjögren Sendromu
SSc	Sistemik Skleroz
TCR	T hücre reseptörü (T Cell Receptor)
TG2	Transglutaminaz 2
Tfh	Foliküler yardımcı T lenfosit (Foliküler Helper TL)
TLR	Toll-benzeri reseptör (Toll-like Receptor)
TNF-α	Tümör Nekroz Faktör Alfa

Treg	Regulator T Hücreleri
Th1	T helper 1
Th2	T helper 2
Th17	T helper 17
US	United States
WB	Western Blot



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. ANA patern şeması (https://www.anapatterns.org/trees-full.php)	12
2.2. Homojen patern, HEp-2 hücresi ve primat karaciğeri	13
2.3. Yoğun ince benekli patern, HEp-2 hücresi ve primat karaciğeri	14
2.4. İnce benekli patern, SSA-SSB Benzeri Boyanma, HEp-2 hücresi ve primat karaciğeri	15
2.5. İnce benekli patern, Anti-Ku Benzeri Boyanma, HEp-2 hücresi ve primat karaciğeri	16
2.6. Kaba Benekli / Anti U1-nRNP Benzeri Boyanma, HEp-2 hücresi ve primat karaciğeri	16
2.7. Kaba Benekli / Anti Nükleer Matriks Proteini Benzeri Boyanma, HEp-2 hücresi ve primat karaciğeri	17
2.8. Sentromer paterni, HEp-2 hücresi ve primat karaciğeri	18
2.9. Az Nükleer Noktalanma, HEp-2 hücresi ve primat karaciğeri	19
2.10. Çoklu Nükleer Noktalanma, HEp-2 hücresi ve primat karaciğeri	19
2.11. Nükleolar patern, HEp-2 hücresi ve primat karaciğeri	20
2.12. Anti-Scl70 Benzeri Boyanma / Topo I, HEp-2 hücresi ve primat karaciğeri	21
2.13. Nükleer Membran Paterni (Periferal Boyanma), HEp-2 hücresi ve primat karaciğeri	22
2.14. Anti-PCNA Benzeri Boyanma, HEp-2 hücresi ve primat karaciğeri	22
2.15. Sitoplazmik Boyanma / Anti-Mitokondrial Antikor (AMA) Benzeri Boyanma, HEp-2 hücresi ve primat karaciğeri	23

2.16. Sitoplazmik Boyanma / Anti-Jo1 Benzeri Boyanma, HEp-2 hücresi ve primat karaciğeri	24
2.17. Sitoplazmik Boyanma / Anti-F-Aktin Benzeri Boyanma, HEp-2 hücresi ve primat karaciğeri	24
2.18. Sitoplazmik Boyanma / Anti-Vimentin Benzeri Boyanma, HEp-2 hücresi	25
2.19. Sitoplazmik Boyanma / Anti-Ribozomal P Proteini Benzeri Boyanma, HEp-2 hücresi	25
2.20. Çubuk ve halkalar, HEp-2 hücresi	26
2.21. DFS paterni tarama ve doğrulama algoritması	28
2.22. ANA HEp-2 IIF tanısal algoritması	28
2.23. Multiparametrik yöntemler a) ALBIA b) LIA / DIA c) IIF	35
4.1. CytoBead Dot görüntüsü (Ok işaretleri referans dotlara göre anti-DFS70 antikoru için sırasıyla pozitif ve negatif sonucu göstermektedir)	48

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
2.1. Pozitif ANA sonucunun tanı koydurucu etkisi ve görülme sıklığı	9
4.1. Çalışma grupları	46
4.2. IIF testi ile CytoBead HEp2 testinin karşılaştırması	47
4.3. LIA testi ile CytoBead Dot testinin karşılaştırması	47
4.4. LIA testi ile ELISA testinin karşılaştırması	49
4.5. IIF, LIA ve ELISA testleri ile CytoBead HEp-2 testinin karşılaştırması	49
4.6. IIF ve LIA testi ile CytoBead HEp-2 testinin karşılaştırması	50
4.7. ELISA testi ile CytoBead HEp-2 testinin karşılaştırması	50
4.8. ELISA testi ile CytoBead Dot testinin karşılaştırması	51
4.9. ELISA ve LIA testi ile CytoBead Dot testinin karşılaştırması	51
4.10. IIF testinde yoğun ince benekli ile birlikte bulunan paternlerin, CytoBead HEp2, LIA, CytoBead Dot ve ELISA testi sonuçları	52

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Anti nükleer antikor (ANA) sistemik otoimmün romatizmal hastalıklar (SARD) için tanı, takip ve prognozda yol göstericidir. Bu hastalıkların tanısında tarama testi olarak human epitelial cell 2 (HEp-2) hücrelerinin kullanıldığı ANA indirekt immüno Floresan (IIF) yöntemi altın standart olarak belirlenmiştir (1). Hücrenin hangi yapısına karşı antikor oluştuğu ise doğrulama testleri ile belirlenmektedir. Araştırmamızın konusunu oluşturan dense fine speckled (DFS) paterni ilk olarak 1994 yılında Ochs tarafından interstisyel sistitli hastalarda gösterilmiş, ardından bu antijene karşı oluşmuş anti-DFS70 antikorunun katarakt, atopik dermatit, Vogt-Harada sendromu, prostat kanseri ve otoimmün tiroidit gibi hastalıklardaki varlığı gösterilmiştir (2,3,4,5,6,7). Daha sonra bir grup sağlıklı insan üzerinde yapılan bir çalışmada, anti-DFS70 otoantikorunun sağlıklı popülasyonda SARD'a göre daha fazla görüldüğü sonucuna varılmıştır. Bu antikora sahip olmanın, SARD tanısından uzaklaştırdığı ve gereksiz ek tetkik yapılmasını önleyeceği için daha maliyet-etkin bir yaklaşım sunabileceği düşünülmüştür (8). Ayrıca anti-DFS antikorlarının SARD durumunda genellikle diğer antikorlarla birlikte olmasına karşın, sağlıklı bireylerde monospesifik olarak bulunduğu; böylelikle SARD'ı dışlamak için kullanılabileceği fikri yaygınlık kazanmaya başlamıştır (9,10,11).

ANA negatifliği otoimmün hastalık riskini dışlamaz; aynı şekilde pozitifliği de spesifik bir tanı koydurmaz. Pozitif ANA sonucu, şüphelenilen klinik duruma göre genellikle ileri tetkik yapılmasını gerektirir (12). DFS paterni için ileri tetkik olarak Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Western Blot (WB), immünoadsorbsiyon IIF, immünopresipitasyon gibi monoparametrik yöntemler veya Line Immunoassay (LIA), Addressable Laser Bead Assay (ALBIA), Chemiluminesant Immunoassay (CIA), microarray veya multipleks IIF gibi multiparametrik yöntemler uygulanabilir. Biz de bu çalışmamızda bugün rutin laboratuvarlarda IIF ile tarama sonrası en çok tercih edilen doğrulama yöntemi olan LIA ile, bu iki basamaklı refleks test stratejisini tek basamakta uygulama olanağı sağlayan CytoBead ANA DFS70 adlı yeni yöntemi karşılaştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İmmün Sistem

İmmün sistem organizmayı kendine yabancı her türlü antijenden korumaya yönelik karmaşık bir mekanizmalar bütünüdür. Yabancı antijene karşı geliştirilen yanıt immün yanıt olarak adlandırılmaktadır. Dolayısıyla öz (self) antijen ile yabancı antijeni ayırt edebilmek büyük önem taşımaktadır. Bunun için birbiri içine geçmiş ve birbirini tetikleyen iki mekanizma aktif rol oynamaktadır: Doğal ve edinsel immünite.

2.1.1. Doğal İmmünite

Doğal immün yanıt dakikalar içerisinde devreye giren, antijene özgüllüğü olmayan, uzun süreli kalıcı bir hafıza oluşturmeyen fakat özgül savunma sistemleri oluşturuluncaya kadar organizmaya zaman kazandıran hayati öneme sahip öncül savunma sistemidir. Bu sistem içerisinde deri, mukozal membranlar, fagositoz yapan hücreler, doğal öldürücü hücreler (Natural killer-NK hücreleri), Toll-benzeri reseptörler (Toll-like receptors-TLR), sitokinler, kompleman komponentleri ve lizozim girmektedir.

2.1.2. Edinsel İmmünite

Eğer yabancı antijen doğal immün yanıt bariyerini aşabilirse karşısına daha özgün ve kompleks cevaplar oluşturabilen ve hafıza özelliği taşıyan edinsel (kazanılmış, adaptif) immünite çıkacaktır. Edinsel immünite T lenfosit aracılı hücresel yanıt ve B lenfosit aracılı humoral yanıt mekanizmalarına sahiptir.

T ve B lenfositler primer lenfoid organ olan kemik iliğinde üretilip, olgunlaşmaları sırasıyla timus ve kemik iliğinde gerçekleşmektedir. Öncül T hücreleri kemik iliğinden çıktıklarında TCR (T-cell reseptör, T hücre reseptörü), CD3 (cluster of differentiation 3), CD4, CD8 bulundurmazlar. Timustan geçiş sırasında bunların hepsini ifade etmeye başlarlar. CD4 + ve CD8 + T lenfosit çift pozitif olarak

adlandırılır. Çift pozitif hücreler sınıf I MHC'ye sahip hücrelerle karşılaşrsa CD8+, sınıf II MHC'ye sahip bir hücreyle karşılaşrsa CD4+ T lenfositler farklılaşır. Bu olay timus korteksinde meydana gelmekte olup, tek pozitif T lenfositler (CD4⁺ veya CD8⁺) timus medullasından dolaşıma çıkar.

2.2. İmmünolojik Tolerans

2.2.1. Santral Tolerans

Dolaşıma salınmadan önce T lenfositler timusta çok önemli bir seçilime uğrar. Konağın öz antijenlerine karşı immün yanıt oluşturmaması gerekir. Buna tolerans adı verilmektedir. T lenfositler için timusta, B lenfositler için kemik iliğinde toleransın gelişmesi santral tolerans olarak adlandırılır. Timusta antijen sunan hücrelerden dendritik hücreler konağın öz antijenlerini olgunlaşmamış T lenfositlere sunar. Eğer T lenfosit çok düşük kuvvette yanıt verirse veya yanıt oluşturmazsa olgunlaşmasını tamamlayamaz, perifere çıkamaz ve öldürülür. Eğer öz antijene karşı çok kuvvetli bir yanıt oluştursa (otoreaktivite) apoptozla negatif seleksiyona uğrar. Buna klonal delesyon da denilmektedir. Eğer öz antijene uygun yanıt oluşturabilirse timusta olgunlaşıp perifere çıkar. Buna da pozitif seleksiyon denir. Aynı şekilde kemik iliğinde B lenfositlere sunulan öz antijene verilen kuvvetli yanıt da klonal delesyona neden olur (negatif seleksiyon). Uygun yanıt oluşturabilen B lenfositler ise dolaşıma salınırlar. Kemik iliğinde B lenfositlerin konağın öz antijenlerine bağlanması durumunda, Ig (immünoglobulin) genlerinin yeniden düzenlenimi ile otoreaktif olmayan yeni reseptörler oluşur (13). Bu duruma reseptör yeniden düzenlenmesi (receptor editing) adı verilir.

Timusta konağın öz antijenine karşı yanıt oluşturan olgunlaşmamış T lenfositlerin bir kısmı regülatuar T hücrelerine (Treg) dönüşürler. Dolaşımdaki T lenfositlerin yaklaşık %5-10'unu oluşturan, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ olan bu hücreler Th1, Th2 ve Th17 hücrelerinden sitokin salınmasını önleyerek etki etmektedir. Treg hücrelerinin silinme veya enerjiden kaçan otoreaktif T hücrelerinin baskılanmasında rolü vardır. FoxP3'ü kodlayan gende mutasyon sonucu Treg

fonksiyon kaybında ciddi otoimmün/inflamatuar durumlar meydana gelebilmektedir (14).

2.2.2. Periferik Tolerans

Santral toleranstan kaçmayı başarabilmiş T/B lenfositler periferik dokularda periferik tolerans denen seçilime uğramak durumundadır. Çünkü primer lenfoid organlarda vücuttaki tüm öz antijenlerle karşılaşma olanakları yoktur. Periferik tolerans mekanizmaları şunlardır:

T lenfositlerin periferik toleransı

Klonal Anerji

Öz antijene reaktif T lenfositlerin, antijen sunan hücrelerle etkileşimi sırasında ko-stimülatör reseptör eksikliği veya ko-inhibitör uyarım sonucu anerji (yanıtsızlık) oluşurması. Örneğin T lenfositte CD28'e karşılık antijen sunan hücre (ASH) B7-1 (CD80) veya B7-2 (CD86) bağlanması gerçekleşmezse anerji meydana gelecektir. CD28 üzerinden T lenfosit aktivasyonunda IL-2 üretimi meydana gelirken, CD28 yerine CTLA-4 molekülünün B7'ye bağlanması sonucu IL-2 üretilmeyecek ve anerji ile sonuçlanacaktır (15).

Klonal Görmezlik

Göz, beyin, testis gibi immünolojik olarak korunan bölgelerdeki antijenlere karşı aktive olabilecek T lenfositler, bu bölgelere cerrahi-travma vb. olmadığı müddetçe uyarılamayacak ve bir süre sonra öleceklerdir (13).

Düzenleyici (Regulatory) T Hücreleri (Treg) Aracılığı ile İmmün Baskılanma

Timusta olgunlaşmamış otoreaktif T hücrelerinden farklılaşmış olan CD4, CD25+ ve transkripsiyon faktör FoxP3+ bu hücreler IL-10, TGF- β gibi inhibitör sitokinler salgılayarak, doğrudan hücre teması ile veya dentritik hücre fonksiyonlarını inhibe ederek efektör T lenfositleri baskırlar (13,15).

Silinme (Aktivasyona Bağlı Hücre Ölümü)

T lenfositlerin öz antijenlerle tekrarlayan karşılaşmaları veya ikincil sinyal yokluğunda öz antijene verilen tepki sonucu, yine kendi yüzeyinde eksprese ettiği Fas (CD95) - FasL (CD95 Ligand) kaskadını aktive ederek apoptoza gitmeleridir. Fas-FasL'ı kodlayan genlerde bir mutasyon durumunda nadir görülen otoimmün lenfoproliferatif hastalık meydana gelebilir (16,17).

B Lenfositlerin Periferik Toleransı

B lenfositler, sekonder lenfoid organların primer foliküllerine göç edip yüksek afiniteli antikorlar oluşturmak için germinal merkezleri oluştururlar. Germinal merkezlerde B lenfositten başka, Tfh (foliküler helper T lenfosit) ve foliküler dentritik hücreler bulunmaktadır.

B lenfositler, foliküler dentritik hücrelerin sunduğu antijene bağlanmak için yarışrlar. B lenfositler yüksek afiniteli BCR'leri ile bağladıkları bu antijenleri sınıf II major histocompatibility complex (MHC) proteinleri ile Tfh hücresine sunar (18). Bu olay T lenfositlerden sağ kalım sinyalleri alabilmek için çok önemlidir. B ve T lenfosit arasındaki CD40 - CD40L etkileşimi ikincil aktivasyon sinyali oluşturur. Eğer B lenfosit uygun sinyalleri alabilmişse izotip değişimine uğrayıp, ilk yanıt olarak ürettiği IgM (immünglobulin M) sonrasında, diğer sınıf Ig'leri de sentezleyebilir hale gelebilir. Ayrıca B lenfosit yüzey Ig molekülünde nokta mutasyonlar oluşarak (somatik hipermutasyon) antijene daha yüksek afinite ile bağlanma sağlanır. Bu olay sonucu afinite olgunlaşması meydana gelir. Sonuçta uygun sinyalleri alan B lenfositler germinal merkezden ayrılıp olgunlaşır, plazma hücresine, hatta hafıza hücresine dönüşebilir. Bu sinyalleri alamayanlar ise apoptoza gider.

2.3. Otoimmünite Mekanizmaları

Konağın bu mekanizmalarla sağlanmaya çalışılan öz antijene tolerans hali oluşturulamazsa immün sistem bireyin kendi hücre ve dokularına saldırabilir. Bu durum otoimmünite olarak adlandırılır ve oluşan hastalıklara da otoimmün hastalıklar denir. Patogeneizde çeşitli faktörler suçlanmaktadır:

2.3.1. Genetik Yatkınlık:

Hayvan çalışmaları ve ikizler üzerinde yapılan çalışmalar otoimmünite patogenezinde genetik faktörlerin etkili olduğunu göstermiştir. Birçok gen araştırılmış ve en çok da MHC proteinlerini kodlayan HLA (human leukocyte antigen) alelleri üzerinde durulmuştur. Çünkü MHC I veya II aracılığı ile T lenfositlerine peptid yapıda antijen sunumu gerçekleştirilmektedir. Belli HLA allellerini taşıyan kişilerde otoimmün hastalık sıklığının artmış olduğu gözlenmiştir. Örneğin HLA B27 taşıyan kişilerde ankilozan spondilit gelişme riski taşımayanlara göre 90 kat, HLA DR B1 *0301*0401 allelleri bulunan kişilerde tip 1 DM gelişme riski 35 kat daha fazladır (16).

HLA ilişkili olmayan genler de otoimmünite ile ilişkilendirilmiştir. Tirozin fosfataz PTPN22 polimorfizminin sistemik lupus eritematozus (SLE), romatoid artrit (RA), tip 1 diabetes mellitus (DM) ile, sitoplazmik mikrobiyal algılayıcı NOD2 polimorfizminin bazı etnik gruplarda Crohn hastalığı ile birlikteliği gösterilmiştir (16).

IL-23, pro-inflamatuar Th17 yolağını aktive eden bir sitokin olup IL-23 reseptöründe (IL-23R) genetik polimorfizm durumunun ankilozan spondilit, Behçet hastalığı, Crohn hastalığı, psöriazis, ülseratif kolite neden olabileceği gösterilmiştir (19,20).

2.3.2.Çevresel Etkiler

Özellikle enfeksiyon etkenleri otoimmünite etyopatogenezinde çokça suçlanan faktörlerden olmuştur. Örneğin multiple skleroz (MS) hastalarının post-

mortem beyin dokularında Epstein Barr virüs (EBV) varlığı gösterilmiştir (21). Ayrıca bazı sistemik enfeksiyonların MS ataklarını tetiklediğini gösteren yayınlar vardır (22). Enfeksiyonlar dışında çevresel etmenlerden ultraviyole ışınım, apoptotik hücre ölümünü indükleyerek kutanöz lupusa neden olabilir (23).

D vitamini eksikliği ile otoimmün hastalıklar arasında özellikle de SLE ile ilişki kuran çalışmalar vardır (24). Altın tuzları, sülfasalazin, intravenöz immünoglobulin (IVIG), prokainamid ve tümör nekroz faktör – alfa (TNF- α) blokörleri, ANA oluşumunu indükleyebilirler (25).

2.3.3.Moleküler Taklit

Otoimmünite gelişim mekanizmalarından biri olarak kabul edilen moleküler taklitte bilinen en iyi örnek streptokok enfeksiyonu sonrası oluşan antikorların, moleküler benzerlik nedeniyle konağın kalp kasına saldırması sonucu oluşan akut romatizmal ateştir (ARA) (16).

2.4. Otoimmünite ve Mikrobiyota

Çocuklarda yapılan mikrobiyota çalışmalarında otoimmün hastalığın başlangıç ve alevlenme dönemlerinde mikrobiyal çeşitliliğin azaldığı, remisyonda ise kontrol gruplarından farklı olmadığı görülmüştür (26). Bağırsak flora elemanlarından Clostridia'lar diyetdeki lifleri fermente ederek önemli anti-enflamatuar fonksiyonlar sergileyen ve Treg gelişimini uyaran bütirat gibi kısa zincirli yağ asitlerini üretir (27). *Bacteroides fragilis* ise kapsüler polisakkarit A (PSA) üreterek IL-10 gibi anti-inflamatuar sitokinler üreten Treg hücrelerinin indüklenmesi yoluyla immün koruma sağlar (28,29).

2.5. Otoimmünite ve Hijyen Hipotezi

Gelişmiş ülkelerde enfeksiyöz ve paraziter hastalıklar son 40 yılda azaldıkça, buna paralel olarak artan otoimmün / atopik hastalıklar bu hipotezin çıkış noktasını oluşturmuştur (30). Örneğin enfeksiyon etkenleriyle sıkça karşılaşıl

kreş ve gündüz bakımevlerine gönderilen çocuklarda astım sıklığının, evde bakım alan çocuklara göre daha düşük çıkması bu tezi desteklemektedir (31). Hipotezin olası mekanizmalarından biri antijenik yarışma olup; kuvvetli bir antijenle birlikte veya hemen ardından verilen ikinci bir antijen varlığında, ilk antijene karşı azalmış immün yanıt oluşturulmasıdır (32,33).

2.6 Anti Nükleer Antikorlar (ANA)

Anti nükleer antikorlar, isimlendirmesi nükleusa karşı oluşmuş antikorları anımsatsa da aslında hem nükleusta hem de sitoplazmadaki çeşitli yapılara karşı oluşmuş ve genellikle immünoglobulin G (IgG) yapısında antikorlardır (34). Bu yapılar deoksiribonükleik asit (DNA), ribonükleik asit (RNA), histon, ribonükleoproteinler, çözünebilir hücresel reseptörler, nükleolar yapı ve mitoz ile ilişkili proteinler olabilir. 1948 yılında ilk olarak SLE hastalarında lupus eritematozus “LE” hücreleri tanımlandıktan sonra 1954’te ANA terimi ortaya çıkmış ve birkaç yıl içerisinde de indirekt immünofloresan (IIF) yöntemi kullanılmaya başlanmıştır (35,36).

ANA’nın önemi sistemik otoimmün romatizmal hastalıklardaki (SARD) tanı, takip ve prognozda yol gösterici olmasından kaynaklanmaktadır. ANA’nın tanı koymadaki rolü hastalıklara göre değişkenlik göstermektedir (Tablo 2.1). Örneğin SLE, sistemik skleroz, primer biliyer siroz gibi hastalıklarda ANA tanı koymada çok yararlı iken; ilaca bağlı lupus, miks bağ doku hastalığı (MCTD) ve otoimmün hepatitte kritik tanı kriterleri arasında yer alır. Sjögren sendromu ve polimiyozit/dermatomiyozitte (PM / DM) tanıda daha az yararlıdır. Raynaud fenomeni ve juvenil kronik oligoartiküler artrit izlem ve prognozu belirlemede önem kazanır. Fakat RA, MS, otoimmün tiroid hastalıkları, idiopatik trombositik purpura (İTP), fibromiyalji gibi durumlarda ANA’nın önemi yok veya henüz kanıtlanamamıştır (36).

Tablo 2.1. Pozitif ANA sonucunun tanı koydurucu etkisi ve görülme sıklığı (36)

ANA tanıda çok yararlı	ANA pozitiflik (%)
Sistemik lupus eritematozus	90-95
Sistemik Skleroz	85-95
Primer Biliyer Siroz	50-80
ANA tanıda belli ölçüde yararlı	
Polimiyozit / Dermatomyozit	30-70
Sjögren sendromu	50-70
ANA kritik tanı kriterleri arasında	
İlaça bağlı lupus	70-90
Miks bağ dokusu hastalığı	90-100
Otoimmün hepatit	40-80
ANA hastalık izlemi ve prognozda çok yararlı	
Juvenil kronik artrit	50-60
Raynaud fenomeni	20-40
ANA'nın hastalık tanısı, izlemi veya prognozda rolü yok veya henüz kanıtlanmamış	
Romatoid artrit	15-30
Multiple skleroz	20-30
Otoimmün tiroid hastalıkları	10-20
Enfeksiyon hastalıkları	20-40
İdiopatik trombositopenik purpura	10-30
Fibromiyalji	20-30
Kanser ve paraneoplastik sendromlar	20-50
Sağlıklı bireyler	
1/40	20-30
1/80	10
1/160	5
1/320	2

2.6.1 Ekstrakte Edilebilir Nükleer Antijenler (ENA)

SS-A, SS-B, Scl-70, Sm, nRNP, Jo-1 hücre kültürlerinden serum fizyolojik ile ekstrakte edilebildiklerinden bu ismi almışlardır. ANA tarama testi sonrası hangi ENA'ya karşı antikor geliştiğini bulabilmek için enzim bağlı immünosorbent assay (ELISA), immünoblot (IB), direkt floresan antikor (DFA) gibi daha özgül testlere ihtiyaç vardır. Günümüzde ENA olarak tanımlanan bu altı antijen haricinde Ro-52, PM-Scl, CENP-B, PCNA, dsDNA, Nükleozom, Histon, Ribozomal-P proteini,

AMA-M2 gibi nükleusta bulunabilen diğer antijenlere karşı antikor varlığı da araştırılmaktadır.

2.7. Sistemik Otoimmün Romatizmal Hastalıklarda ANA ve ENA

2.7.1. SLE

Kliniğinin ortaya çıkış şekli ve prognozu açısından oldukça farklılık gözlenen multisistemik tutulumla karakterize sistemik otoimmün romatizmal bir hastalıktır. Klinik ve immünolojik parametreleri içeren tanı kriterlerine sahiptir (37,38). İmmünolojik kriterlerden biri ANA pozitifliğidir. ANA IIF testinde 1/160 ve üzeri değerler anlamlı kabul edilmiştir. Hastaların %96-100'ünde ANA pozitifliği saptanmaktadır (39,40,41). Ardından hangi antijenlere karşı otoantikor olduğu ilave testlerle saptanmalıdır. Bu antikorlardan biri anti-dsDNA antikorudur. Hem American College of Rheumatology (ACR), hem de The Systemic Lupus Erythematosus International Collaborating Clinics (SLICC) tanı kriterleri arasında yer alır. Çeşitli testlerle varlığı saptanabilir; Farr radioimmunoassay, CIA, ELISA, *Crithidia luciliae* Immunofloresan Test (CLIFT) gibi. Antikor seviyesi hastalığın aktivitesi ile ilişkilidir (42). Bir başka immünolojik tanı kriteri anti-Sm antikor varlığıdır. Hücre çekirdeğinde RNA'ya bağlı halde bulunur. Anti-dsDNA ve anti-Sm özellikle böbrek tutulumunda saptanmaktadır (43,44). Anti-nükleozom, anti-histon, anti-Ro, anti-La, anti-RNP SLE hastalarında saptanabilecek diğer otoantikorlardandır (45).

2.7.2. Sjögren Sendromu

Özellikle kadınları etkileyen, sikka sendromu ile karakterize, ciddi formlarında çeşitli organ tutulumlarının olduğu sistemik otoimmün romatizmal bir hastalıktır. Primer ve diğer ANA ilişkili Otoimmün Romatizmal Hastalık (AARD) ile birlikte görülen sekonder Sjögren sendromu olmak üzere iki tipi vardır. ANA bu hastalarda %41.9-64 oranında pozitifdir (46,47,48,49). Primer Sjögren sendromunda 2012 ACR'nin sınıflama kriterleri arasında pozitif anti-SS/A ve/veya

anti-SS/B antikorları veya pozitif romatoid faktör (RF) ve $\geq 1/320$ ANA pozitifliği bulunmaktadır (50).

2.7.3. Sistemik Skleroz

Fibrozis ve vaskülopati ile seyreden otoimmün romatizmal bir hastalıktır. Bu hastalarda ANA varlığı %95 oranında saptanmaktadır (51,52,53). ACR ve The European League Against Rheumatism (EULAR) tarafından 2013'te ANA-spesifik antikorlardan anti-topoizomeraz-1 (anti-Scl-70), anti-sentromer (ACA) ve anti-RNA polimeraz 3 (anti-RNAP III) tanı kriterleri arasına alınmıştır (54). Anti-DNA Topoizomeraz I antikorlarının sistemik skleroz için özgüllüğü %90'dır (55). Anti-Scl70 diffüz sistemik skleroz ile ilişkili olup artmış pulmoner fibrozis riski ile birlikte (56,57). ANA HEp-2'deki görünümü homojen + nükleolardır. Kromatidleri birbirine bağlayan sentromer proteinine karşı oluşmuş antikorların sınırlı sistemik skleroz için özgüllüğü %93 olup pulmoner arteriyel hipertansiyon gelişimi için bir risk faktörüdür (55). Bunların haricinde sistemik sklerozda anti-Th/To, antipolimiyozit (PM)/skleroderma (Scl), anti-Ku, anti-U1-RNP, anti-U3-RNP ve anti-NOR90 antikorları da saptanabilir (45).

2.7.4. Polimiyozit

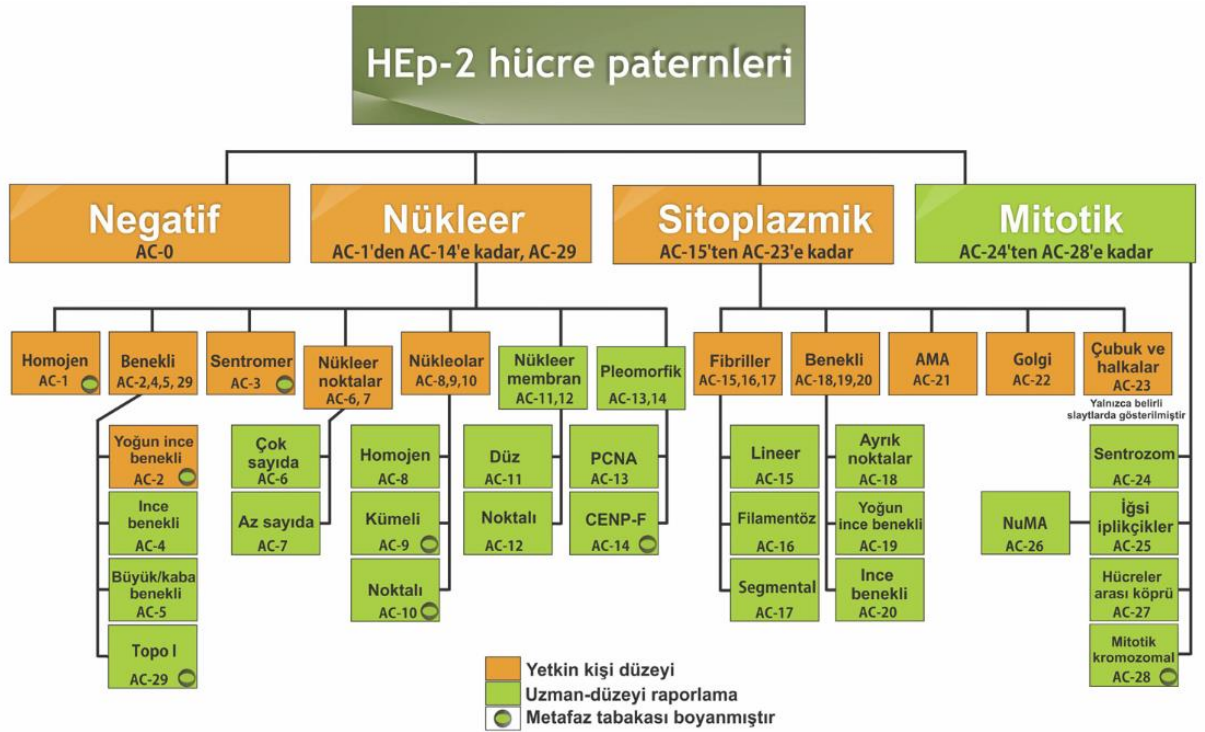
Çizgili kas tutulumuyla giden, çeşitli organları etkileyebilen, interstisyel akciğer hastalığı, artrit, overlap sendromu yapabilen oldukça heterojen bir hastalık grubudur (45). Anti-Jo-1 (histidil tRNA sentetaz), anti-SRP (signal recognition particle) ve anti-Mi-2 (helikaz) miyozite özgü olan antikorlardır (36). Bu hastaların yaklaşık %30'unda Raynaud fenomeni, ellerde döküntü, artrit ve interstisyel akciğer hastalığı ile birlikte giden anti-sentetaz sendromu gelişir ve bu hastalarda anti-Jo-1 antikorları tanısaldır (36).

2.7.5. Miks Bağ Doku Hastalığı

İlk olarak 1972'de tanımlanan, SLE, sistemik skleroz, polimiyozit ile ilgili klinik bulguların birlikte görülebildiği (overlap sendromu), anti-U1-RNP (anti-U1

ribonükleoprotein) antikorlarıyla birliktelik gösteren sistemik otoimmün romatizmal bir hastalıktır (58,59). Bu hastalarda genellikle yüksek titrede (>1/1000) granüler paternde ANA pozitifliği ve U1-RNP'nin yanı sıra Sm, Ro, La, dsDNA gibi antijenlere karşı antikorlar görülebilmektedir (60). ANA pozitifliği tanı kriterleri arasındadır (36).

2.8. ANA IIF Testinde Boyanma Paternleri



Şekil 2.1. ANA patern şeması (<https://www.anapatterns.org/trees-full.php>) (61)

International Consensus on Antinuclear Antibody Pattern (ICAP) tarafından adlandırma açısından standardizasyon getirilmiş ve “anti-cell” kelime grubunun baş harfleri alınarak (AC) sırasıyla numaralar verilmiştir. AC-0 negatif olmak üzere AC-01 ile AC-29 arasında numaralandırılmıştır. Bu sınıflamaya göre başlıca 3 ana grupta boyanma paterni olup AC01 ile AC-14 arası ve AC-29 nükleer paternleri;

AC-15 ile AC-23 arası sitoplazmik paternleri; AC-24 ile AC-28 arası mitotik paternleri temsil etmektedir. Sık görülen paternlerden bazıları şöyledir:

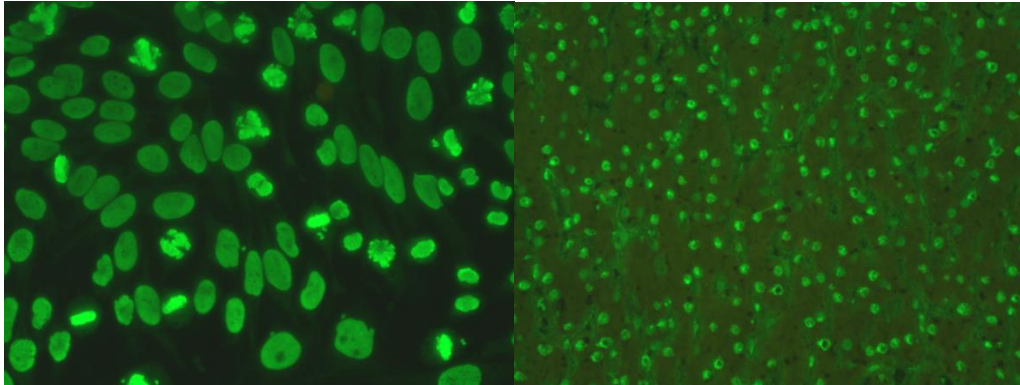
2.8.1. Homojen boyanma (AC-01)

dsDNA, ssDNA, nükleozom, histon antijenlerine karşı antikor varlığında HEp-2 hücre nükleusunda gözlenen boyanma paternidir. İnterfaz evresinde nükleus, metafaz evresinde merkezde toplanmış kromatin uniform tarzda floresan boyayı tutmuştur. Maymun karaciğer hücrelerinin nükleusunda benzer bir boyanma şekli ile konfirme edilebilir. SLE, ilaca bağlı lupus, RA, juvenil kronik artrit, sistemik skleroz, antifosfolipit sendromunda bu patern görülebilir (36).

HEp-2 İnterfaz: pozitif

HEp-2 metafaz: pozitif

Maymun karaciğeri: pozitif



Şekil 2.2. Homojen patern, HEp-2 hücresi ve primat karaciğeri

2.8.2. Yoğun ince benekli patern (DFS70 Benzeri Boyanma / Anti-LEDGF Benzeri Boyanma) (AC-02)

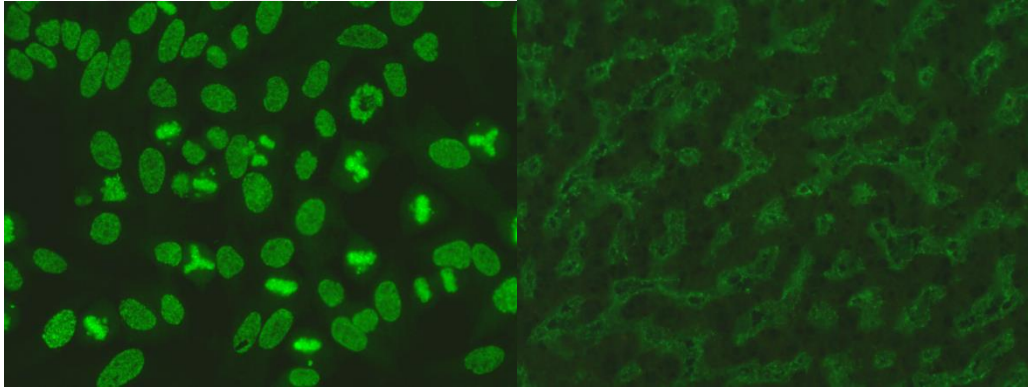
DFS70 / LEDGF (dense fine speckled / lens epithelium-derived growth factor) / DNA bağlayan transkripsiyon koaktivatör p75 proteinine karşı oluşmuş

antikorlar varlığında HEp-2 hücre nükleusunda gözlenen farklı floresan şiddeti veren çok ince beneklerden oluşmuş boyanma paternine ek olarak bölünme aşamasındaki hücrelerin metafaz kromatininde de benzer floresan tutulum gözlenmektedir. Genellikle metafaz floresansı, interfaz çekirdeklerindeki floresanstan daha yoğundur (36). Nukleoluslarda boyanma beklenmez. Maymun karaciğerine ait çekirdek yapıları ise ya çok silik floresan tutmuş ya da hiç boyanmamıştır. Sağlıklı bireylerde, AARD hastalarına göre daha yüksek sıklıkta görüldüğüne dair çalışmalar mevcuttur (8,9,10,62,63). Bunun yanında interstisyel sistit, katarakt, atopik dermatit, prostat kanseri gibi geniş bir hastalık grubunda da bulunduğu dair yayınlar mevcuttur (2,3,4,6).

HEp-2 İnterfaz: pozitif

HEp-2 metafaz: pozitif

Maymun karaciğeri: zayıf pozitif / negatif



Şekil 2.3. Yoğun ince benekli patern, HEp-2 hücresi ve primat karaciğeri

2.8.3. İnce Benekli (Granüler) Patern (AC-04)

İnce Benekli (Granüler) Patern / SSA-SSB Benzeri Boyanma

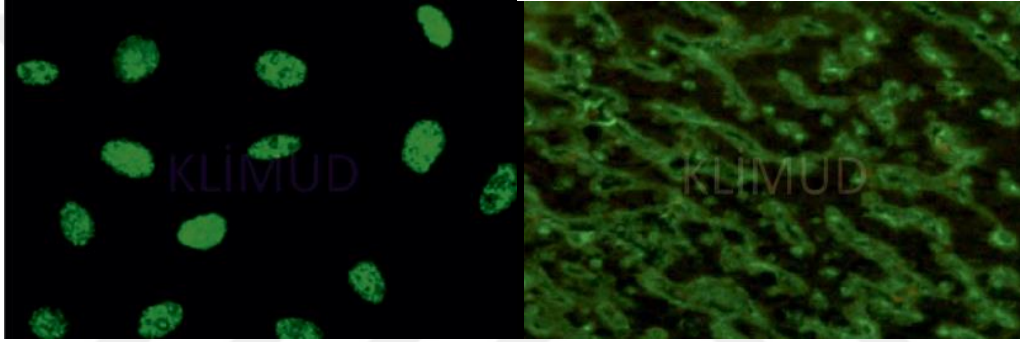
SSA, SSB antijenlerine karşı oluşmuş antikorlar varlığında HEp-2 hücre nükleusunda küçük noktalar şeklinde floresan ışımaya görülmesidir. Metafaz nükleusları boyanmaz. Nükleoluslar genellikle boyanmaz fakat bazı SSA tipi

boyanmalarda nükleoluslar da boyanabilir. Maymun karaciğeri görüntüsü, küçük benekli görüntüsüyle konfirme ettiricidir. Sjögren sendromu, SLE, subakut kutanöz lupus eritematozus, miyozit ve mikst bağ dokusu hastalıklarında bu patern görülebilir (36).

HEp-2 İnterfaz: pozitif

HEp-2 metafaz: negatif

Maymun karaciğeri: pozitif



Şekil 2.4. İnce benekli patern, SSA-SSB Benzeri Boyanma, HEp-2 hücresi ve primat karaciğeri (36)

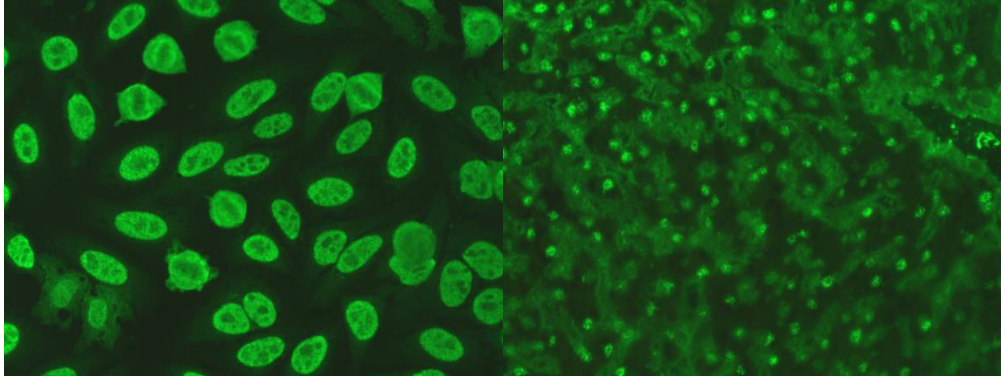
İnce Benekli (Granüler) Patern / Anti-Ku Benzeri Boyanma

Ku (ku-70, ku-80) antijenine karşı oluşmuş antikorlar varlığında HEp-2 hücre nükleusunda küçük nokta şeklinde floresan ışıma görülmesidir. Metafaz nükleusları boyanmaz. Nükleolusta boyanma beklenmez. Maymun karaciğer çekirdeklerinde tipik ‘patlamış mısır’ görünümü vardır. Overlap sendromu, progresif sistemik skleroz, miyozitler, Sjögren sendromu ve SLE’de görülebilir (36).

HEp-2 İnterfaz: pozitif

HEp-2 metafaz: negatif

Maymun karaciğeri: pozitif



Şekil 2.5. İnce benekli patern, Anti-Ku Benzeri Boyanma, HEp-2 hücresi ve primat karaciğeri

2.8.4. Kaba Benekli (Granüler) (AC-05)

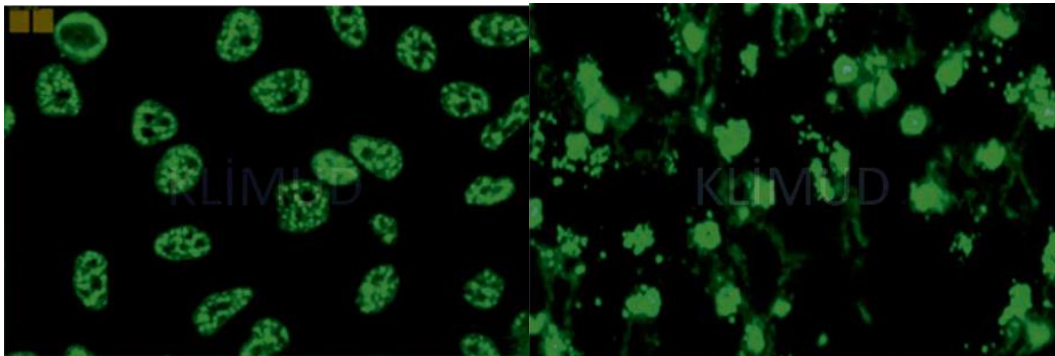
Kaba Benekli (Granüler) / Anti U1-nRNP Benzeri Boyanma

U1-nRNP, Sm antijenlerine karşı oluşmuş antikörler varlığında HEp-2 hücre nükleusunda büyük noktalar şeklinde floresan ışımaya görülmesidir. Metafaz nükleusları boyanmaz. Nükleoluslarda boyanma beklenmez. Maymun karaciğeri görüntüsü, büyük benekli görüntüsüyle konfirme ettiricidir. Miks bağ dokusu hastalığı, SLE, sistemik skleroz ve polimiyozitte görülebilir (36).

HEp-2 İnterfaz: pozitif

HEp-2 metafaz: negatif

Maymun karaciğeri: pozitif



Şekil 2.6. Kaba Benekli / Anti U1-nRNP Benzeri Boyanma, HEp-2 hücresi ve primat karaciğeri (36)

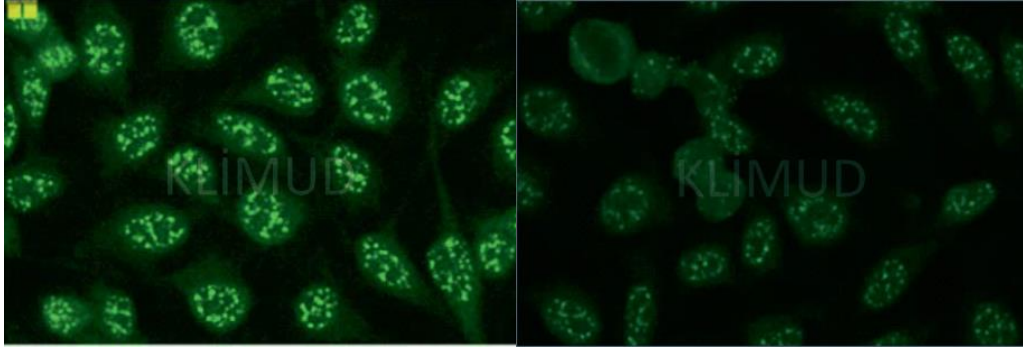
Kaba Benekli (Granüler) / Anti Nükleer Matriks Proteini Benzeri Boyanma

Nükleer matriks proteini-2'ye karşı antikor varlığında HEp-2 hücre nükleusunda özellikle nükleollerin çevresinde olmak üzere büyük granüllerden oluşmuş bir görünüm mevcuttur. Metafaz kromatini negatiftir ve nükleoller boyanmazlar. Maymun karaciğeri görüntüsü, büyük benekli görüntüsüyle konfirme ettiricidir. Dermatomiyozit hastalarında görülebilir (36).

HEp-2 İnterfaz: pozitif

HEp-2 metafaz: negatif

Maymun karaciğeri: pozitif



Şekil 2.7. Kaba Benekli / Anti Nükleer Matriks Proteini Benzeri Boyanma, HEp-2 hücresi ve primat karaciğeri (36)

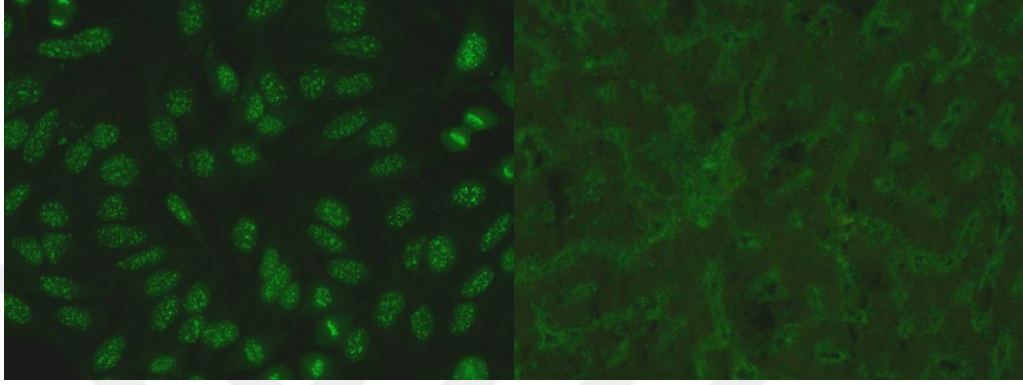
2.8.5. Sentromer Paterni (AC-03)

CENP-A, CENP-B, CENP-C ve CENP-D'ye karşı antikor varlığında HEp-2 hücre nükleusunda komozom sayısı kadar noktalanmanın varlığı ile karakterizedir. CENP-F'e karşı olan antikorlar bu boyanma paternini göstermezler. Yine metafaz plağında aynı noktalardan oluşan bir pozitiflik mevcuttur. Maymun karaciğeri görüntüsü, noktalı görüntüsüyle konfirme ettiricidir. CREST (kalsinozis, Raynaud fenomeni, özefagus dismotilitesi, sklerodaktili, talenjektazi) sendromu, sınırlı kutanöz sistemik skleroz, primer biliyer siroz, Raynaud fenomeninde pozitifdir (36).

HEp-2 İnterfaz: pozitif

HEp-2 metafaz: pozitif

Maymun karaciğeri: pozitif



Şekil 2.8. Sentromer paterni, HEp-2 hücresi ve primat karaciğeri

2.8.6. Nükleer Noktalanma (AC-06, 07)

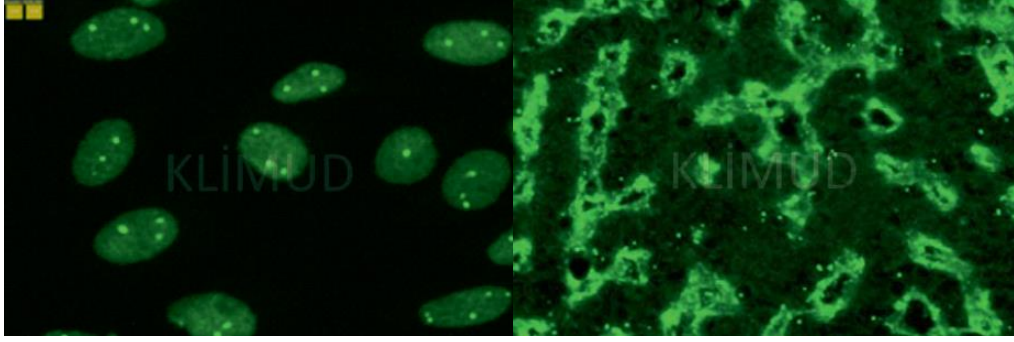
Nükleer Noktalanma / Az Nükleer Noktalanma (AC-07)

Cajal cisimciğine karşı antikor varlığında HEp-2 hücre nükleusunda 2-6 arası noktalanmanın varlığı ile karakterizedir. Maymun karaciğerinde benzer az sayıda noktalanma vardır. Metafaz plağı boyanmaz. Sağlıklı bireylerde, Sjögren sendromu, primer biliyer siroz, kronik aktif hepatitte görülür (36).

HEp-2 İnterfaz: pozitif

HEp-2 metafaz: negatif

Maymun karaciğeri: pozitif



Şekil 2.9. Az Nükleer Noktalanma, HEp-2 hücresi ve primat karaciğeri (36)

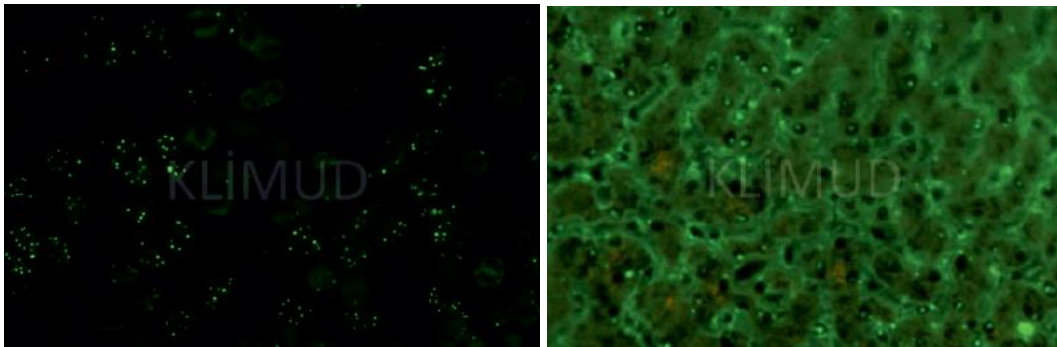
Nükleer Noktalanma / Çoklu Nükleer Noktalanma (AC-06)

Sp100 nükleer antijeni, promyelosit lökemia proteini, NDP53, MJ/NXP-2 antijenlerine karşı antikor varlığında HEp-2 hücre nükleusunda en az 6 ve üzeri noktalanmanın varlığı ile karakterizedir. Maymun karaciğerinde genellikle HEp-2 hücresinden daha şiddetli olmak üzere benzer sayıda noktalanma vardır. Metafaz plağı boyanmaz. Sjögren sendromu, primer biliyer siroz, SLE ve diğer kronik inflamatuvar bağ dokusu hastalıklarında görülür (36).

HEp-2 İnterfaz: pozitif

HEp-2 metafaz: negatif

Maymun karaciğeri: pozitif



Şekil 2.10. Çoklu Nükleer Noktalanma, HEp-2 hücresi ve primat karaciğeri (36)

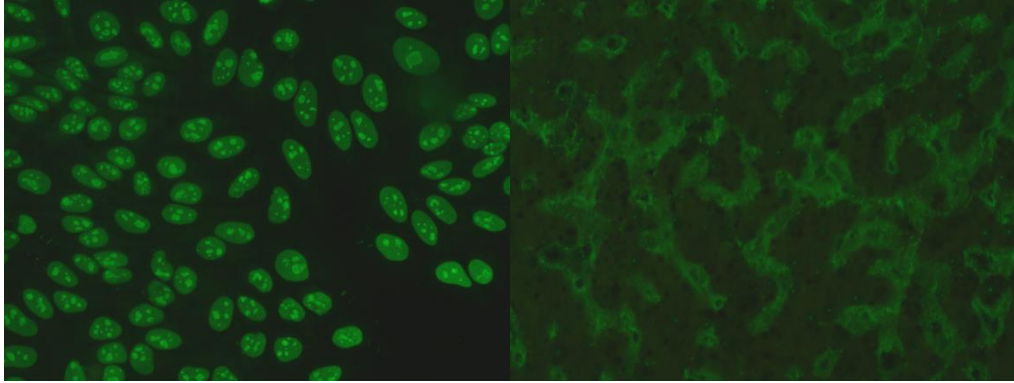
2.8.7. Nükleolar Patern (AC-08, 09, 10)

Pm-Scl 100, Pm-Scl 75, Th/To, Fibrillarin (U3-nRNP), RNA polimeraz I, Nor antijenlerine karşı antikor varlığında HEp-2 hücre nükleusunda özellikle nükleollerde floresan boyanma şeklinde görülür. Nükleusun genelinde zayıf homojen veya benekli görünüm olsa da dikkat çekmemektedir. Metafaz kromatini boyanmaz. Maymun karaciğer nükleuslarında ise homojene yakın bir patern gözlenir. Anti Pm-Scl antikoru sistemik skleroz, sınırlı form kutanöz sistemik skleroz, SLE, PM / DM, RA’te görülür. Anti-Fibrillarin antikoru sistemik skleroz; anti-RNA polimeraz I ve anti-NOR diffüz form kutanöz sistemik sklerozda görülebilir (36).

HEp-2 İnterfaz: pozitif

HEp-2 metafaz: negatif

Maymun karaciğeri: pozitif



Şekil 2.11. Nükleolar patern, HEp-2 hücresi ve primat karaciğeri

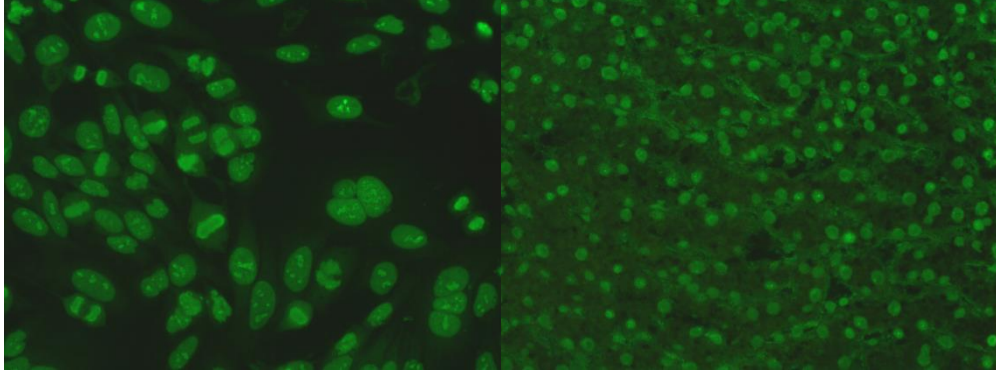
2.8.8. Anti-Scl70 Benzeri Boyanma / Topo I (AC-29)

DNA topoizomerez-I antijenine karşı antikor varlığında HEp-2 hücre nükleusunda homojen tutulum ile birlikte nükleollerde floresan boyanma şeklinde görülür. Metafaz kromatini pozitifdir. Maymun karaciğer nükleuslarında homojen / nükleolar patern gözlenir. Diffüz form progresif sistemik sklerozda görülür (36).

HEp-2 İnterfaz: pozitif

HEp-2 metafaz: pozitif

Maymun karaciğeri: pozitif



Şekil 2.12. Anti-Scl70 Benzeri Boyanma / Topo I, HEp-2 hücresi ve primat karaciğeri

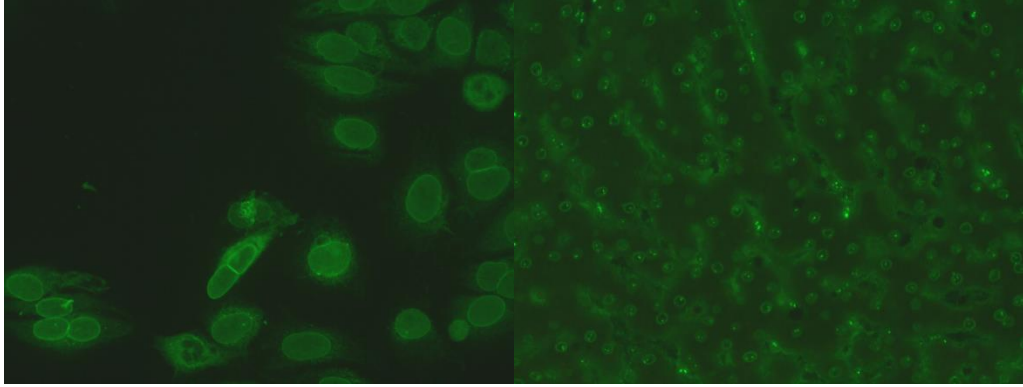
2.8.9. Nükleer Membran Paterni (Periferal Boyanma) (AC-11, 12)

Nükleer membran lamin-A, B1, B2, C, nükleer por kompleksi (gp210, p62), integral proteinler, LAP 1A, LAP 2 proteinleri, Lamin B reseptörüne karşı antikor varlığında HEp-2 nükleusunu çepeçevre saran floresansı tanımlar. Metafaz kromatini, nükleoller veya nükleus içi yapılarda boya tutulumu yoktur. Patern birden fazla nükleusun kesişim alanlarında belirginleşme eğilimindedir. Maymun karaciğer dokusunda da ‘yüzük’ gibi nükleus çevresi boyanma görülür. SLE, primer biliyer siroz, kronik aktif hepatit, vaskülit ve trombositopenide görülebilir (36).

HEp-2 İnterfaz: pozitif

HEp-2 metafaz: negatif

Maymun karaciğeri: pozitif



Şekil 2.13. Nükleer Membran Paterni (Periferal Boyanma), HEp-2 hücresi ve primat karaciğeri

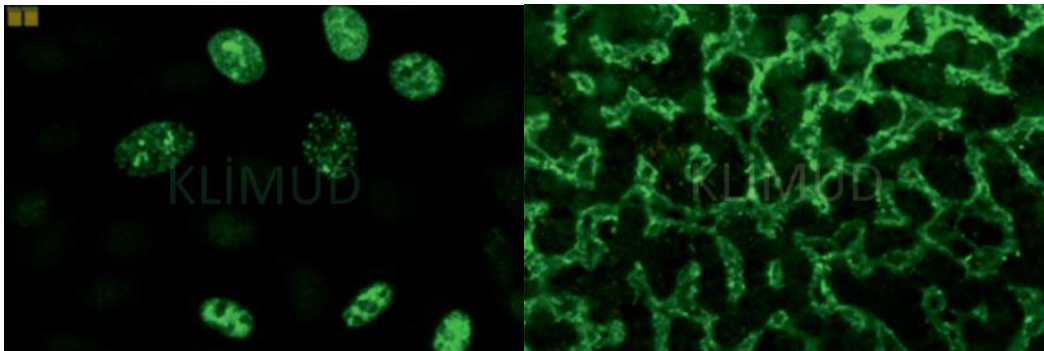
2.8.10. Anti-PCNA Benzeri Boyanma (AC-13)

DNA polimeraz δ destek proteinine karşı antikor varlığında bazı HEp-2 nükleuslarının homojen / benekli tarzda boyandığı; diğer nükleuslarda boyanma olmayan bir paterni tanımlar. Yaklaşık %30-60 nükleus floresan boyayı tutar. Metafaz kromatini negatiftir ve maymun karaciğer dokusunda genellikle boyanma beklenmez. SLE, kronik HBV veya HCV’de görülür (36).

HEp-2 İnterfaz: pozitif

HEp-2 metafaz: negatif

Maymun karaciğeri: negatif

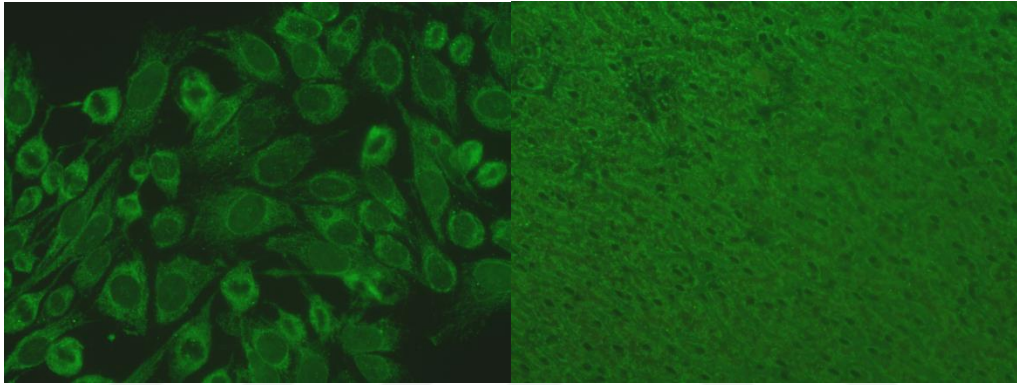


Şekil 2.14. Anti-PCNA Benzeri Boyanma, HEp-2 hücresi ve primat karaciğeri (36)

2.8.11. Sitoplazmik Boyanma (AC-15 / 23)

Sitoplazmik Boyanma / Anti-Mitokondrial Antikor (AMA) Benzeri Boyanma (AC-21)

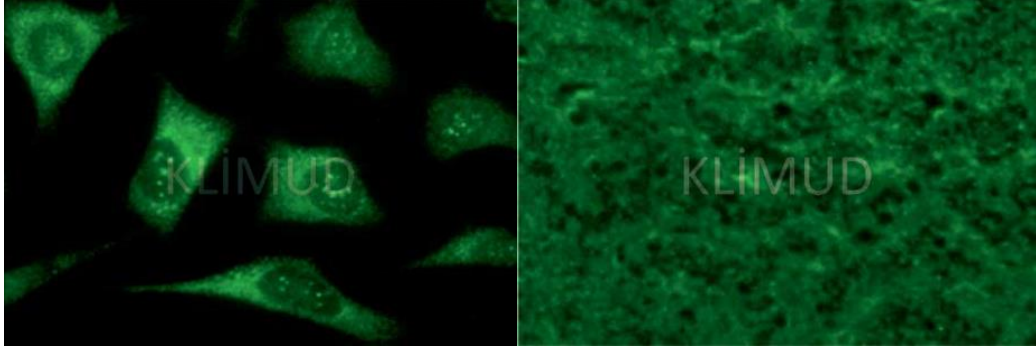
M2,M3, M5, M6 ve M9 antijenlerine karşı antikor varlığında HEp-2 hücre sitoplazmasında düzensiz-kaba çizgilenmeler şeklinde floresan boyanmayı ifade eder. HEp-2 nükleusunda tutulum yoktur. Maymun karaciğer hücre sitoplazmalarında yoğun floresan tutulum gözlenir. Primer biliyer siroz, skleroderma, ilaca bağlı hepatit ve ilaca bağlı lupusta görülür (36).



Şekil 2.15. Sitoplazmik Boyanma / Anti-Mitokondrial Antikor (AMA) Benzeri Boyanma, HEp-2 hücresi ve primat karaciğeri

Sitoplazmik Boyanma / Anti-Jo1 Benzeri Boyanma

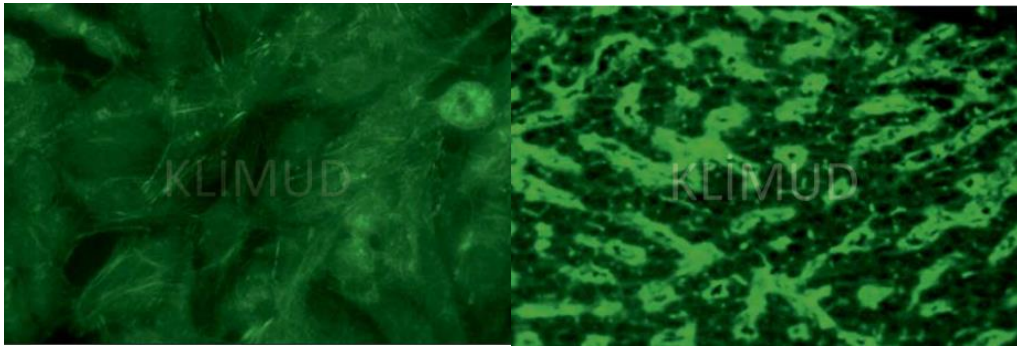
Histidil-tRNA sentetaz enzimine karşı antikor varlığında HEp-2 hücre sitoplazmasında ince benekli / homojen boyanma gözlenir. Maymun karaciğer sitoplazmaları çok silik boyanır. Polimiyozit, sistemik skleroz, interstisyel akciğer fibrozu, Raynaud sendromu ve polisinovitte görülür (36).



Şekil 2.16. Sitoplazmik Boyanma / Anti-Jo1 Benzeri Boyanma, HEp-2 hücresi ve primat karaciğeri (36)

Sitoplazmik Boyanma / Anti-F-Aktin Benzeri Boyanma

Bir hücre iskeleti proteini olan F-aktine karşı antikor varlığında HEp-2 hücre sitoplazmasında uzunlu-kısalı birbirine paralel ince çizgilenmelerin oluşturduğu adeta ‘buzlu cam’ görünümünde floresan tutulumu ifade eder. Maymun karaciğer sitoplazmalarındaki safra kanaliküllerini saran floresan ışımaya ‘kaz ayağı’ şeklinde görünüm verir. Tip-1 otoimmün hepatit, primer biliyer siroz gibi otoimmün karaciğer hastalıklarında görülür (36).

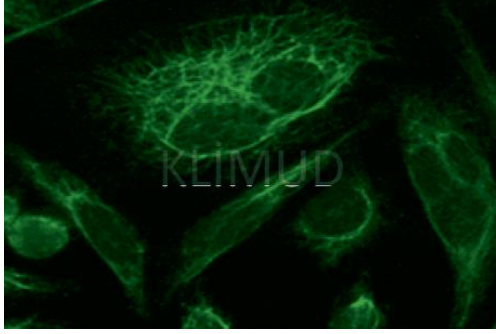


Şekil 2.17. Sitoplazmik Boyanma / Anti-F-Aktin Benzeri Boyanma, HEp-2 hücresi ve primat karaciğeri (36)

Sitoplazmik Boyanma / Anti-Vimentin Benzeri Boyanma

Vimentine karşı oluşmuş antikorlar varlığında HEp-2 hücre sitoplazmasında, nükleus çevresinde daha yoğun, dışarı doğru gittikçe azalan

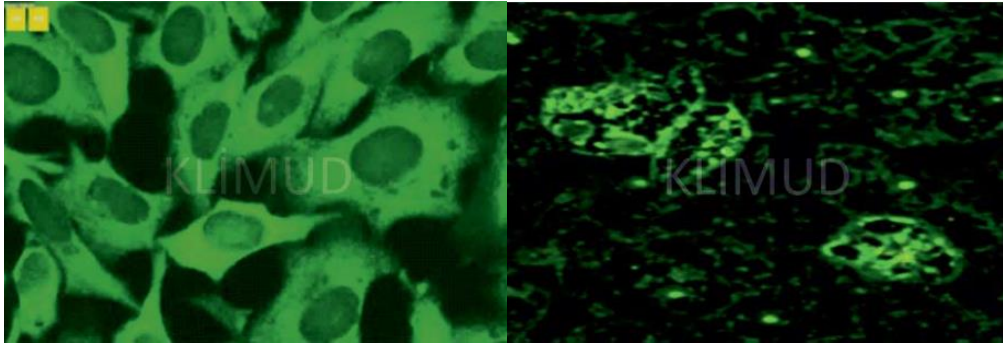
fibriler floresan tutulumdan ibarettir. Maymun karaciğerinde özel bir görünüm sergilemez ve belli bir hastalıkla ilişkilendirilememiştir (36).



Şekil 2.18. Sitoplazmik Boyanma / Anti-Vimentin Benzeri Boyanma, HEp-2 hücresi (36)

Sitoplazmik Boyanma / Anti-Ribozomal P Proteinini Benzeri Boyanma

Ribozomal P fosfoproteinine karşı (P0, P1, P2) antikörler varlığında HEp-2 hücre sitoplazmasında çok yoğun ince benekli görünüm verir. SLE’de görülür (36).

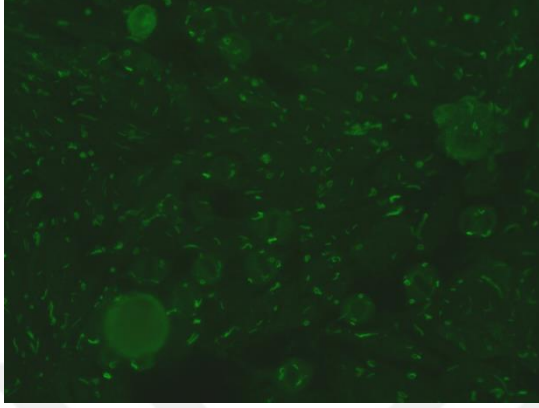


Şekil 2.19. Sitoplazmik Boyanma / Anti-Ribozomal P Proteinini Benzeri Boyanma, HEp-2 hücresi (36)

Sitoplazmik Boyanma / Çubuk ve Halkalar (AC 23)

AC-23 ile gösterilen, özellikle interfaz sitoplazmasında çubuk ve halkalar şeklinde kendini gösteren yeni bir patern tanımlanmış olup, HCV hastaları, IFN /

Ribavirin tedavisi sonrası, nadiren SLE, Hashimoto tiroiditi ve sağlıklı kişilerde de bulunabilmektedir (61).



Şekil 2.20. Çubuk ve halkalar, HEp-2 hücresi

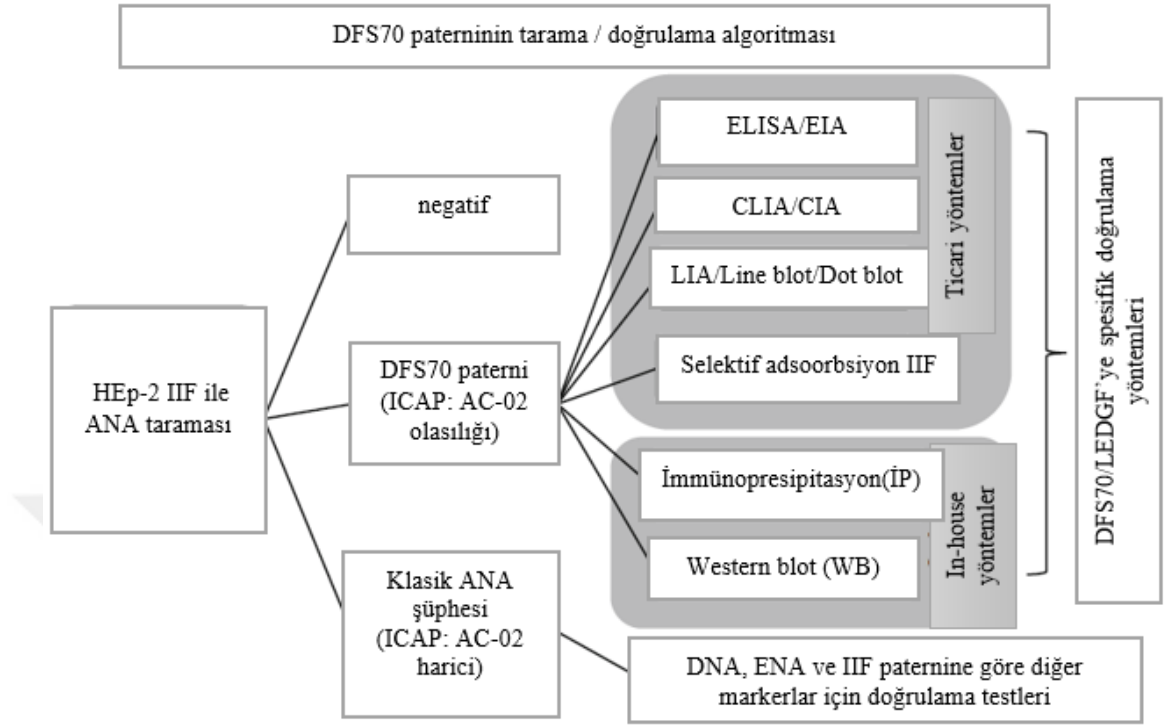
2.9. Otoantikörlerin Laboratuvar Tanısı

AARD grubu sistemik lupus eritematozus (SLE), Sjögren sendromu (SS), miks konnektif bağ dokusu hastalığı (MCTD), sistemik skleroz (SSc) ve otoimmün miyoziti içermektedir. AARD tanısında ANA'nın duyarlı bir tarama testi sonrası yüksek özgüllüğe sahip bir doğrulama testi ile doğrulanması önerilmektedir (64,65,66). Bu yaklaşıma refleks test sistemi adı verilmektedir. Refleks test yaklaşımı birinci basamak testin pozitif bulunması ikinci basamakta daha önceden belli kurallara göre belirlenmiş bazı testlerin yapılmasını ifade eder. ANA tanımlamasında refleks test yaklaşımı kullanılıyor (şekil-2.21). Çünkü tek başına ANA düşük prediktif değere sahiptir, özel bir hastalığa spesifik değildir ve IIF ile tanımlaması subjektiftir (67). Bu yaklaşıma göre ANA IIF taramasında DFS paterni saptanmışsa ELISA / CIA / LIA / immünoadsorbsiyon IIF / immünopresipitasyon veya WB gibi ikinci basamak bir yöntemle doğrulanmalıdır. Diğer paternlerde pozitiflik saptandığında ise onlara yönelik ENA araştırması önerilmektedir (şekil 2.21) (68). DFS paterninin homojen veya granüler gibi başka paternlerle birlikte olması durumunda da, diğer antikörler de araştırılmalıdır (şekil 2.22) (68). Duyarlı tarama testi, negatif prediktif değer (NPD) yüksek oluşu nedeniyle AARD tanısını dışlamaya yardımcıdır (69,70). Fakat tarama testindeki pozitif sonuçlara dikkat

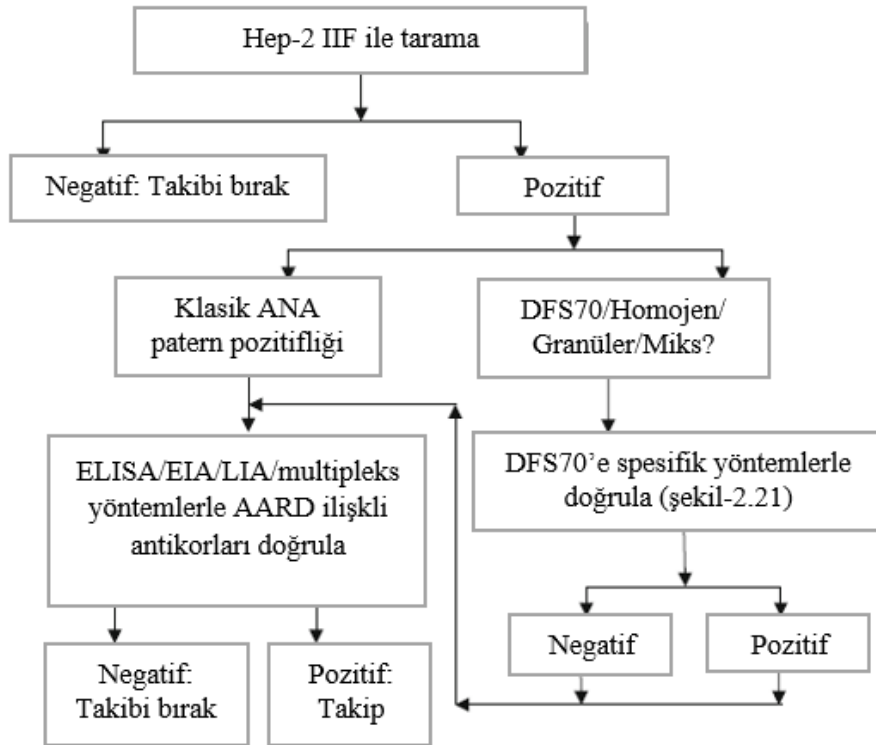
edilmelidir çünkü tek başına AARD tanısını güvenle koydurmaya yetmez. Tarama testleri yanlış pozitifliklerin de olduğu tüm otoantikörleri saptamaya yarar (71). Bu yüzden pozitif sonuçların daha özgül bir yöntemle doğrulanması gereklidir (65,72,73).

AARD tanısında ANA tarama testi olarak HEp-2 hücrelerinin kullanıldığı IIF yöntemi altın standart olarak belirlenmiştir (1). HEp-2 hücrelerinin SS/A, Jo-1 (histidil-tRNA sentetaz) ve anti-ribozomal P antijenlerini yeterince eksprese etmediği veya etanol/metanol fiksasyonu esnasında özellikle SS/A antijenini yitirebildiği bilinmektedir (36,74,75). Ayrıca Jo-1 sitoplazmik bir antijen olduğu için nükleer floresan vermeyen durumlarda varlığı dışlanamaz (75). Bu yüzden IIF ile “yanlış negatiflik” ler görülebilir. Bunu aşmak için SS/A-Ro60 cDNA ile transfekte edilip HEp-2000 serisi hücreler elde edilmiştir (74,76,77,78). İnflamatuvar miyopatiler açısından da ANA IIF yeterince duyarlı değildir; bu durumlarda multiparametrik yöntemler önerilmektedir (79,80,81,82).

ANA negatifliği otoimmün hastalık riskini dışlamaz; aynı şekilde pozitifliği de spesifik bir tanı koydurmaz. Pozitif ANA sonucu, şüphelenilen klinik duruma göre genellikle ileri tetkik yapılmasını gerektirir. Örneğin vaskülitler için ANCA veya SLE için anti-dsDNA, anti-Sm gibi. Otoimmün hastalığı olan bazı kişilerde ANA negatif olabilir; aynı şekilde sağlıklı popülasyonun küçük bir kısmında da pozitif çıkabilir (12). Özellikle tarama sınır değeri düşük tutulduğunda sağlıklı kişilerde bu pozitiflik %40’ları bulabilmektedir (83). Ayrıca bu çalışmada tartışılacağı üzere bazı ANA pozitiflikleri (DFS paterni gibi) sağlıklı grupta da beklenmektedir. Non-spesifik pozitiflikleri dışlayabilmek için tarama sınır değer olarak 1/80 veya 1/160 değeri önerilmektedir (36). Ayrıca ileri yaşlarda ve bazı kanser hastalarında otoantikörler bulunabileceğinden, ANA istemi otoimmün hastalık şüphesi varlığında istenmelidir (12). ANA pozitifliği mutlaka klinik bilgi eşliğinde yorumlanmalıdır (36). Klinik bulguları olmayan sağlıklı kişilerde ANA pozitifliği, bağ doku hastalığı tanısı koydurmaya yetmez (84). Bu pozitiflik belki de sağlıklı kişilerde normal immün cevabın bir parçası olabilir. Diğer açıdan da otoimmün hastalıklar ortaya çıkmadan yıllar önce, özellikle SLE ve Sjögren sendromunda ANA pozitifliğinin saptanabildiği göz ardı edilmemelidir. Bu sayede erken tanıya gidilebilmektedir (85,86).



Şekil 2.21. DFS paterni tarama ve doğrulama algoritması (68)



Şekil 2.22. ANA HEp-2 IIF tanısal algoritması (68)

Otoantikor saptanmasında kullanılan immunoassay yöntemlerinin standardizasyonu, saf standart, referans yöntemler ve standart referans materyallerin mevcut olmaması nedeniyle zordur. Ayrıca standardizasyon zaman alıcı ve pahalıdır. Test kalibrasyonundaki büyük farklılıklar, test sonuçlarının yetersiz yorumlanmasına yol açar (87). Bir testin özgüllüğü, o testte kullanılan antijenlere ait epitoplara bağlıdır.

2.10. Otoantikor Saptamada Kullanılan Yöntemler

Otoantikorları tanımlamada kullanılan yöntemlerin bir kısmı 60 yıldan fazla süredir kullanılan geleneksel yöntemler, bir kısmı ise son yıllarda kullanılmaya başlanan yeni yöntemlerdir.

Geleneksel yöntemler:

- 1) IIF
- 2) Western blotting (immunoblotting, IB)
- 3) ELISA
- 4) Çift yönlü immünodifüzyon
- 5) Kompleman fiksasyon
- 6) Pasif aglütinasyon
- 7) Radioimmunopresipitasyon
- 8) Radioimmunoassay (RIA)
- 9) Counter İmmünoelektroforez

Yeni yöntemler:

- 1) Multiparametrik (multipleks) yöntemler
 - a. Dot Immunoassay (DIA), line Immunoassay (LIA)
 - b. Multipleks IIF (CytoBead)
 - c. Solid faz yöntemler
 - Düzlemsel (Planar) yöntemler (microarray)
 - Düzlemsel olmayan boncuk bazlı yöntemler (ALBIA, CIA)
- 2) Mass spectrometry (SELDI-TOF) (surface-enhanced laser desorption ionization-time of flight)

2.10.1. İndirekt İmmunofloresan (IIF)

ANA taramasında ACR'ye göre altın standart yöntem human epitelial tip-2 (HEp2) hücresinin substrat olarak kullanıldığı IIF'dir (1). Substrat olarak HEp2 hücrelerini içeren slaytlara hasta serumu ilavesiyle özgül antijen-antikor bağlanması sağlanır. Yıkama ile bağlanmayan maddeler uzaklaştırıldıktan sonra floresan işaretli sekonder antikor eklenerek floresan mikroskopta görünür hale gelmiş olur (12).

Düşük titre pozitiflikler sağlıklı kişilerde de olabileceğinden (1/40 titre için sağlıklı kişilerde %32 olmak üzere), belli bir titrenin üzeri ANA pozitif kabul edilmelidir; bu da birçok merkez için 1/160 ve üzerini ifade eder (88). 1/40 titresi yüksek duyarlı fakat düşük özgüllüğe sahip olup; 1/160 ise daha düşük duyarlı ama daha özgül bir oranı teşkil etmektedir (89). 1/160 ve üzeri titreler AARD açısından daha ileri incelemeye tabi tutulması, 1/40-1/160 arası titreler ise düşük pozitif olarak kabul edilip hastaların takipte kalması gerektiği belirtilmektedir (88). Ayrıca ANA titresinin hastalık aktivitesiyle orantılı olduğunu, semptomlar alevlendiğinde arttığını, remisyonda ise düştüğünü hatta tespit edilebilir eşik değerin altına indiğini unutmamak gerekir (90).

IIF testi oldukça duyarlı, kolay uygulanabilir ve ucuz bir yöntemdir (90). Zaman alıcı olması, yanlış pozitifliklerinin olması veya deneyimli personel gerektirmesi, otomatizasyon ve standardizasyonundaki eksikler yöntemin altın standart bir test olmasını engelleyememiştir (90,91,92). Bu noktada bu sorunların üstesinden gelmek için mikroskop görüntüsünü dijital ortama aktarılıp standart bir yaklaşımla pozitif / negatif sonuç veren ve patern tanıyan otomatize IIF patern tanımlayıcı yazılımlar geliştirilmiştir. Bu şekilde yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçların ve laboratuvar içi ve laboratuvarlar arası değişkenliğin azalacağı ve patern tanımda daha uyumlu sonuçlar doğuracağı öngörülmüştür (93).

2.10.2. Multiparametrik Yöntemler

Multiparametrik sistemler tek seferde birden fazla hedefi (otoantikor, protein) tanımlayabilen yeni nesil sistemler olup tek parametrelili sistemlere göre

daha maliyet ve zaman etkin olmalarıyla ön plana çıkmaktadırlar (12,94). Bu yöntemler, refleks test sistemindeki gibi tarama sonrası doğrulama testine ihtiyaç olmadan hedefi tek basamakta saptayabilen testlerdir. Ayırıcı tanıda, evrelendirme ve prognoz belirlenmesinde de yararlı olabilirler (95). Antijen kaynağı olarak bilinen veya bilinmeyen bir antijen karışımının kullanıldığı (IIF'deki HEp-2 hücreleri, WB'da olduğu gibi) yöntemler tek başına multiparametrik olarak kabul edilmemektedir çünkü antijen tanımlanmamaktadır (96). Buna karşın birden fazla monospesifik antijenin tanımlanabildiği yeni IIF yöntemi multiparametrik sınıflamasına girmektedir (96).

Multiparametrik yöntemlerde antijenin sabitlendiği test matrislerine göre spot veya çizgi şeklinde membrana yapıştırma (DIA / LIA), cam yüzey veya çoklu kuyucuk sistemlerine antijen sabitleme şeklinde gruplandırılabilir. Bunlar kullanımı kolay, manuel veya otomatize sistemlerde kullanmaya uygun malzemelerdir. Fakat kalibratör eksikliği nedeniyle ölçüm doğruluğu ve duyarlılığı düşük kalmaktadır. Mikroboncuklar (microbead) katı faz olarak kullanıldığında floresan veya kemiluminesan ölçüm oldukça duyarlı olup, lota spesifik kalibrasyon eğrileri sayesinde gerçek kantitasyon mümkün olmaktadır (97).

ANA IIF taraması bazı AARD için ideal yöntem olmadığı gibi, multiparametrik yöntemler de tüm otoimmün romatizmal hastalık grupları için uygulanamayabilir. Özellikle tip-1 diabetes mellitus (DM), myastenia gravis ve otoimmün tiroid hastalıkları gibi bazı organa özgü romatolojik hastalıklarda multiparametrik yöntemlerin şu an için kullanışlı olmadığı belirtilmiştir (96). Multiparametrik yöntemlerde kullanılan rekombinant proteinlerin, nativ antijenlerle aynı epitoplara taşımaması özellikle bazı otoantikorlar açısından kısıtlılık içermektedir (96).

Line Immunoassay (LIA) ve Dot Immunoassay (DIA)

Line immunoassay (LIA) katı faz olarak nitrosellüloz membrana antijenin aktarılması ve kolorimetrik olarak saptanması esasına dayanan düzlemsel yöntemlerden biridir (98,99). LIA ikinci nesil dot-blot assay olarak da kabul

edilebilir (100). Öncesinde elektroforez ve blotlama olmadan elde edilen antijenler DIA'da spot şeklinde aktarılırken, LIA'da birbirine eşit aralıklarla düz çizgiler şeklinde yerleştirilir (96). Bu iki yöntemde Western-blot tekniğinden farklı olarak blotting işlemi uygulanmadığı için Dot blot veya Line blot olarak isimlendirilmeleri uygun değildir (96). Geleneksel Western-Blot tekniğinde poliakrilamid jel elektroforezi ile molekül ağırlıklarına göre ayrıştırılan proteinlerin üç boyutlu yapısı bozulabilmekte, bu yüzden tekrarlanabilirliği düşmektedir. DIA / LIA'da ise rekombinant veya sentetik antijenler kullanılarak bu sorunlar aşılmıştır. Bu nitrosellüloz şeritler hasta serumu ile inkübe edilir ve serumda antikor varlığında ilgili bölgedeki antijenine bağlanması sağlanır. Yıkama ile bağlanmayan maddeler uzaklaştırılır. Ardından enzimle işaretlenmiş anti-human IgG (konjugat) ile muamelesi sonrası uygun substratın eklenmesiyle oluşan renk değişimi ile kalitatif veya semikantitatif (1+2+3+4+ şeklinde) sonuç alınmaktadır. Bu yöntem, günümüzde rutin laboratuvarlarda ANA taraması sonrası doğrulama için en sık kullanılan test olmuştur (101). Yöntemin avantajları kolay uygulanabilir olması, değerlendirmenin hem manuel hem de otomatize sistemle yapılabilir oluşu, tek şeritte birden fazla otoantikoru tanımlayabilmesi (ANA için 20'ye yakın) ve özgüllüğünün ve tekrarlanabilirliğinin yüksek oluşudur (90). Yöntemin kısıtlılıkları ise çok sayıda örnek çalışmaya uygun olmaması, nispeten pahalı olması ve bazı antikorları saptamadaki olası yetersizliğidir (96,102,103,104).

Multipleks IIF

Geleneksel yöntemlerden olan IIF ile dot veya boncuk üzerinde antijen doğrulama yöntemi olan mikroboncuk (microbead) immunoassay tekniğinin (MIA) bir araya getirilmesiyle oluşan yeni teknoloji CytoBead (Generic Assays, Germany) yöntemi karşımıza çıkmaktadır (105,106). Bu yöntemde duyarlı bir tarama ile özgül bir doğrulama birleştirilmiştir. Slaytın merkezinde hücresel substrat, etrafında da bilinen antijenlerin kaplandığı boncuklar bulunmaktadır. Yöntem geleneksel IIF'deki gibi hasta serumu ile inkübasyon sonrası bağlanan otoantikorların, fluorescein isothiocyanate (FITC) işaretli sekonder anti-human IgG eklenmesiyle floresan mikroskopta görünür kılınması esasına dayanır. IIF değerlendirmedeki

subjektivite, dotların varlığı ile azaltılmıştır. Hem değerlendiriciler tarafından mikroskopta manuel olarak hem de otomatize okuyucu sistemleri ile değerlendirilebilir. Otomatize değerlendirmede spesifik antikorlara ilişkin elde edilen floresan yoğunlukları otoantikor miktarı ile doğru orantılı olduğundan semikantitatif sonuç elde edilebilir. Hatta bu otomatize dijital floresan okuyucular sayesinde sadece spesifik otoantikoru değil merkezdeki ANA substratının da niceliksel analizi mümkün olmaktadır (107).

Microarray

Microarray sistemleri 1980'lerin sonunda ilk olarak tanımlandığında antijen-antikor kompleksini analiz eden 'multianalit immunoassay' olarak adlandırılmıştır (108). Bugün bu sistem sekanslama çalışmalarının yapıldığı DNA microarray'e kadar uzanmıştır (109). Düzlemsel mikroçipler mikroskopik slaytlar, polistren mikrolaklar ve nitrosellüloz membranlar olup bu yüzeyler üzerine protein veya DNA'nın immobilize edilmesi esasına dayanır (94,110). Otoantijen mikrodizileri temel olarak DNA mikrodizileri için geliştirilmiş ekipman ve yazılımları kullanır (111). Hasta serumu ile inkübe edildikten sonra HRP-konjuge sekonder antikor ve buna uygun kemiluminesan substratının eklenmesiyle oluşan renk değişimi "charged-coupled device (CCD) camera based chip reader" ile kapalı bir sistemde okunur (112). İlk olarak 2000 yılında Joos ve arkadaşları otoimmün hastalıklarda 18 adet otoantikoru nitrosellüloz membranda ve silan ile muamele edilmiş mikroskop slaytlarında oldukça duyarlı ve özgül bir şekilde tanımlamayı başarmıştır (113). Ancak bugün hala microarray sistemler rutine girebilmiş değildir. Daha çok araştırma amaçlı kullanılan bir teknoloji durumundadır. Protein microarray yöntemleri çok düşük miktardaki serumda birçok otoantikoru çalışabilmeye olanak sağlaması, yeni otoantikorların bulunmasına olanak sağlaması, tam otomatize ve sürekli performans sunabilmesi açısından avantajlıdır (90,114). Buna karşın yöntem standardizasyon getirilmeli, yorumlanmasında ve sonuçların paylaşılmasında da bir standart belirlenmelidir. Yöntemde çok fazla parametrenin gereksiz yere çalışılmasının klinisyen bazında kafa karıştırıcı olabileceği ve bazı etik problemlere neden olabileceği unutulmamalıdır (109). Ayrıca Sm ve histon proteinlerinin üç boyutlu yapısının kaybı, sterik interferans

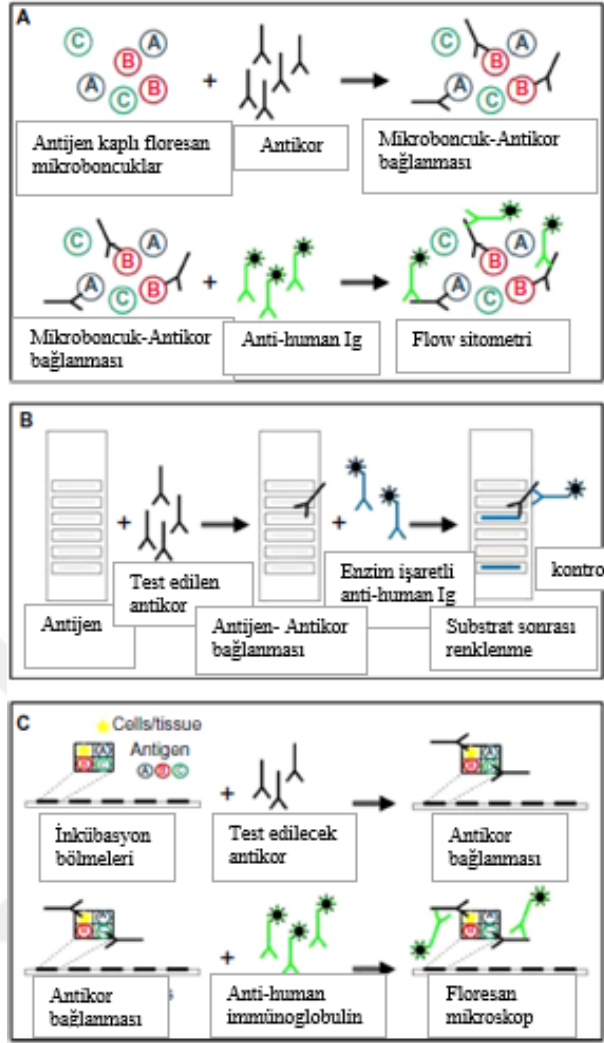
ve/veya elektrostatik itme gibi nedenlerle düzlemsel array’de saptanamayabileceği göz önüne alınmalıdır (109).

Multiparametrik Düzlemsel Olmayan Boncuk Bazlı Yöntemler (ALBIA, CIA)

Süspansiyon-boncuk bazlı analizler ilk olarak 1977’de tanımlanmıştır (115). Her bir kuyucukta katı faz olarak farklı antijenlerle kaplanmış 20 µm’lik polistiren (PS) veya polimetil metakrilat (PMMA) içeren mikroboncuklar kullanılmıştır (116,117,118). Polimerize floresan ışığa ve farklı boyutlardaki boncuk varlığı her bir boncuk popülasyonunun akan hücre ölçerde (flow sitometri) tanımlanmasını sağlar (97). Aslında her bir boncuk ayrı bir immunoassay yöntemini temsil etmektedir (96).

Hasta serumu ile inkübe edildikten sonra bağlanmayan maddeler yıkama ile uzaklaştırılır. Floresan bağlı anti-human IgG ile muameleden sonra akan hücre ölçerde antikor varlığı ve miktarı ölçümlenebilir (96). Farklı konsantrasyonlardaki standartlar kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizilir ve hastalara kantitatif sonuç verilebilir (96). Fakat farklı antikorların antijenine afinitesi farklı olduğundan doğru bir kantitatif kalibrasyon yapılamayabilir (112). Duyarlılık, güvenilirlik ve doğruluk, ELISA prosedürleri ile gözlemlenenlere benzerdir (111,119). Şu anda ise daha fazla, renge dayalı farklı mikroboncuk kümeleri kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Kırmızı (658-nm emisyon) ve kızıl ötesi (712-nm emisyon) florokromlar, 5.6-µm.lik mikroküreleri işaretlemek için çeşitli konsantrasyonlarda kullanılır. 100 mikroboncuk kümesinin her bir boncuğu, ayrı bir kızıl-kızılötesi oranına sahiptir ve bu nedenle, her bir boncuğun kendine özgü bir spektral adresi vardır (120).

635 nm’lik bir lazer, mikro kürecikler içine emdirilmiş kırmızı ve kızıl ötesi florokromları uyarır; bu da, boncuğun sınıflandırılmasına ve dolayısıyla analiz edilen prob hedefinin kimliğinin tanımlanmasına izin verir. 532 nm dalga boyunda bir lazer, mikroboncuk üzerinde meydana gelen herhangi bir hibridizasyonu ölçmek için R-fikoeritrin ve Alexa 532 gibi raportör florokromları uyarır (120).



Şekil 2.23. Multiparametrik yöntemler a) ALBIA b) LIA / DIA c) IIF (96)

2.11. DFS-70 Antijeni ve Antikoru

Anti-DFS70 antikoru ilk olarak 1994 yılında interstisyel sistitli bir hastada tanımlanmıştır (2). Söz konusu antikorun antijeni olan DFS70, WB'ta 70 kD molekül ağırlığına sahip olması ve IIF'deki yoğun ince benekli görünümü itibarıyla bu ismi almıştır. Ardından protein sekans verilerine göre DNA bağlayıcı transkripsiyonel koaktivatör p75/lens epiteli büyüme faktörü (LEDGF) ile aynı olduğu fark edilmiştir (121). Aslında LEDGF terimi doğru bir adlandırma olmamaktadır. Çünkü DFS70 antijeni sadece lenste değil vücutta birçok dokuda bulunmakta olup, direkt olarak lens epitelinin gelişmesine de katkıda bulunmamaktadır (122). Protein PSIP1 (PC4 ve SFRS1 interacting protein 1) olarak

adlandırılmasına rağmen, LEDGF/p75 proteini, anti-DFS70 antikorunun otoantijeni olarak daha yaygın kullanım alanı bulmuştur (122). DFS-70/LEDGFp75'in fibroblast, keratinosit ve kanser hücreleri gibi çeşitli hücrelerde varlığı gösterilmiştir (123). Bu protein 15 eksonu ve 14 intronu olan *PS1P1/LEDGF* geni tarafından kodlanır (123). Proteinin N terminal bölgesi kromatine bağlanma bölgesi (124), 349-435. aminoasitlerini içeren oldukça iyi korunmuş C-terminal bölgesi ise otoantikorlar tarafından tanınan bölgesidir (125).

Yapılan araştırmalar sonucu hücre içinde çok önemli birçok fonksiyona sahip olduğu anlaşılmıştır. DFS70/LEDGF antijeni çok iyi korunmuş bir antijen olup DNA'ya bağlanarak gen ekspresyonu ve hücrel stres cevabı üzerinde etkindir (3,126,127). Bazı kemoterapötikler, hipertermi, alkol, UVB, radyasyon ve H₂O₂ gibi hücrel stres sağ kalım faktörlerine karşı hücreyi korur (123,127,128). Bunların yarattığı oksidatif stres DFS70/LEDGFp75 proteinini artırır ve aktive eder. Bazı çalışmalara göre DFS70/LEDGFp75'nin aktive olması stres gen ekspresyonunu düzenlemektedir (129). Hipoteze göre; anti-DFS70 antikorları bu proteinin geçici olarak azalmasına, dolayısıyla stres varlığında daha az hücrenin hayatta kalabilmesine ve kısıtlı DFS70/LEDGFp75 varlığında hayatta kalmayı başaran hücrelerin seçilmesine neden olmaktadır (130,131). DFS70/LEDGF antijeninin ayrıca HIV replikasyonunda önemli bir hücrel kofaktör olarak viral integras ile ilişki içinde olduğu gösterilmiştir (132,133).

DFS70/LEDGF hücrel oksidatif stresin indüklediği apoptozu engelleyen bir proteindir (127). Bu proteinin aşırı kodlanması veya hücre kültürüne dışarıdan eklenmesiyle hücre büyümesini indüklediği ve bu hücrelerin sağ kalımında artışla sonuçlanmıştır (121). Ayrıca bir onkoprotein gibi aşırı ekspresyonu ile kanser hücrelerinin büyümesine katkı sağladığı sonucuna varan çalışmalar da vardır (134,135). Bu etkisini stres ilişkili anti-apoptotik proteinlerin (Hsp27, B-crystallin, Hsp90, involucrin ve antioksidan protein 2) transkripsiyonunu kolaylaştırarak yaptığı düşünülmektedir (127). Hücrel düzeyde apoptozun düzenlenmesinde görev alan molekül olan TGF- β 1'in, DFS70/LEDGF proteinini azalttığı ve DNA'ya bağlanma afinitesini azalttığı da gösterilmiştir (136). Wu ve ark. DFS70/LEDGF proteininin erken apoptozda *in vitro* kaspaz 3 ve 7'nin proteolitik olarak yıkıma uğratıldığını bildirmişlerdir. Bu yıkım sonucu molekül ağırlıklarına göre (kD) p58,

p65 ve p68 adlı parçalar oluşmuştur. Parçalanma sonucu LEDGF / p75 proteininin sağ kalım fonksiyonunda kayıp olduğu ve oluşan 58 ve 65 kD ağırlığındaki parçaların atopik hastalıklar ve kronik inflamatuvar durumlara zemin hazırlayabilen immünojenik peptitler olabileceği sonucuna varmışlardır (137).

Bu antijene karşı gelişmiş anti-DFS70 antikoru esas olarak IgG yapısındadır (34). Anti-DFS70 antikorunun doğal ve koruyucu bir antikor mu veya patojenik mi olduğu henüz anlaşılamamıştır (68).

DFS paterni ilk olarak interstisyel sistitli hastalarda gösterilmiş, daha sonra anti-DFS70 antikoru katarakt, atopik dermatit ve Vogt-Harada sendromu, prostat kanseri, otoimmün tiroidit gibi hastalıklardaki varlığı gösterilmiştir (2,3,4,5,6,7). Ardından ilk olarak 2004 yılında Watanabe ve arkadaşlarının bir grup sağlıklı insan üzerinde yaptıkları çalışma sonucunda, bu otoantikorların SARD'a göre sağlıklı popülasyonda daha fazla görüldüğü sonucuna varmışlardır. Bu antikora sahip olmanın, sistemik otoimmün romatizmal hastalık tanısından uzaklaştırdığı ve gereksiz ek tetkik yapılmasını önleyeceği için daha maliyet-etkin bir yaklaşım olabileceği sonucuna varmışlardır (8). Ayrıca anti-DFS antikorlarının SARD da genellikle diğer antikorlarla birlikte olmasına karşın, sağlıklı bireylerde monospesifik olarak bulunduğu; böylelikle SARD'ı dışlamak için kullanılabileceği fikri yaygınlık kazanmaya başlamıştır (9,10,11).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereç

3.1.1 Hasta Grubu

Otoimmün romatolojik hastalık şüphesiyle Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı'na gönderilen hastalara ait serum örnekleri toplandı. Ad-soyad, cinsiyet, yaş gibi demografik bilgilerin yanı sıra dosya numarası, geliş tarihi, geliş şikayeti ve aldığı tanı gibi bilgileri de not edildi. Çalışma grubu 425 (%88.7) kadın, 54 (%11.3) erkekten oluşmaktaydı.

3.1.2 Serum Örneklerinin Toplanması ve Saklanması

Çalışmanın başlangıcında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından verilen 17.01.2018 tarihli onay sonrasında serum örnekleri toplanmaya başlandı. Ocak 2018-Ocak 2019 tarihleri arasında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi'nin çeşitli poliklinik ve servislerinden, romatolojik hastalık araştırılan hastalara ait serum örnekleri merkez laboratuvarında rutin olarak IIF ve LIA yöntemleriyle çalışıldı. Sonuçlara göre 4 grup oluşturuldu:

- 1-IIF'de DFS paterni (+), LIA'da DFS70 antikoru (+) olan 309 örnek
- 2-IIF'de DFS paterni (+), LIA'da DFS70 antikoru (-) olan 20 örnek
- 3-IIF'de DFS paterni (-), LIA'da DFS70 antikoru (+) olan 130 örnek
- 4-IIF'de DFS paterni (-), LIA'da DFS70 antikoru (-) olan 20 örnek

Bu dört grup serum örnekleri sırasıyla CytoBead ANA DFS70 ve ELISA çalışılmak üzere ayrıldı. Ayrılan bu serumlar 3 farklı ependorf tüpünde 200-1000 µl hacimlerde alikotlanarak numaralandırıldı ve -20°C'lik derin dondurucuda saklandı. Dördüncü grup olan kontrol grubu IIF'de hiçbir patern göstermeyen (negatif) ve LIA'da hiçbir antikoru içermeyen 20 örnekten oluşuyordu. 479 hastadan oluşan hasta grubu daha sonra CytoBead ANA DFS70 ve anti-DFS70 ELISA (IgG) çalışmalarını yapmak üzere sırasıyla çözündürülerek çalışmaya alındı.

3.1.3 Laboratuvar Gereçleri

- Buzdolabı (Arçelik marka, -20°C)
- Santrifüj (Siemens Aptio Automation, Almanya)
- EUROIMMUN IF Sprinter cihazı (Euroimmun, Almanya),
- EUROBlotOne cihazı (Euroimmun, Almanya),
- Mindray mw-12a ELISA yıkama cihazı (Çin),
- Bio-Rad iMark microplate reader (A.B.D),
- Vortex,
- Gilson marka otomatik pipetör (1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl.lik),
- EUROStar III Plus LED mikroskop (Euroimmun, Almanya) ve kamera kullanıldı.

3.1.4 Kullanılan Kitler

- IIF için: Mosaic HEp-2010 / Liver (monkey) (Euroimmun, Almanya)
- LIA için: EUROLINE ANA Profile 3 Plus DFS/70 (IgG), (EUROIMMUN, Almanya)
- CytoBead ANA DFS70 için: CytoBead ANA DFS70 (Generic Assay, Almanya)
- ELISA için: Anti-DFS70 ELISA (IgG) (EUROIMMUN, Almanya)

3.2 Yöntem

3.2.1.İndirekt immunofloresan (IIF) yöntemi:

IIF istemi ile gönderilen 479 serum örneği merkez laboratuvarı İmmünoloji/seroloji biriminde çalışıldı. Çalışma Mosaic HEp-2010 / Liver (monkey) (Euroimmun, Almanya) kiti kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi:

1. Mosaic HEp-2010 / Liver (monkey) (Euroimmun, Almanya) kiti +4°C'den, oda sıcaklığına getirildi.

2. Serumlar çözüldükten sonra her biri çalışmadan hemen önce birkaç saniye kadar vortekslendi.
3. 2L distile suya bir tüp tween 20 solüsyonu, iki kutu Phosphate Buffered Saline (PBS) tozu eklenerek homojen bir şekilde karıştırılarak PBS-tween 20 solüsyonu (pH 7.2) hazırlandı.
4. Her defasında çalışılacak sayıda serum, mikrosantrifüj tüplerinden alikot tüplerine aktarıldı ve numaralandırıldı.
5. Her bir kitte 10'luk veya 50'lik slaytlar kullanıma hazır.
6. Her çalışmada bir pozitif, bir de negatif kontrol kullanıldı.
7. Numara sırasına göre alikot tüpleri EUROIMMUN IF Sprinter (Almanya) cihazına yerleştirildi.
8. Cihaz 10 µl serum ile serum dilüenti olarak 990 µl PBS-tween 20 solüsyonunu karıştırdı. Böylelikle 1/100 dilüsyonda serum örnekleri elde edilmiş oldu.
9. Bu dilüsyondan 30 µl alınarak, zemininde antijen olarak HEp-2010 ve maymun karaciğer dokusu bulunan kuyucuğa pipetlendi.
10. Pipetleme sonrası 30 dk oda sıcaklığında inkübe edilen slaytlar, inkübasyonun ardından 5 dk boyunca PBS-tween 20 yıkama solüsyonu ile yıkandı. Yıkama ile bağlanmayan maddeler uzaklaştırılmış oldu.
11. Ardından sekonder antikor olarak 25 µl FITC ile işaretli anti human IgG içeren konjugat eklendi.
12. Konjugat ışığa hassas olduğu için 30dk boyunca oda sıcaklığında, karanlıkta inkübe edildi.
13. Inkübasyon periyodunun sonunda ikinci kez PBS-tween 20 solüsyonu ile 5 dk yıkama gerçekleştirildi. Yıkama ile bağlanmayan tüm maddeler uzaklaştırılmış oldu.
14. Uygun şekilde kurulama işleminin ardından tüm kuyucuklara 10 µl olacak şekilde gliserol damlatılıp lamelle kapatıldı.
15. Ardından LED mikroskopta 40x büyütme ile tüm örnekler incelendi.
16. Tüm çalışmalarda pozitif ve negatif kontrol kuyucukları incelendi ve testin geçerli olduğu saptandıktan sonra hasta örneklerine geçildi.

17. Her bir bölmedeki HEp-2010 hücrelerinin sitoplazma ve çekirdek yapıları boyanma olup olmaması açısından dikkatle incelenip, eğer yeterli boyanma yoksa 'negatif' olarak değerlendirildi; eğer boyanma varsa paterni ve şiddeti not alındı. Her iki durumda maymun karaciğer dokusu da incelenerek konfirme edildi.
18. 1(+) 1/100, 2 (+) 1/320, 3(+) 1/1000, 4(+) 1/3200 dilüsyona denk gelecek şekilde not alındı.

3.2.2 Line Immunoassay (LIA) Yöntemi:

Uygulama EUROLINE ANA Profile 3 Plus DFS/70 (IgG), (EUROIMMUN, Almanya) kiti kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda şu şekilde yapıldı:

1. İşlem basamakları EUROBlotOne (Euroimmun, Almanya) cihazı ile gerçekleştirildi.
2. 479 adet serum örneği, her bir testte 44 hasta olacak şekilde çalışıldı.
3. Kitin uygulamadan önce +4°C'lik buzdolabından çıkarılıp oda sıcaklığına gelmesi sağlandı.
4. Substrat solüsyonu ve tampon çözelti kitin içinden kullanıma hazır olarak çıktı.
5. Enzim konjugat ve wash buffer konsantre olarak geldiği için manuel olarak dilüe edildi. Enzim konjugatı 10x konsantre şekildeydi. 1,35 ml tampon çözelti ile 0,15 ml enzim konjugat karıştırıldı. Böylece 1/10 olacak şekilde seyreltilmiş oldu. Dilüe edilen enzim konjugatı aynı gün içinde kullanıldı.
6. Wash buffer 10x konsantre şekildeydi. 1/10 dilüsyon olacak şekilde 1 ml wash buffera 9 ml distile su eklendi. Dilüe edilen wash buffer da aynı gün içinde kullanıldı.
7. Sırasıyla DFS70, AMA M2, Ribozomal P-protein, Histon, Nucleosom, dsDNA, PCNA, CENP-B, Jo-1, PM-Scl, Scl-70, SSB, Ro-52, SSA (native), Sm, nRNP/Sm antijenlerinin emdirilmiş olduğu stripler hasta numaraları eklenerek cihaza yerleştirildi.

8. EUROBlotOne cihazı her bir stribe önce 1,5 ml tampon çözelti ekledi ve 5 dk boyunca inkübe etti.
9. İnkübasyon sonunda EUROBlotOne cihazı fazla sıvıyı aspire etti.
10. Cihaz 15 µl hasta serumu ile 1,5 ml tampon çözeltiyi karıştırarak serum örneklerini 1:101 oranında dilüe ettikten sonra, dilüsyondan 1,5 ml alıp her bir strip üzerine ekledi.
11. Stripleri 30 dk boyunca çalkalayarak inkübe etti.
12. İnkübasyon sonunda cihaz; fazla sıvıyı aspire edip 3 kez 1,5 ml hacminde wash buffer ile yıkama yaptı, sonunda fazla sıvıyı tekrar aspire etti.
13. Yıkama sonrası 1,5 ml alkalin fosfataz bağlı anti human-IgG içeren dilüe edilmiş enzim konjugatı koydu.
14. 30 dk boyunca oda sıcaklığında inkübasyon sonunda fazla sıvıyı aspire etti ve bir önceki gibi yıkamaya aldı.
15. Ardından 1,5 ml enzime uygun substrat ekledi.
16. 10 dk karıştırıcı fonksiyonuyla birlikte inkübasyona aldı.
17. İnkübasyonun sonunda fazla sıvıyı aspire etti.
18. Distile su ile 1'er dk boyunca 3 kez son yıkamayı yaptı ve fazla sıvıyı aspire etti.
19. Kurutma işlemi sonrası test değerlendirmeye hazırıldı.
20. Tüm striplerde kontrol bandının çalışmış olması testin geçerli olduğunu gösteriyordu.
21. Cihaza ait EUROLinScan programı sayesinde otomatize okuma işlemi, striplerin manuel değerlendirilmesi ile konfirme edildi.
22. EUROLinScan ile 0-5 arası değere sahip olan bantlar 'negatif', 6-10 arası 'greyzone', ≥ 11 ise 'pozitif' bant olarak değerlendirildi.

3.2.3 CytoBead ANA DFS70:

Uygulama CytoBead ANA DFS70 Generic Assay (Almanya) kiti kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda şu şekilde yapıldı.

1. +4°C'de saklanan kit kullanımdan önce oda sıcaklığına (18-25°C) gelmesi için buzdolabından çıkarıldı.

2. Cam slaytlarda her birinde yan yana HEp-2 hücreleri ve DFS70 spesifik dot bulunan 8 kuyucuk bulunuyordu.
3. 479 adet hasta serumu 38'erlik gruplara ayrıldı; her çalışma öncesi 38 hasta serumu çözündürüldü.
4. Çalışmadan önce serum örnekleri -20°C lik derin dondurucudan çıkarılıp oda sıcaklığına (18-25°C) gelmesi sağlandı.
5. Oda sıcaklığına gelen serum örnekleri vortekslendi.
6. Sample buffer ve konjugat kullanıma hazırıldı.
7. 1 lt distile suya 10gr.lık PBS tozu eklenerek wash buffer hazırlandı.
8. Her çalışmada kitin içinden çıkan bir pozitif kontrol, bir de negatif kontrol 2'şer damla şeklinde kullanıldı.
9. Sırasıyla numaralandırılmış hasta serumlarından 5 µl alınıp, üzerine 495 µl sample buffer eklenerek 1/100 dilüsyonu elde edildi.
10. Hazırlanan bu dilüe serumlardan 60 µl alınıp sırasıyla slaytlardaki kuyucuklara pipetlendi.
11. 30 dk boyunca su banyosunda inkübasyona bırakıldı.
12. İnkübasyon sonunda her bölme üzerindeki sıvı pipetör yardımıyla aspire edildi.
13. Ardından 5 kez 2'şer dk PBS wash buffer ile yıkandı.
14. Yıkama sonrası blotting paper aracılığıyla slayt üzerindeki teflon alandan fazla sıvı manuel olarak uzaklaştırıldı.
15. Her bir bölmeye 60 µl konjugat eklenerek karanlık ve nemli ortam oluşturma amacıyla su banyosu içinde 30 dk inkübasyona alındı.
16. Süre sonunda her kuyucuk üzerindeki sıvı pipetör yardımıyla aspire edildi.
17. 5 kez 2'şer dk PBS wash buffer ile yıkandı.
18. Yıkama sonrası blotting paper kullanılarak teflon alandan fazla sıvı manuel olarak uzaklaştırıldı.
19. Her bölmeye birer damla gliserol damlatılıp, slaytların üzeri lamel ile kapatıldı.
20. LED mikroskopta incelemeye alındı.

21. Pozitif kontrolde DFS paterni ve DFS70 dot'unun pozitif olduğu; negatif kontrolde bu ikisinin negatif olduğu görüldüğünde testin geçerli olduğu kabul edildi.
22. Sırasıyla tüm kuyucuklardaki HEp-2 hücrelerinin sitoplazma ve çekirdek yapıları boyanma olup olmaması açısından dikkatle incelendi, eğer yeterli boyanma yoksa 'negatif' olarak değerlendirildi; eğer boyanma varsa paterni ve şiddeti not alındı.
23. Her bir kuyucuktaki DFS70 dotları, hemen yanlarında bulunan referans dotlar ile karşılaştırıldı; floresan boyanma varlığı pozitif, boyanma yokluğunda ise negatif olarak değerlendirilip not edildi.

3.2.4 Anti-DFS/70 ELISA (IgG):

Uygulama 96 kuyucuklu Anti-DFS70 ELISA (IgG) (EUROIMMUN, Almanya) kiti kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda şu şekilde yapıldı.

1. Kit kullanmadan önce +4°C'lik buzdolabından çıkarılıp oda sıcaklığına (18-25°C) gelmesi beklendi.
2. Her bir çalışmada 1 kalibratör, 1 pozitif kontrol, 1 negatif kontrol ve 93 hasta serumu çalışıldı.
3. Toplamda 264 hastaya ait serum örneği çalışıldı.
4. Çalışmadan önce serum örnekleri -20°C lik derin dondurucudan çıkarılıp oda sıcaklığına (18-25°C) gelmesi sağlandı.
5. Oda sıcaklığına gelen serum örnekleri vortekslendi.
6. 5 µl hasta serumu alınarak 1.0 ml tampon solüsyon eklendi ve 1/201 olacak şekilde dilüe edildi.
7. 10x konsantre wash buffer distile su ile karıştırılarak 1/10'a dilüe edildi.
8. Diğer tüm solüsyonlar kullanıma hazır olarak geldi.
9. Ardından zemininde DFS70 antijeni içeren 96 kuyucuklu plağa 100'er µl olacak şekilde sırasıyla kalibratör, pozitif ve negatif kontrol pipetlendi.
10. Kalan kuyucuklara ise sırasıyla numaralandırılmış dilüe hasta örnekleri eklendi.

11. 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
12. Ardından 450 µl wash buffer ile Mindray mw-12a (Çin) cihazında 3 kez 1'er dk.lık yıkama yapıldı.
13. Fazla sıvı uzaklaştırıldı.
14. Yıkama sonrası her bir kuyucuğa hızlıca 100 µl peroksidaz-işaretli anti-human IgG (sekonder antikor) pipetlendi.
15. Oda sıcaklığında 30 dk inkübasyona bırakıldı.
16. Ardından bir önceki gibi ikinci yıkama yapıldı.
17. Kromojen/substrat ışıktan etkilendiği için tüm kuyucuklara hızlıca 100 µl.lık kromojen/substrat eklenerek karanlık ortamda, oda sıcaklığında 15 dk inkübasyona bırakıldı.
18. Ardından reaksiyonu durdurmak için her bir kuyucuğa hızlıca 100 µl stop solüsyonu eklendi.
19. Durdurulan reaksiyon sonucu oluşan renk değişimleri 450 nm dalga boyunda Bio-Rad iMark microplate reader (A.B.D) ile fotometrik olarak okutuldu.
20. Okunan değerler not alındı.
21. Hesaplama pozitif ve negatif kontrollerin optik dansitesi, kalibratörün optik dansitesine bölünerek bulunan oranların geçerliliği saptandıktan sonra, test geçerli sayıldı.
22. Ardından sırasıyla tüm hastaların optik dansiteleri, kalibratörün optik dansitesine bölünerek elde edilen değerler not alındı.
23. <1.0 'negatif', ≥ 1.0 ise 'pozitif' olarak değerlendirildi.

3.2.5. İstatistiksel Analiz

Analizler IBM SPSS Statistics 23 paket programı üzerinden yapılmıştır. Testler arasındaki tutarlılığı değerlendirmek için Kappa analizi kullanılmıştır (138).

Çapraz tablolar kullanılarak araştırılan testin duyarlılık, özgüllük ve konkordans (uyum) değerleri hesaplanmıştır.

4. BULGULAR

Merkez laboratuvarına otoimmün romatizmal hastalık şüphesiyle Ocak 2018-Ocak 2019 tarihleri arasında gönderilen IIF ve LIA istemi birlikte olan örneklerden 479'u çalışmaya dahil edildi. Bu örnekler 4 gruba ayrıldı:

Tablo 4.1. Çalışma grupları

Gruplar	IIF Yöntemi	LIA Yöntemi	Toplam Sayı
1. grup	IIF (+)	LIA (+)	309
2. grup	IIF (+)	LIA (-)	20
3. grup	IIF (-)	LIA (+)	130
4. grup	IIF (-)	LIA (-)	20
			479

IIF (+) : IIF yöntemi ile yoğun ince benekli paterni olanlar

IIF (-) : IIF yöntemi ile negatif veya yoğun ince benekli paterni haricinde başka bir patern olanlar

LIA (+) : LIA yöntemi ile anti-DFS70 antikoru olanlar

LIA (-) : LIA yöntemi ile anti-DFS70 antikoru olmayanlar

Gruplarımız içinde IIF negatif, LIA negatif 20 örnek kontrol grubu olarak belirlendi. 54 erkek, 425 kadından oluşan çalışma grubu 1-88 yaş aralığındaydı. Yaş ortalaması 38.80 idi. Çalışmamızdaki 479 hastanın başvurduğu poliklinik ve servislerin yüzdesi şöyledir: 201'i romatoloji polikliniğine ait olmak üzere toplam 285 (%59.5) hasta iç hastalıkları poliklinik ve servislerinden, 69 (%14.4) çocuk sağlığı ve hastalıkları polikliniği, 63 (%13.1) fizik tedavi ve rehabilitasyon poliklinik/servisi, 22 (%4.6) dermatoloji polikliniği, 18 (%3.8) göğüs hastalıkları poliklinik/servisi ve diğer poliklinik/servislerden 22 (%4.6) örnek toplandı. Tanılarına göre hastalar şöyle gruplanmaktaydı: 21 SLE, 10 Sjögren sendromu, 2 sistemik skleroz, 1 sistemik bağ dokusu hastalığı olmak üzere toplamda 34 (%7.1)

hasta AARD grubundaydı. Diğer en sık grup artrit semptomu olan 85 (%17.7) hasta idi.

Hastaların tanıları retrospektif olarak değerlendirildi. 479 hastanın 34'üne (%7.1) AARD tanısı konduğu, kalan 445 örneğin de eklemlerle ilişkili semptomu olan hastalardan oluştuğu ve çeşitli ön tanımlarla IIF ve LIA testlerinin istendiği görülmüştür. IIF ile DFS paterni saptanan 329 hastanın 20'si (%6.1) AARD tanısı almıştır.

IIF ile DFS paterni saptanan 329 örneğin 309'unda (%93.9) LIA ile anti-DFS70 antikoru saptandı.

Tablo 4.2. IIF testi ile CytoBead HEp2 testinin karşılaştırması

	IIF (+)	IIF (-)		Relatif duyarlılık	Relatif özgüllük	Konkordans (uyum) (%)
CytoBead HEp2 (+)	179 (%54.4)	9 (%6.0)	188	%54.4	%94	%66.8
CytoBead HEp2 (-)	150 (%45.6)	141 (%94.0)	291			
Toplam	329	150	479			

κ :0.385 (p<0.001)

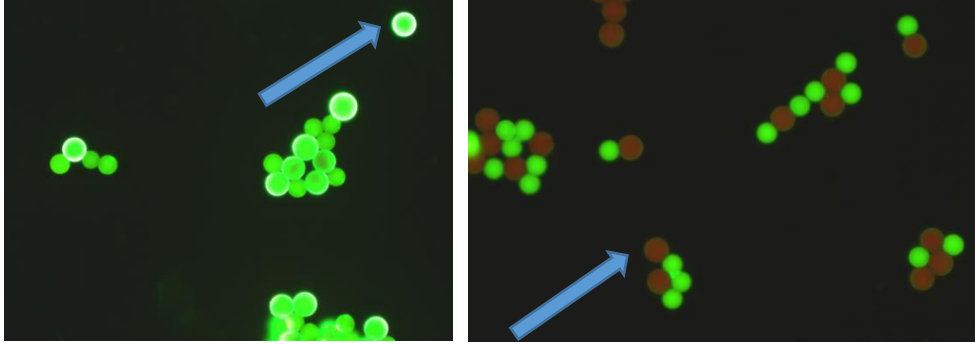
IIF altın standart kabul edildiğinde CytoBeadHEp-2 testinin duyarlılığı % 54.4; özgüllüğü % 94.0; PPD %95.2; NPD % 48.5 olarak bulundu.

Tablo 4.3. LIA testi ile CytoBead Dot testinin karşılaştırması

	LIA (+)	LIA (-)		Relatif duyarlılık	Relatif özgüllük	Konkordans (uyum) (%)
CytoBead Dot (+)	372 (%84.7)	0 (%0)	372	%84.7	%100	%86.0
CytoBead Dot (-)	67 (%15.3)	40 (%100)	107			
Toplam	439	40	479			

κ :0.481 (p<0.001)

LIA altın standart kabul edildiğinde CytoBead Dot testinin duyarlılığı % 84.7; özgüllüğü % 100; PPD %100; NPD %37.4 bulundu.



Şekil 4.1. CytoBead Dot görüntüsü (Ok işaretleri referans dotlara göre anti-DFS70 antikoruna pozitif ve negatif sonucu göstermektedir)

ELISA

479 örneğin içinden seçilmiş 264 tanesi ELISA DFS70 antikoruna çalışıldı. IIF(+), LIA(+) olan 309 örnekten (rastgele seçimle), CytoBead HEp-2 testinde DFS paterni olmayan 102 örnek ve DFS paterni olan 11 örnek olmak üzere 113 örnek; IIF(-), LIA (+) 113 örnek; IIF(+), LIA (-) 18 örnek ve kontrol grubundan IIF (-), LIA (-) 20 örnek olmak üzere toplamda 264 örnek ELISA ile çalışıldı.

IIF(+), LIA(+) ve CytoBead testinde DFS paterni olmayan 102 örneğin 96'sı (%94.1) ELISA ile anti-DFS70 antikoruna pozitif; 6'sı (%5.9) negatif bulundu.

IIF(-), LIA (+) 113 örneğin 62'si (%54.9) ELISA ile anti-DFS70 antikoruna pozitif; 51'i (%45.1) negatif bulundu.

IIF(+), LIA (-) 18 örneğin 2'si (%11.1) ELISA ile anti-DFS70 antikoruna pozitif; 16'sı (%88.9) negatif bulundu.

IIF (-), LIA (-) 20 örneğin 1'i (%5.0) ELISA ile anti-DFS70 antikoruna pozitif; 19'u (%95.0) negatif bulundu.

IIF testinde yoğun ince benekli paterni bulunan 131 örneğin 108'inde (%82.4) ELISA ile anti-DFS70 antikoru bulundu. IIF testinde yoğun ince benekli paterni olmayan 133 örneğin 70'inde (%52.6) ELISA ile antikor bulunmadı.

Tablo 4.4. LIA testi ile ELISA testinin karşılaştırması

	LIA (+)	LIA (-)		Relatif duyarlılık	Relatif özgüllük	Konkordans (uyum) (%)
ELISA (+)	168 (%74.3)	3 (%7.9)	171	%74.3	%92.1	%76.9
ELISA (-)	58 (%25.7)	35 (%92.1)	93			
Toplam	226	38	264			

$\kappa:0.415$ ($p<0.001$)

LIA altın standart kabul edildiğinde ELISA testinin duyarlılığı %74.3; özgüllüğü %92.1; PPD %98.2; NPD %37.6 olarak bulunmuştur.

LIA pozitif 439 örneğin 226'sına ELISA testi çalışılmış ve bunların 168'inde (%74.3) ELISA ile antikor saptanmıştır. 58'i (%25.7) ise ELISA ile negatif saptanmıştır.

Tablo 4.5. IIF, LIA ve ELISA testleri ile CytoBead HEp-2 testinin karşılaştırması

	IIF (+) LIA (+) ELISA (+)
CytoBead HEp2(+)	10 (%9.4)
CytoBead HEp2(-)	96 (%90.6)
Toplam	106 (%100)

$\kappa:0.032$ ($p>0.05$)

IIF testinde yoğun ince benekli paterni bulunan, LIA testinde anti-DFS70 antikoru bulunan ve ELISA testi ile anti-DFS70 antikoru bulunan toplam 106

örneğin 10'unu (%9.4) CytoBead HEp2(+) testi yoğun ince benekli patern verdi; 96 (%90.6) tanesine negatif sonuç verdi.

Tablo 4.6. IIF ve LIA testi ile CytoBead HEp-2 testinin karşılaştırması

	IIF (+) LIA (+) ELISA (+)
CytoBead Dot(+)	105 (%99.1)
CytoBead Dot(-)	1 (%0.9)
Toplam	106 (%100)

κ :0.520 (p<0.001)

IIF testinde yoğun ince benekli paterni bulunan, LIA testinde anti-DFS70 antikoruna bulunan ve ELISA testi ile anti-DFS70 antikoruna bulunan toplam 106 örneğin 105'ine (%99.1) CytoBead Dot testi pozitif sonuç verdi, 1'ine (%0.9) negatif sonuç verdi.

Tablo 4.7. ELISA testi ile CytoBead HEp-2 testinin karşılaştırması

	ELISA DFS70 (+)	ELISA DFS70 (-)		Relatif duyarlılık	Relatif özelliklilik	Konkordans (uyum) (%)
CytoBead HEp2 (+)	19 (%11.1)	3 (%3.2)	22	%11.1	%96.8	%41.3
CytoBead HEp2 (-)	152 (%88.9)	90 (%96.8)	242			
Toplam	171	93	264			

κ :0.058 (p<0.05)

ELISA altın standart kabul edildiğinde CytoBead HEp-2 testinin duyarlılığı % 11.1; özelliklilik % 96.8; PPD %86.4; NPD %37.2 bulundu.

Tablo 4.8. ELISA testi ile CytoBead Dot testinin karşılaştırması

	ELISA DFS70 (+)	ELISA DFS70 (-)		Relatif duyarlılık	Relatif özgüllük	Konkordans (uyum) (%)
CytoBead Dot (+)	153 (%89.5)	20 (%21.5)	173	%89.5	%78.5	%85.6
CytoBead Dot (-)	18 (%10.5)	73 (%78.5)	91			
Toplam	171	93	264			

κ :0.683 (p<0.001)

ELISA altın standart kabul edildiğinde CytoBead Dot testinin duyarlılığı % 89.5; özgüllüğü % 78.5; PPD %88.4; NPD %80.2 bulundu.

Tablo 4.9. ELISA ve LIA testi ile CytoBead Dot testinin karşılaştırması

	ELISA ve LIA (+)
CytoBead Dot (+)	153 (%91.1)
CytoBead Dot (-)	15 (%8.9)
Toplam	168 (%100)

κ :0.71 (p<0.001)

ELISA ve LIA birlikte pozitif olanların 153'ü (%91.1) CytoBead Dot testi ile pozitif, 15'i (%8.9) CytoBead Dot testi ile negatif bulunmuştur.

Tüm hasta grubunda IIF ile yoğun ince benekli paterni olan 329 örnekten 24'ünün bir başka patern ile birlikte olduğu görüldü. Bu kombine paternlerde en çok nükleer noktalama (16/24) varlığı saptanmış olup, ikinci sırada nükleolar (6/24) ve en az sitoplazmik patern (2/24) görüldü. Bu kombine paternlerin IIF ve CytoBead HEp2 sonucu bakımından karşılaştırması şöyleydi:

Tablo 4.10. IIF testinde yoğun ince benekli ile birlikte bulunan paternlerin, CytoBead HEp2, LIA, CytoBead Dot ve ELISA testi sonuçları

IIF sonucu	CytoBead HEp2	LIA	CytoBead Dot	ELISA
1/100 DFS ve 1/100 nükleer noktalanma	1(+) nükleer noktalanma	DFS-70, dsDNA	pozitif	pozitif
1/320 DFS ve 1/320 nukleolar	1(+) nükleolar	DFS-70, histon	negatif	negatif
1/1000 DFS ve 1/1000 nükleer noktalanma	2(+) DFS, 2(+) nükleer noktalanma, 1(+) sitoplazmik	DFS-70	pozitif	-
1/1000 DFS ve 1/100 nükleer noktalanma	1(+) DFS, 2(+) nükleer noktalanma, 1(+) sitoplazmik	DFS-70	pozitif	-
1/100 DFS ve 1/100 zayıf nükleolar	negatif	DFS-70, dsDNA	negatif	negatif
1/100 DFS ve 1/100 nükleer noktalanma	2(+) nükleer noktalanma, 1(+) sitoplazmik, 1(+) granüler	DFS-70	pozitif	pozitif
1/320 DFS ve 1/1000 nükleer noktalanma	2(+) nükleer noktalanma	DFS-70	pozitif	pozitif
1/100 DFS ve 1/320 nükleer noktalanma	1(+) granüler, 2(+) nükleer noktalanma	DFS-70, RNP/Sm	pozitif	pozitif
1/100 DFS ve 1/100 nükleer noktalanma	2(+) DFS, 3(+) nükleer noktalanma	DFS-70	pozitif	pozitif
1/100 DFS ve 1/100 nükleer noktalanma (+)	2(+) DFS, 3(+) nükleer noktalanma	DFS-70	pozitif	-
1/320 DFS ve 1/100 nükleer noktalanma	2 (+) DFS, 2(+) nükleer noktalanma	DFS-70	pozitif	-
1/100 DFS ve 1/100 nükleer noktalanma	2 (+) nükleer noktalanma	DFS-70, Ro-52	pozitif	pozitif
1/100 DFS ve 1/320 nükleer noktalanma	3 (+) nükleer noktalanma, 2 (+) granüler	DFS-70	pozitif	-
1/100 DFS ve 1/320 nukleolar	1(+) DFS, 2(+) nükleolar	DFS-70, histon, dsDNA	pozitif	-
1/100 DFS ve 1/100 nukleer noktalanma	2(+) DFS, 2(+) nükleer noktalanma	DFS-70	pozitif	-
1/100 DFS ve 1/100 sitoplazmik boyanma	2(+) sitoplazmik boyanma	DFS-70	pozitif	pozitif
1/100 DFS ve 1/100 nükleolar zayıf	1(+) DFS, 1(+) nükleolar	DFS-70	pozitif	-
1/320 DFS ve 1/100 nükleolar	negatif	DFS-70	pozitif	pozitif
1/100 DFS ve 1/100 nukleer noktalanma	negatif	DFS-70	pozitif	pozitif
1/1000 DFS ve 1/100 nükleolar	1(+) DFS, 1(+) nükleolar	DFS-70	pozitif	-
1/100 DFS ve 1/1000 nükleer noktalanma	2 (+) nükleer noktalanma	DFS-70	pozitif	pozitif
1/100 DFS ve 1/100 sitoplazmik	1(+) DFS	DFS-70, dsDNA	pozitif	pozitif
1/100 DFS ve 1/100 nükleer noktalanma	negatif	DFS-70	negatif	negatif
1/100 DFS ve 1/100 nükleer noktalanma	2(+) nükleer noktalanma	DFS-70	negatif	negatif

Bu 24 kombine paternin 14'ünde CytoBead HEp2 testi ile yoğun ince benekli patern hiç saptanamadı. 24 kombine paternin 10'unda CytoBead HEp2 testinde yoğun ince benekli paterni olmadan yanındaki patern tanımlandı. IIF'de 16 nükleer noktalanma olan örneğin 15'i (%93.8); 6 nükleolar patern gösteren örneğin 4'ü (%66.7); sitoplazmik boyanma gösteren iki örneğin 1'i (%50.0) CytoBead HEp-2 substratı ile pozitif bulundu.



5. TARTIŞMA

Sistemik lupus eritematozus (SLE), sistemik skleroz (SSc), Sjögren's sendromu (SS), mikst bağ doku hastalığı (MCTD) ve polimiyozit / dermatomiyozit (PM / DM) ten oluşan ANA ilişkili sistemik otoimmün romatizmal hastalıkların (AARD) tanı ve takibinde yeri olan anti-nükleer antikorların (ANA) tanımlanmasında, IIF yöntemi ACR tarafından altın standart olarak belirlenmiştir (1).

IIF yönteminde substrat olarak kullanılan HEp-2 hücrelerinin birçok avantajı vardır. 100-150 otoantijeni nativ olarak sergilemektedir (1). Yeni otoantikorların keşfine olanak sağlamaktadır (100). Organa spesifik olmayan dsDNA veya ENA gibi antikorları araştırmamızı sağladığı gibi IIF analizi sonrası hangi spesifik teste yöneleceğimiz konusunda da fikir verir. Anti-sentromer gibi bazı spesifik sonuçlarda ise ileri tetkike ihtiyaç duyulmamaktadır (100,122). Bunun yanında HEp-2 IIF testinin bazı dezavantajları da vardır. HEp-2 IIF testi uygulaması zaman alıcı ve sonuçları esas olarak değerlendiricinin deneyimi ile ilişkili olup subjektiftir. Bu durum hem laboratuvar içi hem de laboratuvarlar arası farklılıklara neden olmaktadır. Ayrıca mikroskoplar, ışık kaynağı, lens farklılıkları, kullanılan farklı HEp-2 kitleri, HEp-2 klonlarının seçimi, büyüme fazı, fiksasyon metodu, FITC konjugat spesifitesi, floresan madde/protein oranı, anti-human IgG spesifitesi, yıkama tekniği, kullanılan buffer seçimine bağlı olarak standardizasyonu zordur (68,100,122). Jo-1, ribozomal-P, Ro52/TRIM21 (tripartite motif) ve SS/A-Ro60 antijenleri söz konusu olduğunda duyarlılığı düşüktür; yani yanlış negatif sonuç vermesi mümkün olabilir (139,140,141).

HEp-2 IIF testinin genel olarak özgülüğünün düşük olmasına bağlı yanlış pozitif sonuçlar elde edilebilir (100). Bu sıkıntılar otomatize yazılımlar kullanılarak aşılmaya çalışılmıştır ancak henüz tüm paternleri tanınması mümkün olmamaktadır (122,142). HEp-2 IIF yönteminin en önemli dezavantajlarından biri AARD için özgülüğünün düşük oluşudur (100,122).

DFS paterni ilk olarak 1994'te interstisyel sistitli hastalarda, daha sonra LEDGF antijeni katarakt hastalarında gösterilmiş, daha sonra anti-DFS70 antikoru

atopik dermatitli hastalarda çalışılmış ve çeşitli diğer otoimmün romatizmal hastalıklarda sıklığını araştıran bir grup çalışmaya konu olmuştur (2,3,4). Ardından 2004 yılında Watanabe ve arkadaşları, sağlıklı insanlarda, bu otoantikorların AARD'ye göre daha fazla görüldüğü sonucuna varmışlardır. Bu antikora sahip olmanın, AARD tanısından uzaklaştırdığı ve gereksiz ek tetkik yapılmasını önleyeceği ve bu yaklaşımın daha maliyet-etkin olabileceği sonucuna varmışlardır (8). Ayrıca anti-DFS antikorlarının AARD'de genellikle diğer antikorlarla birlikte olmasına karşın, sağlıklı bireylerde monospesifik olarak bulunduğu gösterilmiş; böylelikle AARD'yi dışlamak için kullanılabileceği fikri yaygınlık kazanmaya başlamıştır (9,10,11). Prospektif bazı çalışmalarda örneğin Mariz ve arkadaşları 2011 yılında yaptığı 918 sağlıklı kişiden 118'inde (%12.9) ANA pozitifliği saptamış, en sık 2. patern DFS bulunmuş. ANA pozitif olan sağlıklı 40 kişi 4 yıl sonra tekrar değerlendirilmiş ve hiçbirinde AARD gelişmediği ve bunların 29'unda (%72.5) ANA pozitifliğinin devam ettiği gösterilmiştir (9). Gundin ve arkadaşlarının çalışmasında geleneksel yöntemde ANA testi sonrası ENA testi yapmak yerine izole anti-DFS70 pozitifliklerinde ileri tetkike gerek olmadığı vurgulanmıştır. Böylelikle hasta başvuru sayısının azaltıldığı ve maliyet-etkin olduğu sonucuna varılmıştır (143). Lee ve arkadaşları IIF testinde DFS paterni olan 181 hastanın AARD tanısı olmayan 150 tanesini 1 yıl gözlemlemişler ve bu sürenin sonunda hiç birinin AARD geliştirmedeğini göstermişlerdir (144). Sperotto ve arkadaşları 261 sağlıklı çocuktan anti-DFS70 antikoru olan 4'ünü 3 yıl boyunca takip etmiş ve hiçbir çocuğun AARD geliştirmedeğini gözlemlemişlerdir (145). Bu sonuçların izole anti-DFS antikoru varlığının, AARD'yi dışlamak için kullanılabileceğini öneren çalışmaları desteklediği görülmektedir. Buna karşın Fritzler ve arkadaşları "DFS paterni olan tüm olguların sağlıklı kişiler olmadığını belirtmiş ve bu monospesifik anti-DFS70 antikor varlığının AARD'yi dışlamak için kullanımının kliniklerde yaygın olarak kabul edilip uygulanmasından önce daha ileri çalışmalarla araştırılması gerektiği" şeklinde görüş bildirmiştir (146).

Sağlıklı kişilerde %20 oranında ANA pozitifliği olduğu ve bu antikorların çoğunluğunu DFS70 antijenine karşı oluşan antikorların oluşturduğu düşünülmektedir (8). Bu nedenle ANA titresini ve paterni, klinik bulgularla birlikte yorumlanmalıdır (147,148). Ayrıca sağlıklı popülasyondaki yüksek prevalansı ve

AARD ile olan düşük birlikteliği nedeniyle ICAP tarafından IIF ile DFS paterninin rutin hizmet veren tüm laboratuvarlarda tanınması ve raporlanması önerilmektedir (149).

IIF yöntemi ile DFS paternini tanımadaki güçlükler yaşanmakta ve merkezler arasında standardizasyon bulunmamaktadır (63,122,150,151). Bentow ve arkadaşlarının 2016 yılında İtalya, Hollanda ve İspanya gibi birçok ülkeden farklı deneyimlerde olan (<1 yıl, >10 yıl) 125 IIF değerlendiricisinin katılımıyla yaptıkları çok merkezli bir çalışmada sentromerik, nükleolar, granüler, homojen, DFS paternleri ile bu serumların DFS antikoru olduğu bilinen başka bir serum ile farklı oranlarda karıştırılarak elde edildiği miks paternlerin tanınabilirliği test edilmek istenmiştir. Sentromerik patern %95.2, nükleolar patern %74.4 olmak üzere tek paternlerde tanınabilirlik bu iki oranın arasında olup uyum yüksek olarak yorumlanmıştır. Fakat söz konusu DFS paterni olduğunda uyum %50 civarına düşmüş; hatta miks paternlerde bu uyum %10 dan daha az çıkmıştır. DFS paterninin her zaman izole patern olmayabileceği, diğer paternlerle birlikte olduğunda ise tanımlanmasındaki zorluk nedeniyle, mutlaka spesifik başka bir test ile doğrulanması gerektiği kanaatine varmışlardır (152).

Bizzaro ve arkadaşlarının 94 DFS paterni olan serumun MBL ELISA testi ile sadece 13 (%14)'ünde anti-DFS70 antikoru bulmaları üzerine, bu uyumsuzluğu açıklamak için olası hipotezlerinden birisi farklı hücresel substrat kullanımı olmuştur. Bu 94 örneğin 57'si (ELISA ile pozitif çıkan 13 örnek dahil) 4 farklı ticari substrat ile IIF testi çalışılmış ve düşük (1/80) titredeki örnekler sadece bir veya iki test tarafından tanınmış. Yüksek titredeki iki örnek, tüm ticari kitlerle pozitif çıkarken ELISA negatif bulunmuş. ELISA pozitif olan 13 örneğin sadece üçü dört farklı hücre hattında da pozitif bulunmuş (150). Benzer şekilde Mahler ve arkadaşları anti-ribozomal P antijeni için farklı ticari kitlerde farklı IIF görüntüleri elde ettiklerini bildirmişlerdir (153). Sonuç olarak seçilen hücre tipi, kültür koşulları, kullanılan fiksasyon metoduna bağlı olarak IIF'de farklı ticari kitlerle farklı sonuçlar alınabilmesi mümkün görünmektedir. Yaklaşık üç dekat önce SS/A-Ro60 antijeni transfekte edilmiş hücre hattı olan HEP-2000 hücre serisi oluşturulmuş (154), ardından da 10 kat fazla mitoz / metafaz kabiliyeti olan HEP-2010 hücre serilerine geçilmiştir. Bizim çalışmamızda da IIF yönteminde biri

Euroimmun'e ait HEp-2010 hücre serisi, diğeri Generic Assay'a ait HEp-2 hücre serisi olmak üzere iki farklı ticari kit kullanıldı. HEp-2010 hücreleri ile yoğun ince benekli paterni bulunan 329 örneğin 179'u (%54.4) HEp-2 hücrelerinde saptanabilmiş; buna karşın 150'si (%45.6) saptanamamıştır. Bu düşük uyum sayılan parametrelerdeki farklılıkları akla getirmektedir.

Bugüne kadar homojen patern interfaz nükleusunun diffüz boyanması ve mitotik hücrelerde kromatin boyamasını kapsıyordu. Fakat yapılan çalışmalarda kromatin boyanmasını 3 gruba ayırmak gerektiği ortaya çıkmıştır: 1. Klasik anti-dsDNA ilişkili homojen patern 2. Anti-DFS70 ilişkili DFS patern 3. Quasihomojen patern (7,9). Düşük titrede DFS paterni diğeri iki paternle karışabilmekte ve bu durum en çok quasihomojen paternde gözlenmektedir (122). Quasihomojen patern AARD grupta ağırlıklı olarak saptanan bir patern olup homojenden oldukça farklıdır ve ENA profili bakımından da DNA'ya karşı genellikle antikor bulundurmamaktadır. Fakat ince kumlu görüntüsüyle DFS paterni ile sıkça karıştırılabilmektedir (9). Quasihomojen paterne ait spesifik bir antikor olmadığı için homojen paternden kesin olarak ayrımı zordur. Bu nedenle DFS paternini tanımaya yönelik yapılan çalışmaların çoğunluğunda ayrı bir patern olarak bildirilmemiştir (151,155). Bizim çalışmamızda da quasihomojen patern olarak ayrı bir grup bulunmamaktadır.

DFS paterni AARD ilişkili diğeri antikorlar (örn dsDNA gibi) ile birlikteliğinde maskelenebilmektedir (122). AARD olan grupta anti-DFS antikorlarının en yaygın olarak anti-dsDNA ve anti-SSA ile birliktelik gösterdiği bulunmuştur (63). Bizim çalışmamızda ise LIA ile anti-DFS70 antikoruna bulunan 439 örneğin 37'si sadece dsDNA ile, 26'sı dsDNA ve başka bir ENA ile olmak üzere toplam 63 örnekte birliktelik gösterdi. dsDNA'dan sonra ikinci en sık ENA ise Ro-52 (34/439) idi. 63 örneğin 36'sı (%57.1) DFS paterninde iken, 27'si negatif veya başka paternlerdi. Buna göre DFS70 antikoruna birlikte başka antikor varlığı olan örneklerin %57.1'inde, HEp-2010'un substrat olarak kullanıldığı IIF yöntemi ile DFS paterni tanımlanabilmiştir.

Mariz ve arkadaşları IIF ile ANA pozitif 118 sağlıklı kişi ve ANA pozitif 138 AARD hastasında yaptıkları çalışmada sınır değerini 1/80 dilüsyon aldıklarında

duyarlılığı %90.2, özgüllüğü %87.1 bulmuşlar. Sınır değeri 1/5120 aldıklarında ise duyarlılığın çok düştüğünü (%44.4), özgüllüğün ise %99.2'ye çıktığını göstermişlerdir (9). Kesin olarak belirlenmiş bir tarama dilüsyonu sınır değeri olmamakla birlikte uluslararası literatürde genellikle 1/80 veya 1/160 değerini baz aldıklarını görüyoruz. Biz ise laboratuvarımızda rutin bakıda firma önerileri doğrultusunda 1/100 sınır değerini kullandık. Mercado ve arkadaşları sağlıklı birey olup DFS paterni sergileyen 4 kişiden sadece birinin yüksek titrede ($>1/160$) pozitif olduğunu vurgulamıştır (62). Buna karşın bir çalışmada DFS paterni olan 39 sağlıklı kişiden 29'unda (%61.5) 1/640 ve üzeri titrede pozitiflik saptanmıştır (9). Bizim çalışmamızda da literatür ile uyumlu olarak DFS paterni olan 329 örneğin sadece 58 (%17.6) tanesi 1/320 ve üzeri titrede, kalan 271'i (%82.4) düşük titrede (1/100) pozitif saptanmıştır. Titrasyon ile ilgili yapılan bir başka çalışmada 597 sağlıklı sağlık çalışanı ve 200 AARD'li hastada IIF, IB ve ELISA ile anti-DFS70 antikor araştırılmış ve 1/40 referans alındığında sağlıklı grupta %20 (119/597) ANA pozitifliği bulmuşlardır. 69/597 (%12) ve tüm ANA pozitiflerin %58'i IIF de DFS paterninde imiş. IB ile 64/597 (%11) tanesi anti-DFS70 pozitif bulunmuş. 200 AARD grubunda ise sadece 3 (%1.5) hasta anti-DFS70 pozitifmiş. Sonuç olarak da DFS antikorunun sağlıklı kişilerde daha çok olduğunu ifade etmişler ve pozitiflik titresini düşürmüş ($\leq 1/160$) (8). Çok düşük referans değeri varlığında daha çok sağlıklı bireye ANA pozitif sonuç verileceğinden testin AARD tanısını ayırt etme gücü azalacaktır. Bu çalışmada bunların yarısından fazlası DFS paterninde çıkmış. Nitekim bu çalışmada 1/80 referans alındığında pozitiflik %20 den %11'e düşmüştür. Non-spesifik pozitiflikleri azaltmak için ANA sınır değeri standardizasyonuna ihtiyaç vardır.

AARD hastalarında yüksek titrede ANA pozitifliğinin, düşük titrede olmasına göre klinik ile daha ilişkili olduğu bulunmuştur. Ancak DFS paterninin titresinin AARD'li ve sağlıklı kişileri ayırt etmede önemli olmadığı vurgulanmıştır (146).

Muro ve arkadaşları 500 sistemik otoimmün romatizmal hastalık (SARD) tanılı hastada IIF ve IB ile yaptığı çalışmada 22 (%4.4) hastada anti-DFS70 antikor saptamış. Bu 22 hastanın 19'u ELISA ile hastalıkla ilişkili başka antikorlar da taşıyormuş. Sonuçta izole anti-DFS70 antikor olan SARD hasta sayısının az

olduğu ancak izole anti-DFS70 antikor pozitifliğinin SARD'ı dışlamak için kullanılabileceği sonucuna varmışlardır (63). Bu çalışmada SARD grubu içine romatoid artrit ve morfea hastaları da dahil edilmiştir, bizim çalışmamızda ise AARD grubu SLE, SSc, SS, MCTD ve PM / DM olarak belirlenmiştir.

2013'te IIF yöntemi 100 DFS paterni saptanan, 100 tane saptanmayan hasta üzerinde yapılan bir çalışmada; ilk gruptaki hastaların %91'i CIA ile anti-DFS70 pozitif; diğer grubunsa sadece %3'ü pozitif bulunmuştur. DFS paterni olanların sadece %12'sinde, DFS paterni olup CIA pozitiflerinse %13.4'ünde AARD saptanmıştır. Anti-DFS70 antikoru varlığının; AARD'yi dışlayamasa da, diğer paternlerde daha az bulunduğundan, ANA test algoritmasına eklenmesi gerektiği sonucuna varmışlardır (156). Çalışmamızın dizaynı gereği hasta tanılarına göre gruplama yapılmamış olduğu için tanıya göre anti-DFS70 antikor verisi elde edilemedi. Rutinde kullandığımız IIF ve LIA test sonuçlarına göre gruplandırma yaptığımız için, hastaların tanılarına retrospektif olarak bakıldı. 479 hastanın 34'üne (%7.1) AARD tanısı konduğu, kalan 445 örneğin de eklemle ilişkili semptomu olan hastalardan oluştuğu ve çeşitli ön tanılarla IIF ve LIA testlerinin istendiği görüldü. IIF ile DFS paterni saptanan 329 hastanın 20'si (%6.1) AARD tanısı almıştır. Benzer şekilde Türkiye'de yapılan DFS paterni olan 200 hastanın dahil edildiği bir çalışmada, hataların %13'ünde SARD olduğu belirtilmiştir (158). Bu çalışmada hastaların tanısı retrospektif olarak bizim çalışmamız ile benzer şekilde taranmıştır.

Yapılan çeşitli çalışmalarda sağlıklı bireylerde anti-DFS70 antikoru %4.2 ile % 21.6 arasında bulunmuştur. Yamada ve arkadaşları anti-DFS70 antikoru ELISA ile sağlıklı kişilerde %21.6 (8/37) bulmuşlar; Mariz ve arkadaşları (9) 918 sağlıklı kişiden 118'inde (%12.9) ANA pozitif, bunların da 39'u (%33.1), toplam sayınınsa %4.2'si DFS paternindeymiş (IIF), Mercado ve arkadaşları sağlıklı kişilerde %17.4 (4/23) bulmuş (IIF, ELISA, WB, CIA); (5,9,62). Watanabe ve arkadaşları 597 sağlıklı çalışandan %12'sini (69/597) pozitif bulmuş (IIF, WB, ELISA); Mahler ve arkadaşları 124 sağlıklı kişinin 11'inde (%8.9) pozitiflik bulmuşlar (ELISA); Ayaki ve arkadaşları 650 kan bankası başvurusundan 35'ini (%5.4) pozitif bulmuşlar (ELISA) (8,10,158). Anti-DFS70 antikor pozitiflik oranları ülkeler arasında da farklılıklar göstermektedir. Danimarkalı kan

donörlerinde anti-DFS70 antikoru %2 (5/249) (IIF, CLIA), US kan donörlerinde CIA ile %8.5, Avrupalı kan donörlerinde %1.7-%2.9 arasındadır (159,160). Araştırmalarımıza göre Türkiye’de sağlıklı bireylerde anti-DFS70 antikor pozitifliğinin araştırıldığı bir çalışma bulunamamıştır.

Merkezimize gönderilen rutin örneklerde 2016 yılında yapılan bir çalışmada 1786 rutin ANA IIF tarama hastasının 90’ında (%5.0) DFS paterni saptanmış, bunların arasından seçilen 74 tanesi ELISA, 20 tanesi LIA ile çalışılmıştır. ELISA çalışılan 74 hastanın 62’sinde (%83.8); LIA çalışılan 20 hastanın 13’ünde (%65.0) anti-DFS70 antikoru pozitif bulunmuştur. Bu 74 hastanın 68’i (%91.9) AARD tanısı almamıştı, kalan 6’sı (%8.1) AARD tanısı almıştır (161). Bu çalışmada AARD hastalarında elde ettiğimiz anti-DFS70 antikor pozitiflik oranı şimdiki çalışmamızda elde ettiğimiz değerle benzerlik göstermektedir.

Sperotto ve arkadaşları 2016 yılında 261 sağlıklı çocukta 4’ünde (%1.5) anti-DFS70 pozitif bulmuş (IIF, CIA); Schmeling ve arkadaşları 145 sağlıklı çocukta %2.1 anti-DFS70 antikoru bulmuş (145,162). Bizim çalışmamızda IIF’de DFS paterni ve LIA’da DFS70 antikoru saptanan 54 çocuktan 3’ü (%5.6) AARD tanısı almıştır. Örnek sayımız diğer iki çalışmadakinden daha azdır. Çocuk hastalarda elde ettiğimiz bu oran yetişkinlerle benzerlik göstermektedir ancak örnek sayımız az olduğundan gerçek oranı yansıtmayabileceği düşünülmektedir.

Watanabe ve arkadaşlarının çalışmasında DFS paterni gözlenen ve IB ile anti-DFS70 antikoru saptanan 64 serumun 57’si ELISA ile pozitif bulunmuş (duyarlılık %89). Kalan 533 serumdan 25’i yanlış pozitif çıkmış (özgüllük %95). IIF, IB, ELISA arasında farklı sonuçlar çıkmasının nedeni kullanılan antijenin yapısı (nativ/denatüre) veya kaynağı (sellüler/rekombinant) olabileceği vurgulanmıştır (8). Gerçekten de farklı çalışmalarda kullanılan farklı yöntemler, dolayısıyla farklı antijenik yapılar nedeniyle bu kadar geniş aralıklarda sonuçlar elde ediliyor olabilir. Öyle ki konfirmasyonda kullanılan testlerde antijenin tamamı mı yoksa majör antijenik bölgesinin mi kullanılacağı, rekombinant üretim tekniklerinden hangisinin kullanılacağı (*E.coli*, Baculo virüs, memeli hücreleri), analitik duyarlılık-özgüllük aralıkları ve cut-off değerlerindeki belirsizlik standardizasyonda sorunlar oluşturmaktadır (68). Bizim çalışmamızda LIA,

ELISA ve CytoBead yöntemindeki Dotlar olmak üzere üç doğrulama yöntemi kullanılmıştır. Laboratuvarımızda rutin uygulamada IIF ile DFS paterni saptanan örneklerin, ikinci basamak doğrulama testi olan LIA ile anti-DFS70 antikoru araştırılmaktadır. LIA altın standart kabul edilerek CytoBead Dot testinin duyarlılığı (% 84.7) ve özgüllüğü (% 100) , ELISA'ya göre (duyarlılık %74.3, özgüllük %92.1) daha yüksek bulunmuştur.

HEp-2 IIF yöntemi ile DFS paterninin tanınması subjektif olduğundan ve deneyim gerektirdiğinden bu dezavantajları aşmak için yeni IIF tanı yöntemleri geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bunlardan biri olan immünoadsorbsiyon yönteminde hasta serumu rekombinant DFS70 antijeni içeren bir solüsyon ile muamele öncesi ve sonrası standart HEp-2 hücrelerinin substrat olarak kullanıldığı IIF yöntemi ile çalışılmıştır. Hasta serumundaki anti-DFS70 antikoru, eklenen rekombinant antijen ile kompleks oluşturmakta böylece HEp-2 hücrelerindeki antijenlerine bağlanamamaktadır. Sonuçta standart IIF ile yoğun ince benekli görüntüsü alınırken, immünoadsorbsiyon sonrası negatif sonuç alınmaktadır. Bu yöntem ile IIF yönteminin özgüllüğü arttırılmaya çalışılmıştır (163). Yeni geliştirilen bir diğer yöntemde ise HEp-2 ELITE/DFS70 KO (knock out) adlı bir substratı kullanılmıştır. Bu yöntemde genetik mühendisliğince elde edilmiş DFS70 antijeni içermeyen yeni bir HEp-2 hücresi bulunmaktadır. Konvansiyonel HEp-2 hücreleri ile bu yeni HEp-2 hücreleri 1:9 oranında olacak şekilde slaytlara sabitlenmiştir. Bu yeni kit ile hem monospesifik DFS paterni, hem de DFS ile kombine paternler ayırt edilebilmektedir. Örneğin monospesifik DFS70 antikoru içeren bir örnekte, hücre nükleuslarının %10'u konvansiyonel HEp-2 hücreleri ile yoğun ince benekli paternde floresan ışıma verirken, %90'ı DFS-70 KO hücreleri ile parlaklık vermeyecektir. Bu kit diğer tüm paternleri konvansiyonel görünümüyle gösterebilmektedir (68). Bu yeni yöntemin düşük titrede de olsa, başka paternlerle birlikte de olsa DFS paternini tanımada etkin olduğu bulunmuş, ancak mitotik paternlerle ilgili az sayıda örnek çalışıldığından bu konuda daha ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu bildirilmiştir. Bu yöntemin ikinci basamak antikor varlığını doğrulama testi gerektirmediği ve bu sayede umut vadeden bir yöntem olduğu öne sürülmüştür (151).

Anti-DFS70 antikorunun normal popülasyonda yüksek prevalanslı oluşu, özel bir hasta grubuyla kanıtlanmış bir ilişkisinin olmaması ve AARD ile arasında negatif korelasyon oluşu nedeniyle DFS70 paterninin özgüllüğü yüksek bir yöntemle doğrulanması gerektiği belirtilmiştir (68). Doğrulama için bugüne kadar en çok ELISA, WB, LIA, DIA, CIA gibi yöntemler kullanılmış olsa da, son zamanlarda immunoabsorbsiyon, modifiye edilmiş IIF ve microbead immunoassay (MIA) gibi yeni yöntemler de kullanıma girmiştir. Anılan son iki sistem tek seferde birden fazla hedefi tanımlayabilen yeni nesil sistemler olan multiparametrik yöntemlerden olup, monoparametrik sistemlere göre daha maliyet ve zaman/etkin olmalarıyla ön plana çıkmaktadır (94). Multiparametrik yöntemler, refleks test sistemindeki tarama sonrası doğrulama testine ihtiyaç olmadan, hedefi tek basamakta saptayabilen testlerdir. Geleneksel iki basamaklı refleks test stratejisine göre tanıya daha hızlı ulaşmayı sağlayabilmektedir (118,164). Bu multiparametrik yöntemlerden biri CytoBead (GA Generic Assays GmbH [Dahlewitz/Berlin/Almanya]) teknolojisidir. Bu teknoloji ile bugüne kadar merkezinde HEP-2 hücrelerinin, etrafında da CENP-B, SS/B, RNP/Sm, Sm, Scl-70, dsDNA, SS/A-52, SS/A-60 antijenlerinin bulunduğu dotlar (antijen içeren mikrobuncuk), ANCA için ortasında granülositlerin, etrafında da MPO, PR3, GBM ve dsDNA antijenlerini içeren dotlar ve ortasında özefagus dokusu etrafında da DG, TG2, anti-IgA antijenlerini içeren dotlar olan slaytlar üretilmiştir. Bizim çalışmamızda kullandığımız kit multiparametrik bir yöntem değildir; ancak merkezinde HEP-2 hücreleri, hemen yan tarafında da DFS70 antijeni içeren dotların olduğu modifiye edilmiş bir IIF yöntemidir. Böylece tek bir çalışma ile hem IIF'deki görüntü incelenerek tarama, hem de dotlar ile antijene spesifik antikor varlığına yönelik doğrulama tek basamakta gerçekleştirilmiş oldu.

IIF yönteminin SS-A antijenini yeterince eksprese etmediği durumlarda CytoBead yönteminin etkili olduğu belirtilmiştir (102,139). Scholz ve arkadaşları CytoBead ile yaptıkları çalışmada IIF ile negatif bulunan 4 (%1.5) RA ve SS sendromlu bir hastanın patern negatif olmasına rağmen CytoBead ile anti-SSA ve anti-CENP-B antijenlerinin tespit edilebildiğinin ve sonucun yanlış negatif olarak yorumlanmasının önüne geçildiğinden bahsetmiştir (105).

Çalışmamızda kullandığımız CytoBead HEp-2 testi altın standart olan IIF testi ile karşılaştırıldığında duyarlılığı % 54.4 (179/329); özgüllüğü % 94.0 (141/150) olarak bulunmuştur. HEp-2010 hücrelerinin substrat olarak kullanıldığı IIF yönteminde farklı olarak CytoBead HEp-2 testinde HEp-2 hücreleri kullanılmıştır. Bu hücrelerde duyarlılığın düşük bulunmasının nedeni farklı substrat kullanılması olabilir. Bununla birlikte kullanılan antijenin kitler arası farklılık göstermesi, fiksasyon metodu, FITC konjugat spesifitesi, floresan madde/protein oranı, anti-human IgG spesifitesi gibi nedenlerden de kaynaklanmış olabilir. Kombine paternler varlığında DFS paterni maskelenebilmektedir. Çalışmamızda IIF yöntemi ile saptanan 24 kombine paternin 14'ünde (%58.3) CytoBead HEp2 testi ile yoğun ince benekli paterni hiç saptanamazken; 10'unda CytoBead HEp2 testinde yoğun ince benekli paterni olmaksızın sadece yanındaki patern tanımlandı. IIF'de 16 nükleer noktalanma olan örneğin 15'i (%93.8); 6 nükleolar patern gösteren örneğin 4'ü (%66.7); sitoplazmik boyanma gösteren iki örneğin 1'i (%50.0) CytoBead HEp-2 substratı ile pozitif bulundu. Çalışmamızda kombine patern içeren örnek sayımız azdır. İstatistiksel olarak anlamlı bulunmamakla birlikte CytoBead HEp-2 substratının DFS paternine göre, diğer paternleri tanımda daha iyi olduğu düşünülmüştür. Elde ettiğimiz verilerden yola çıkarak CytoBead HEp-2 substratının DFS paterni dışındaki diğer paternleri tanımlamadaki etkinliğinin ileri çalışmalarla araştırılması gerektiğini düşünmekteyiz.

LIA altın standart kabul edilerek CytoBead Dot testinin duyarlılığı % 84.7 (372/439); özgüllüğü % 100 (40/40) bulunmuştur. CytoBead Dot doğrulamada güvenilir ve etkin olduğu gözlenmiştir.

Kullandığımız bu yöntemde HEp-2 substratında özellikle beklenen duyarlılık değerine ulaşılmasa da Dot varlığı sayesinde hem duyarlılık hem de özgüllük yükseltilmiştir. CytoBead HEp-2 testi araştırma amaçlı üretilmiş, henüz ticari olarak kullanıma sunulmamış bir kittir. IIF yöntemiyle DFS paterninde olup iki doğrulama yönteminde de (LIA (+) ELISA (+)) anti-DFS70 antikoru pozitif saptanan 106 örnekte CytoBead HEp-2 testi sadece 10'unu (%9.4) pozitif olarak bulabilmiştir. CytoBead Dot testi ise 105'ini (%99.1) pozitif olarak bularak oldukça yüksek bir oran vermiştir. HEp-2 substratı beklenen duyarlılığı göstermese de, Dot varlığı sayesinde 106 pozitif örneğin sadece biri negatif olarak sonuç vermiştir.

CytoBead Dot testi bir doğrulama yöntemi olarak, ELISA ve LIA ile uyumlu bulunmuştur (uyum sırasıyla %85.6, %86.0).

Sonuç olarak, CytoBead HEp-2 + DFS70-Dot testi ile tek bir işlemle hem tarama hem de doğrulama yapılabilmesi, hem zaman tasarrufu hem de maliyet etkinlik sağlamıştır. Öyle ki sadece laboratuvar açısından düşünecek olursak bir hasta için IIF ve LIA testinin birlikte maliyeti, CytoBead birim maliyetinden yaklaşık 2.9 kat daha fazladır. Buna bir de azalan hasta başvuru sayısının yaratacağı maliyet tasarrufu eklendiğinde daha iyi bir sonuç elde edilebilecektir. HEp-2 hücre substratının geliştirilmesi durumunda, CytoBead HEp-2 + DFS70-Dot testinin yakın bir gelecekte rutin tanıda yerini alabileceği düşünülmektedir.



6. SONUÇLAR

Çalışmamızda rutin uygulamada ANA taramasında altın standart olarak kabul gören ANA IIF testinde yoğun ince benekli çıkan örnekler, doğrulama yöntemi olarak LIA testi ile çalışılmış ve IIF (+), LIA (+); IIF (+) LIA (-); IIF (-) LIA(+); IIF (-) LIA (-) olmak üzere dört gruba ayrılmıştır. Ardından hem tarama hem de doğrulamayı tek basamakta yapmayı amaçlayan araştırma amaçlı yeni bir ticari test olan CytoBead HEp-2 DFS70 testi ile çalışılmış ve sonuçları karşılaştırma yapmak üzere kaydedilmiştir. Ayrıca bu dört gruptan belli sayıda hastayı içerecek şekilde ELISA testi ile de DFS70 antikoru aranmış ve testler arasında uyumluluk araştırması amaçlanmıştır.

IIF ile DFS paterni saptanan 329 örneğin 309'unda (%93.9) LIA ile anti-DFS70 antikoru saptandı. Bu örneklerin sadece 58 (%17.6) tanesi 1/320 ve üzeri titrede, kalan 271'i (%82.4) düşük titrede (1/100) pozitif saptandı.

IIF altın standart kabul edildiğinde CytoBeadHEp-2 testinin sensitivitesi % 54.4 (179/329); spesifitesi % 94.0 (141/150); bulundu. HEp-2010 hücrelerinin substrat olarak kullanıldığı IIF yönteminden farklı olarak CytoBead HEp-2 testinde HEp-2 hücreleri kullanılmıştır. Bu hücrelerde duyarlılığın düşük bulunmasının nedeninin kitler arası farklılıklardan kaynaklanmış olabileceği düşünüldü.

CytoBead ANA DFS70 adlı yeni kitte merkezinde HEp-2 hücreleri, hemen yan tarafında da DFS70 antijeni içeren dotlar sabitlendiğinden tek bir çalışma ile hem IIF'deki görüntü ile tarama, hem de Dotlar ile antijene spesifik antikor varlığı araştırılarak tarama ve doğrulama tek basamakta gerçekleştirilmiş oldu.

LIA altın standart kabul edildiğinde CytoBead Dot testinin sensitivitesi % 84.7 (372/439); spesifitesi % 100 (40/40) bulunmuştur.

479 örneğin içinden seçilmiş 264 tanesinde ELISA DFS70 antikoru araştırıldı.

IIF(+), LIA(+) ve CytoBead testinde DFS paterni olmayan 102 örneğin 96'sı (%94.1); IIF(-), LIA (+) 113 örneğin 62'si (%54.9) ELISA ile anti-DFS70 antikoru pozitif iken; IIF(+), LIA (-) 18 örneğin 16'sı (%88.9) negatif bulundu.

Kontrol grubunu oluşturan IIF (-), LIA (-) 20 örneğin ise sadece 1'i (%5) ELISA ile anti-DFS70 antikoru pozitif bulundu.

IIF (+) LIA (+) ELISA (+) olan 106 örnekte CytoBead HEp-2+Dot testi ile 105'i (%99.1) pozitif olarak bulundu.

LIA ile anti-DFS70 antikoru bulunan 439 örneğin 63'ü dsDNA birliktelik gösterdi. Anti-DFS antikoru en sık eşlik eden ENA dsDNA olarak bulundu.

Tezin zayıf yönü olarak CytoBead HEp-2 hücreleri sadece DFS paterni açısından araştırılmış olup, diğer ANA paternleri açısından incelenmemiştir. CytoBead kitinde substrat olarak kullanılan HEp-2 hücrelerinin geliştirilmesi gerektiği ve ileri çalışmalarla diğer ANA paternleri açısından da değerlendirilmesi gerektiği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, CytoBead ANA DFS kiti ile IIF yöntemi ile hem yoğun ince benekli patern tanımlanabilmekte, hem de tarama ve doğrulama tek basamakta yapılabilir. IIF ve LIA testinin birlikte maliyeti, CytoBead birim maliyetinden yaklaşık 2.9 kat daha fazla bulunmuştur. Bu yöntem tarama ve doğrulamayı tek basamakta yapabilmesi, bu sayede hasta başvuru sayısında azalmaya neden olması, tanıda zamandan tasarruf sağlaması ve daha maliyet-etkin olması özellikleriyle ön plana çıkmaktadır. CytoBead HEp-2 hücre substratının geliştirilmesi ile yakın bir gelecekte rutin tanıda yerini alabileceği düşünülmektedir.

7. ÖZET

Klinik Örneklerde DFS Paterninin ve Anti-DFS70 Antikorumun Araştırılması

ANA sistemik otoimmün romatizmal hastalıklar için tanı, takip ve prognozda yol göstericidir. ANA tanımlanmasında IIF yöntemi altın standart yöntem olup, tarama amaçlı kullanılmaktadır. Hücrenin hangi yapısına karşı antikor olduğu ise doğrulama testleri ile belirlenmektedir.

DFS paterni de dahil olmak üzere ANA'nın duyarlı bir tarama testi sonrası yüksek özgüllüğe sahip bir doğrulama testi ile doğrulanması önerilmektedir. Bu yaklaşıma refleks test yöntemi adı verilmektedir. Anti-DFS70 antikor varlığında doğrulamada sıklıkla ELISA, LIA gibi yöntemler kullanılmakla birlikte, son yıllarda hem DFS paterninin tanınmasındaki zorlukların önüne geçmek için hem de doğrulamanın tek basamakta yapılabilmesi için yeni IIF yöntemleri geliştirilmeye çalışılmıştır.

Biz bu çalışmada ortada HEp-2 hücresi, yanında bulunan DFS70 antijeni içeren Dotların bir araya getirilmesiyle oluşan CytoBead (Generic Assays, Germany) yöntemini, rutin iki basamaklı test stratejisi ile karşılaştırdık. Çalışmamızda rutin uygulamada ANA IIF testinde yoğun ince benekli çıkan örnekler, doğrulama yöntemi olarak LIA testi ile çalışılmıştır. IIF ve LIA sonuçlarına göre dört gruba ayrılan 479 örnek, CytoBead IIF yöntemi ile, bunların arasından seçilen 264 örnek ELISA testi ile çalışılmıştır.

IIF yöntemi ile DFS paterni saptanan 329 örneğin sadece %54.4'ü CytoBead HEp-2 testi ile pozitif saptanmıştır. IIF (+) LIA (+) ELISA (+) olan 106 örnekte CytoBead HEp-2+Dot testi 105'ini (%99.1) pozitif olarak bularak oldukça yüksek bir oran vermiştir.

Sonuç olarak, CytoBead IIF yöntemi ile hem yoğun ince benekli patern tanımlanabilmekte, hem de tarama ve doğrulama tek basamakta yapılabilmektedir. Böylelikle daha maliyet etkin bir yaklaşım sunmaktadır. CytoBead HEp-2 hücre substratının geliştirilmesi ile yakın bir gelecekte rutin tanıda yerini alabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Anti-DFS70, AARD, CytoBead



8. ABSTRACT

Investigation of DFS Pattern and Anti-DFS70 Antibody in Clinical Samples

ANA is a guide in the diagnosis, follow-up and prognosis of systemic autoimmune rheumatic diseases (SARD). The IIF method is the gold standard method for the identification of ANA and is used for screening purposes. The nature of the antibody against the cell is determined by confirmatory tests.

It is recommended that the ANA, including the DFS pattern, should be verified with a highly specific confirmatory test after a sensitive screening test. This approach is called reflex test method. Although methods such as ELISA and LIA are often used to confirm the presence of anti-DFS70 antibodies, new IIF methods have been developed in recent years in order to prevent the difficulties in the recognition of the DFS pattern and to carry out the confirmatory test in a single step.

In this study, we compared the CytoBead (Generic Assays, Germany) method with the HEp-2 cell and the Dot with DFS70 antigen, to the routine two-step test strategy. In our study, the samples which were DFS pattern in ANA IIF test in routine practice were studied with LIA test as a confirmatory method. Four hundred seventy nine samples were divided into four groups according to the results of IIF and LIA. They were studied by CytoBead IIF method and 264 among them were studied by ELISA.

Only 54.4% of 329 samples with DFS pattern determined by IIF method were found positive by CytoBead HEp-2 test. In 106 samples with IIF (+) LIA (+) ELISA (+), CytoBead HEp-2 + Dot test found 105 (99.1%) positive and gave a very high ratio.

Conclusively, both the scanning of DFS pattern the and verification of anti-DFS70 antibody and can be done in one step With the CytoBead IIF method. Thus, it offers a more cost-effective approach. With the development of CytoBead HEp-2 cell substrate it is thought that it will be able to take its place in routine diagnosis in the near future.

Key Words: Anti-DFS70, AARD, CytoBead

10. KAYNAKLAR

1. American College of Rheumatology, American College of Rheumatology position statement: methodology of testing for antinuclear antibodies. 2009; 1-3. <http://www.rheumatology.org/>
2. Ochs RL, Stein TW Jr, Peebles CL, Gittes RF, Tan EM. Autoantibodies in interstitial cystitis. *J Urol* 1994 ;151(3):587-92.
3. Singh DP, Ohguro N, Chylack LT Jr, Shinohara T. Lens epithelium-derived growth factor: increased resistance to thermal and oxidative stresses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40(7):1444-51.
4. Ochs RL, Muro Y, Si Y, Ge H, Chan EKL, Tan EM. Autoantibodies to DFS 70 kd/transcription coactivator p75 in atopic dermatitis and other conditions. *J. Allergy Clin Immunol* 2000; 105, 1211–20.
5. Yamada K, Senju S, Shinohara T, Nakatsura T, Murata Y, Ishihara M, et al. Humoral immune response directed against LEDGF in patients with VKH. *Immunol Lett* 2001; 78:161–8.
6. Daniels T, Zhang J, Gutierrez I, Elliot ML, Yamada B, Heeb MJ, et al. Antinuclear autoantibodies in prostate cancer: immunity to LEDGF/p75, a survival protein highly expressed in prostate tumors and cleaved during apoptosis. *Prostate* 2005; 62(1):14-26.
7. Dellavance A, Viana VS, Leon EP, Bonfa ES, Andrade LE, Leser PG. The clinical spectrum of antinuclear antibodies associated with the nuclear dense fine speckled immunofluorescence pattern. *J Rheumatol* 2005; 32(11):2144–9.
8. Watanabe A, Kodera M, Sugiura K, Usuda T, Tan EM, Takasaki Y. Anti-DFS70 antibodies in 597 healthy hospital workers. *Arthritis Rheum* 2004; 50:892–900.
9. Mariz H, Sato EI, Barbosa SH, Rodrigues SH, Dellavance A, Andrade LEC. Pattern on the antinuclear antibody-Hep-2 test is a critical parameter for discriminating antinuclear antibody-positive healthy individuals and patients with autoimmune rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 2011; 63:191-200.

10. Mahler M, Parker T, Peebles CL, Andrade LE, Swart A, Carbone Y, et al. Anti-DFS70/LEDGF antibodies are more prevalent in healthy individuals compared to patients with systemic autoimmune rheumatic diseases. *J Rheumatol* 2012; 39;2104-10.
11. Infantino M, Meacci F, Grossi V, Manfredi M, Gobbi FL, Sarzi-Puttini P, et al. The clinical impact of Anti-DFS70 antibodies in undifferentiated connective tissue disease: case reports and a review of the literature. *Immunol Res* 2016; DOI 10.1007/s12026-016-8836-4.
12. Dey ID, Isenberg DA. Autoimmune Disease: Diagnosis. (July 2012) Autoimmune Disease: Diagnosis. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
13. Us D. Temel imm noloji ve seroloji. Hipokrat Yayınevi. Ankara. 2016.s.76.
14. Delves P.J, Martin S.J, Burton D.R, Roitt I.M. Roitt's Essential Immunology. 12th ed. 2011.p.243.
15. Murray P.R, Rosenthal K.S, Pfaller M.A, Tıbbi Mikrobiyoloji, Hücresel İmmün Yanıt. Editör: Ba ustao lu A.C. 6.baskı. 2010.s.119-21.
16. Abbas A.K, Lichtman A.H, Pillai S. Temel immünoloji, İmmün sistemin işlev ve bozuklukları. Editör: Camcıo lu Y, Deniz G. 4.baskı. 2015.p.178,184-5.
17. Rosenblum M.D, Kelly A, Remedios K.A, Abbas A.K. Mechanisms of human autoimmunity. *J Clin Invest* 2015; 125(6):2228–33.
18. Domeier P.P, Schell S.L, Rahman Z.S.M. Spontaneous germinal centers and autoimmunity. *Autoimmunity* 2017; 50(1):4–18.
19. Ghoreschi K , Laurence A, Yang X.P, Tato C.M, McGeachy M.J, Konkel J. et al. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-  signalling. *Nature* 2010; 467(7318):967–71.
20. Vandenbroeck K. Cytokine gene polymorphisms and human autoimmune disease in the era of genome-wide association studies. *J Interferon Cytokine Res* 2012; 32(4):139–51.
21. Serafini B, Rosicarelli B, Franciotta D, Magliozzi R, Reynolds R, Cinqueet P. et al. Dysregulated Epstein-Barr vir s infection in the multiple sclerosis brain. *J Exp Med* 2007; 204(12):2899–912.

22. Mills KH. TLR-dependent T cell activation in autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2011;11(12):807–22.
23. Kuhn A, Wenzel J, Weyd H. Photosensitivity, apoptosis, and cytokines in the pathogenesis of lupus erythematosus: a critical review. *Clin Rev Allergy Immunol* 2014; 47(2):148–162.).
24. Nagpal S, Na S, Rathnachalam R. Non calcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocr Rev* 2005; 26: 662-87.
25. Puszczewicz M, Białkowska-Puszczewicz G, Majewski D. Znaczenie autooprzeciwciał w rozpoznaniu chorób reumatycznych. *Post Nauk Med* 2012; 2:156-63.
26. Knip M, Siljander H. The role of the intestinal microbiota in type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 2016; 12:154–67.
27. Smith PM, Michael R, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly-YM, et al. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science* 2013; 341:569–73.
28. Mazmanian SK, Round JL, Kasper DL. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature* 2008; 453:620–5.
29. Neff CP, Rhodes ME, Arnolds KL, Collins CB, Donnelly J, Nusbacher N, et al. Diverse intestinal bacteria contain putative zwitterionic capsular polysaccharides with anti-inflammatory properties. *Cell Host Microbe* 2016; 20:535–47.
30. Bach JF. The hygiene hypothesis in autoimmunity: the role of pathogens and commensals. *Nat Rev Immunol* 2018; 18:105–20.
31. Ball TM, Castro-Rodriguez JA, Griffith KA, Holberg CJ, Martinez FD, Wright AL. Siblings, day-care attendance, and the risk of asthma and wheezing during childhood. *N Engl J Med* 2000; 343:538–43.
32. Liacopoulos P, Ben-Efraim S. Antigenic competition. *Prog Allergy* 18, 1975; p.97–204.
33. Pross HF, Eiding D. Antigenic competition: a review of nonspecific antigen-induced suppression. *Adv. Immunol* 18, 1974; 133–68.

34. Nieradko-Iwanicka B, Pekar J, Skolarczyk J. The significance of anti-DFS70 antibodies in the diagnosis of autoimmune disorders. *Fam Med Prim Care Rev* 2017; 19(2):173–6.
35. Hargraves M, Richmond H, Morton R. Presentation of two bone marrow components, the tact cell and the LE cell. *Mayo Clin Proc* 1948; 27:25-8.
36. Tıbbi mikrobiyoloji uzmanları için, Klinik örnekten sonuç raporuna uygulama rehberi, Otoantikörlerin laboratuvar tanısı rehberi. Klimud, 2015.
37. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; 40(9):1725.
38. Petri M, Orbai AM, Alarcón GS, Gordon C, Merrill JT, Fortin PR, et al. Derivation and validation of the systemic lupus international collaborating clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2012; 64(8):2677–86.
39. Hochberg MC, Boyd RE, Ahearn JM, Arnett FC, Bias WB, Provost TT, et al. Systemic lupus erythematosus: a review of clinico-laboratory features and immunogenetic markers in 150 patients with emphasis on demographic subsets. *Medicine (Baltimore)* 1985; 64(5):285–95.
40. Koh WH, Fong KY, Boey ML, Feng PH. Systemic lupus erythematosus in 61 Oriental males. A study of clinical and laboratory manifestations. *Br J Rheumatol* 1994; 33(4):339–42.
41. Ginsburg WW, Conn DL, Bunch TW, McDuffie FC. Comparison of clinical and serologic markers in systemic lupus erythematosus and overlap syndrome: a review of 247 patients. *J Rheumatol* 1983; 10(2):235–41.
42. Schur PH, Sandson J. Immunologic factors and clinical activity in systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 1968; 278(10):533–8.
43. Alba P, Bento L, Cuadrado MJ, Karim Y, Tungekar MF, Abbs I, et al. Anti-dsDNA, anti-Sm antibodies, and the lupus anticoagulant: significant factors associated with lupus nephritis. *Ann Rheum Dis* 2003; 62(6):556–60.
44. Homma M, Mimori T, Takeda Y, Akama H, Yoshida T, Ogasawara T, et al. Autoantibodies to the Sm antigen: immunological approach to clinical

- aspects of systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol Suppl* 1987; 14(13):188–93.
45. Didier K, Bolko L, Giusti D, Toquet S, Robbins A, Antonicelli F. Autoantibodies associated with connective tissue diseases: what meaning for clinicians? *Front Immunol* 2018; 9:541.
46. Mulli JC, Cruchaud A. Immunoreactivity to nuclear antigens in systemic lupus erythematosus with or without nephritis, and in other connective tissue diseases, with particular reference to the RNA-protein antigen. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1977; 53(3):279–89.
47. Sulcebe G, Morcka K. Diagnostic and prognostic significance of different antinuclear antibodies in more than 1000 consecutive Albanian patients with rheumatic diseases. *Clin Exp Rheumatol* 1992; 10(3):255–61.
48. Schur PH, DeAngelis D, Jackson JM. Immunological detection of nucleic acids and antibodies to nucleic acids and nuclear antigens by counterimmunoelectrophoresis. *Clin Exp Immunol* 1974; 17(1):209–18.
49. Theander E, Jonsson R, Sjöström B, Brokstad K, Olsson P, Henriksson G. Prediction of Sjögren's syndrome years before diagnosis and identification of patients with early onset and severe disease course by autoantibody profiling. *Arthritis Rheumatol* 2015; 67(9):2427–36.
50. Shiboski SC, Shiboski CH, Criswell LA, Baer AN, S. Challacombe S, Lanfranchi H, et al. American College of Rheumatology classification criteria for Sjögren's syndrome: a data-driven expert consensus approach in the Sjögren's International Collaborative Clinical Alliance Cohort. *Arthritis Care Res.* 2012; 64:475–87.
51. Salazar GA, Assassi S, Wigley F, Hummers L, Varga J, Hinchcliff M, et al. Antinuclear antibody-negative systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum* 2015; 44(6):680–6.
52. Schneeberger D, Tyndall A, Kay J, Søndergaard KH, Carreira PE, Morgiel E, et al. Systemic sclerosis without antinuclear antibodies or Raynaud's phenomenon: a multicentre study in the prospective EULAR scleroderma trials and research (EUSTAR) database. *Rheumatology (Oxford)* 2013; 52(3):560–7.

53. Liaskos C, Marou E, Simopoulou T, Barmakoudi M, Efthymiou G, Scheper T, et al. Disease-related autoantibody profile in patients with systemic sclerosis. *Autoimmunity* 2017; 50(7):414–21.
54. van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis* 2013; 72:1747–55.
55. Reveille JD, Solomon DH; American College of Rheumatology Ad Hoc Committee of Immunologic Testing Guidelines. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: anticentromere, Scl-70, and nucleolar antibodies. *Arthritis Rheum* 2003; 49(3):399–412.
56. Graf SW, Hakendorf P, Lester S, Patterson K, Walker JG, Smith MD, et al. South Australian Scleroderma Register: autoantibodies as predictive biomarkers of phenotype and outcome. *Int J Rheum Dis* 2012; 15(1):102–9.
57. Walker UA, Tyndall A, Czirják L, Denton C, Farge-Bancel D, Kowal-Bielecka O, et al. Clinical risk assessment of organ manifestations in systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials and Research group database. *Ann Rheum Dis* 2007; 66(6):754–63.
58. Sharp GC, Irvin WS, Tan EM, Gould RG, Holman HR. Mixed connective tissue disease-an apparently distinct rheumatic disease syndrome associated with a specific antibody to an extractable nuclear antigen (ENA). *Am J Med* 1972; 52:148.
59. Bennett RM, O'Connell DJ. Mixed connective tissue disease: a clinicopathologic study of 20 cases. *Semin Arthritis Rheum* 1980; 10(1):25–51.
60. Bennett RM. Mixed connective tissue disease and other overlap syndromes. In: *Textbook of Rheumatology*, 7th, Kelley W, Harris EDJ, Ruddy SH, Sledge G (Eds), WB Saunders, Philadelphia 2004. p.1241.
61. ICAP International Consensus on Antinuclear Antibody Pattern, Nomenclature and classification trees. Available at: <https://www.anapatterns.org/trees-full.php>

62. Vazquez-Del Mercado M, Gomez-Banuelos E, Navarro-Hernandez RE, Pizano-Martinez O, Saldana-Millan A, Chavarria-Avila E, et al. Detection of autoantibodies to DFS70/LEDGFp75 in Mexican Hispanics using multiple complementary assay platforms. *Auto Immun Highlights* 2017; 8,1.
63. Muro Y, Sugiura K, Morita Y, Tomita Y. High concomitance of disease marker autoantibodies in anti-DFS70/LEDGF autoantibody- positive patients with autoimmune rheumatic disease. *Lupus* 2008;17:171–6.
64. Voigt J, Krause C, Rohwäder E, Saschenbrecker S, Hahn M, Danckwardt M, et al. Automated indirect immunofluorescence evaluation of antinuclear autoantibodies on HEp-2 cells. *Clin Dev Immunol* 2012:651058.
65. Wiik AS. Appropriateness of autoantibody testing in clinical medicine. *Clin Chim Acta* 2003; 333:177–80.
66. Fenger M, Wiik A, Hoier-Madsen M, Lykkegaard JJ, Rozenfeld T, Hansen MS, et al. Detection of antinuclear antibodies by solidphase immunoassays and immunofluorescence analysis. *Clin Chem* 2004; 50:2141–7.
67. Tonutti E, Bizzaro N, Morozzi G, Radice A, Cinquanta L, Villalta D, et al. The ANA-reflex test as a model for improving clinical appropriateness in autoimmune diagnostics. *Auto Immun Highlights* 2016; 7:9.
68. Malyavantham K, Suresh L. Analysis of DFS70 pattern and impact on ANA screening using a novel HEp-2 ELITE/DFS70 knockout substrate. *Auto Immun Highlights* (2017) 8:3.
69. Meroni PL, Bizzaro N, Cavazzana I, Borghi MO, Tincani A. Automated tests of ANA immunofluorescence as throughput autoantibody detection technology: strengths and limitations. *BMC Med* 2014; 12:38.
70. Meroni PL, Schur PH. ANA screening: an old test with new recommendations. *Ann Rheum Dis* 2010; 69:1420– 2.
71. Mierau R, Csernok E. Labordiagnostik bei Kollagenosen und Vaskulitiden. *Akt Rheumatol* 2014; 39:49–57.
72. Savige J, Gillis D, Benson E, Davies D, Esnault V, Falk RJ, et al. International Consensus Statement on Testing and Reporting of

- Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies (ANCA). *Am J Clin Pathol* 1999; 111:507–13.
73. Holle JU, Csernok E, Fredenhagen G, Backes M, Bremer JP, Gross WL. Clinical evaluation of hsPR3-ANCA ELISA for detection of antineutrophil cytoplasmic antibodies directed against proteinase 3. *Ann Rheum Dis* 2010; 69:468–9.
74. Bossuyt X, Frans J, Hendrickx A, Godefridis G, Westhovens R, Marien G. Detection of anti-SSA antibodies by indirect immunofluorescence. *Clinical Chemistry* 2004; 50(12):2361–9.
75. Humbel RL. Detection of antinuclear antibodies by immunofluorescence. In: Van Venrooij WJ, Maini RN, eds. *Manual of biological markers of disease*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers 1993;A2:1–16.
76. Keech CL, Howarth S, Coates T, Rischmueller M, McCluskey J, Gordon TP. Rapid and sensitive detection of anti-Ro (SS-A) antibodies by indirect immunofluorescence of 60 kDa Ro HEp-2 transfectants. *Pathology* 1996; 28:54–7.
77. Keech CL, McCluskey J, Gordon TP. Transfection and overexpression of the human 60-Kda Ro/SS-A autoantigen in HEp-2 cells. *Clin Immunol Immunopathol* 1994; 73:146–51.
78. Fritzler MJ, Miller JB. Detection of autoantibodies to SS-A/Ro by indirect immunofluorescence using a transfected and overexpressed human 60 kD Ro autoantigen in HEp-2 cells. *J Clin Lab Anal* 1995; 9(3):218–24.
79. Lega JC, Fabien N, Reynaud Q, Durieu I, Dutertre M, et al. The clinical phenotype associated with myositis-specific and associated autoantibodies: a meta-analysis revisiting the so-called antisynthetase syndrome. *Autoimmun Rev* 2014; 13:883–91.
80. Iaccarino L, Ghirardello A, Bettio S, Zen M, Gatto M, Punzi L, et al. The clinical features, diagnosis and classification of dermatomyositis. *J Autoimmun* 2014; 48–49:122–7.

81. Mahler M, Miller FW, Fritzler MJ. Idiopathic inflammatory myopathies and the anti-synthetase syndrome: a comprehensive review. *Autoimmun Rev* 2014; 13:367–71.
82. Bodoki L, Nagy-Vincze M, Griger Z, Betteridge Z, Szöllsi L, Dankó K. Four dermatomyositis-specific autoantibodies – anti-TIF1 γ , anti-NXP2, anti-SAE and anti-MDA5 – in adult and juvenile patients with idiopathic inflammatory myopathies in a Hungarian cohort. *Autoimmun Rev* 2014; 13:1211–9.
83. Marin GG, Cardiel MH, Cornejo H, Viveros ME. Prevalence of Antinuclear Antibodies in 3 Groups of Healthy Individuals, Blood Donors, Hospital Personnel, and Relatives of Patients With Autoimmune Diseases. *J Clin Rheumatol* 2009; 15:325-9.
84. Grygiel-Górniak B, Rogacka N, Puszczewicz M. Antinuclear antibodies in healthy people and non-rheumatic diseases – diagnostic and clinical implications. *Reumatologia* 2018; 56,4:243–8.
85. Heinlen LD, McClain MT, Merrill J, Akbarali YW, Edgerton CC, Harley JB, et al. Clinical criteria for systemic lupus erythematosus precede diagnosis, and associated autoantibodies are present before clinical symptoms. *Arthritis Rheum* 2007; 56:2344-51.
86. Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, Scofield RH, Dennis GJ, James JA, et al. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2003; 349:1526-33.
87. Salamunic I. Laboratory diagnosis of autoimmune diseases – new technologies, old dilemmas. *Biochem Med* 2010; 20(1):45–56.
88. Tozzoli R, Bizzaro N, Tonutti E, Villalta D, Bassetti D, Manoni F, et al. Guidelines for the laboratory use of autoantibody tests in the diagnosis and monitoring of autoimmune rheumatic diseases. *Am J Clin Pathol* 2002; 117:316-24.
89. von Mühlen CA, Tan EM. Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum* 1995; 24:323-58.

90. Kumar Y, Bhatia A, Minz RW. Antinuclear antibodies and their detection methods in diagnosis of connective tissue diseases: a journey revisited. *Diagn Pathol* 2009; 4:1.
91. Pham BN, Albarede S, Guyard A, Burg E, Maisonneuve P. Impact of external quality assessment on antinuclear antibody detection performance. *Lupus* 2005; 14(2):113–9.
92. Bizzaro N, Tozzoli R, Tonutti E, Piazza A, Manoni F, Ghirardello A, et al. Variability between methods to determine ANA, anti-dsDNA and anti-ENA autoantibodies: a collaborative study with the biomedical industry. *J Immunol Methods* 1998; 219(1):99–107.
93. Tozzoli R, Antico A, Porcelli B, Bassetti D. Automation in indirect immunofluorescence testing: a new step in the evolution of the autoimmunology laboratory. *Auto Immun Highlights* 2012; 3:59–65.
94. Arefieva AS, Smoldovskaya OV, Tikhonov AA, Yu A. Rubina. Allergy and Autoimmunity: Molecular Diagnostics, Therapy, and Presumable Pathogenesis. *Molecular Biology* 2017; 51(2):194–204.
95. Kingsmore SF. Multiplexed protein measurement: technologies and applications of protein and antibody arrays. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5(4):310–20.
96. Damoiseaux J. Multiparametric autoimmune diagnostics: recent advances. *Pathol Lab Med Int* 2016; 8:15–25.
97. Sowa M, Grosmann K, Scholz J, Rober N, Rodiger S, Schierack P, et al. The CytoBead assay – a novel approach of multiparametric autoantibody analysis in the diagnostics of systemic autoimmune diseases. *J Lab Med* 2015; 38(6):309–17.
98. Pottel H, Wiik A, Loch H, Gordon T, Robert-Thompson P, Abraham D, et al. Clinical optimization and multicenter validation of antigenspecific cut-off values on the INNO-LIA ANA update for the detection of autoantibodies in connective tissue disorders. *Clin Exp Rheumatol* 2004; 22:579–88.
99. Eissfeller P, Sticherling M, Scholz D, Hennig K, Luttich T, Motz M, et al. 2005. Comparison of different test systems for simultaneous autoantibody

- detection in connective tissue diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1050, 327–39.
100. Mahler M, Meroni PL, Bossuyt X, Fritzler MJ. Current concepts and future directions for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. *J Immunol Res* 2014; (1):315179.
 101. Bordet C. Performance of the Inno-Lia Ana test in the detection of the main autoantibodies involved in connective tissue diseases. *Annales de Biologie Clinique* 2001; 59(6):767–8.
 102. Lee SA, Kahng J, Kim Y, Park YJ, Han K, Kwok SK, et al. Comparative study of immunofluorescent antinuclear antibody test and line immunoassay detecting 15 specific autoantibodies in patients with systemic rheumatic disease. *J Clin Lab Anal* 2012; 26:307–14.
 103. Lopez-Longo FJ, Rodriguez-Mahou M, Escalona-Monge M, Gonzalez CM, Monteagudo I, Carreno-Perez L. Simultaneous identification of various antinuclear antibodies using an automated multiparameter line immunoassay system. *Lupus* 2003; 12(8):623–9.
 104. González DA, León ACD, Pérez MDCR, Díaz BB, Hernández AG, García DG, et al. Efficiency of different strategies to detect autoantibodies to extractable nuclear antigens. *J Immunol Methods* 2010; 360,(1-2):89–95.
 105. Scholz J, Grossmann K, Knütter I, Hiemann R, Sowa M, Röber N, et al. Second generation analysis of antinuclear antibody (ANA) by combination of screening and confirmatory testing. *Clin Chem Lab Med* 2015; 53:1991–2002.
 106. Sowa M, Grossmann K, Knütter I, Hiemann R, Röber N, Anderer U, et al. Simultaneous automated screening and confirmatory testing for vasculitis-specific ANCA. *PLoS One* 2014; 9(9):e107743.
 107. Sowa M, Hiemann R, Schierack P, Reinhold D, Conrad K, Roggenbuck D. Next-generation autoantibody testing by combination of screening and confirmation—the CytoBead® technology. *Clinic Rev Allerg Immunol* 2017; 53:87–104.
 108. Ekins RP. Multi-analyte immunoassay. *J Pharm Biomed Anal* 1989; 7(2):155–68.

109. Plebani M, Pittoni M, Celadin M, Bernardi D, Mion MM. Recent advances in diagnostic technologies for autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews* 2009; 8:238–43.
110. Tozzoli R. Recent advances in diagnostic technologies and their impact in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2007; 6:334–40.
111. Fritzler MJ. Advances and applications of multiplexed diagnostic technologies in autoimmune diseases. *Lupus* 2006; 15:422-7.
112. Feng Y, Ke X, Ma R, Chen Y, Hu G, Liu F: Parallel detection of autoantibodies with microarrays in rheumatoid diseases. *Clin Chem* 2004; 50(2):416-22.
113. Joos TO, Schrenk M, Höpfl P, Kröger K, Chowdhury U, Stoll D, et al. A microarray enzyme-linked immunosorbent assay for autoimmune diagnostics. *Electrophoresis* 2000; 21:2641-50.
114. Robinson WH, DiGennaro C, Hueber W, Haab BB, Kamachi M, Dean EJ, et al. Autoantigen microarrays for multiplex characterization of autoantibody responses. *Nat Med* 2002; 8(3):295-301.
115. Horan PK, Wheelles LL Jr. Quantitative single cell analysis and sorting. *Science* 1977; 198:149-57.
116. Rödiger S, Schierack P, Böhm A, Nitschke J, Berger I, Frommel U, et al. A highly versatile microscope imaging technology platform for the multiplex real-time detection of biomolecules and autoimmune antibodies. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2013; 133:35–74.
117. Willitzki A, Hiemann R, Peters V, Sack U, Schierack P, Rödiger S, et al. New platform technology for comprehensive serological diagnostics of autoimmune diseases. *Clin Dev Immunol* 2012; 284740.
118. Grossmann K, Roggenbuck D, Schröder C, Conrad K, Schierack P, Sack U. Multiplex assessment of non-organ-specific autoantibodies with a novel microbead-based immunoassay. *Cytometry A* 2011;79:118 – 25.
119. Seideman J, Peritt D. A novel monoclonal antibody screening method using Luminex 100 microsphere system. *J Immunol Methods* 2002; 267:165-71.

120. Miller MB, Tang YW. Basic concepts of microarrays and potential applications in clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22(4): 611–33.
121. Singh DP, Ohguro N, Kikuchi T, Sueno T, Reddy VN, Yuge K, et al. Lens epithelium-derived growth factor: effects on growth and survival of lens epithelial cells, keratinocytes, and fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 267:373–81.
122. Conrad K, Röber N, Andrade LEC, Mahler M. The clinical relevance of anti-DFS70 autoantibodies. *Clinic Rev Allerg Immunol* 2016; 52(2):202–16.
123. Singh DP, Kimura A, Chylack LT Jr, Shinohara T. Lens epithelium-derived growth factor (LEDGF/p75) and p52 are derived from a single gene by alternative splicing. *Gene* 2000; 242(1–2):265–73.
124. Llano M, Vanegas M, Hutchins N, Thompson D, Delgado S, Poeschla EM. Identification and characterization of the chromatin-binding domains of the HIV-1 integrase interactor LEDGF/p75. *J Mol Biol* 2006; 360:760–73.
125. Ogawa Y, Sugiura K, Watanabe A, Kunimatsu M, Mishima M, Tomita Y, et al. Autoantigenicity of DFS70 is restricted to the conformational epitope of C- terminal alpha-helical domain. *J Autoimmun* 2004; 23:221–31.
126. Ge H, Si Y, Roeder RG. Isolation of cDNAs encoding novel transcription coactivators p52 and p75 reveals an alternate regulatory mechanism of transcriptional activation. *EMBO J* 1998; 17(22):6723–9.
127. Shinohara T, Singh DP, Fatma N. LEDGF, a survival factor, activates stress-related genes. *Prog Retin Eye Res* 2002; 21:341–58.
128. Sharma P, Singh DP, Fatma N, Chylack LT Jr, Shinohara T. Activation of LEDGF gene by thermal- and oxidative-stresses. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 276(3):1320–4.
129. Basu A, Drame A, Muñoz R, Gijssbers R, Debyser Z, Leon MD, et al. Pathway specific gene expression profiling reveals oxidative stress genes potentially regulated by transcription co-activator LEDGF/p75 in prostate cancer cells. *Prostate* 2012; 72(6):597–611.

130. Llano M, Saenz DT, Meehan A, Wongthida P, Peretz M, Walker WH, et al. An essential role for LEDGF/p75 in HIV integration. *Science* 2006; 314(5798): 461–4.
131. Vandekerckhove L, Christ F, Van Maele B, Rijck JD, Gijsbers R, Van den Hauteet C, et al. Transient and stable knockdown of the integrase cofactor LEDGF/p75 reveals its role in the replication cycle of human immunodeficiency virus. *J Virol* 2006; 80(4):1886–96.
132. Cherepanov P, Maertens G, Proost P, Devreese B, Van Beeumen J, Engelborghs Y, et al. HIV-1 integrase forms stable tetramers and associates with LEDGF/p75 protein in human cells. *J Biolumin Chemilumin* 2003; 278:372–81.
133. Maertens G, P. Cherepanov, W. Pluymers, Busschots K, Clercq ED, Debyser Z, et al. LEDGF/p75 is essential for nuclear and chromosomal targeting of HIV-1 integrase in human cells. *J Biolumin Chemilumin* 2003; 278:33528–39.
134. Ochs RL, Mahler M, Basu A, Rios-Colon L, Sanchez TW, Andrade LE, et al. The significance of autoantibodies to DFS70/LEDGFp75 in health and disease: integrating basic science with clinical understanding. *Clin Exp Med* 2016; 16:273–93.
135. Basu A, Sanchez TW, Casiano CA. DFS70/LEDGFp75: an enigmatic autoantigen at the interface between autoimmunity, AIDS, and cancer. *Front Immunol* 2015; 6:116.
136. Sharma P, Fatma N, Kubo E, Shinohara T, Chylack LT Jr, Singh DP. Lens epithelium-derived growth factor relieves transforming growth factor- β 1-induced transcription repression of heat shock proteins in human lens epithelial cells. *J Biol Chem* 2003; 278(22):20037–46.
137. Wu X, Daniels T, Molinaro C, Lilly MB, Casiano CA. Caspase cleavage of the nuclear autoantigen LEDGF/p75 abrogates its pro-survival function: implications for autoimmunity in atopic disorders. *Cell Death Differ* 2002; 9:915–25.
138. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977; 33:159-74.

139. Bossuyt X, Luyckx A. Antibodies to extractable nuclear antigens in antinuclear antibody-negative samples. *Clinical Chemistry* 2005; 51(12):2426–7.
140. Hoffman IEA, Peene I, Veys EM, De Keyser F. Detection of specific antinuclear reactivities in patients with negative anti-nuclear antibody immunofluorescence screening tests. *Clinical Chemistry* 2002; 48(12):2171–6.
141. Bossuyt X, Marien G, Vanderschueren S. A 67-year-old woman with a systemic inflammatory syndrome and sicca. *Clinical Chemistry* 2010; 56(9):1508–9.
142. Looock CD, Egerer K, Feist E, Burmester GR. Automated evaluation of ANA under real-life conditions. *RMD Open* 2017; 3:e000409.
143. Gundin S, Irure-Ventura J, Asensio E, Ramos D, Mahler M, Martinez-Taboada V, et al. Measurement of anti-DFS70 antibodies in patients with ANA-associated autoimmune rheumatic diseases suspicion is cost-effective. *Autoimmun Highl* 2016; 7:10.
144. Lee H, Kim Y, Han K, Oh EJ. Application of anti-DFS70 antibody and specific autoantibody test algorithms to patients with the dense fine speckled pattern on HEp-2 cells. *Scand J Rheumatol* 2016; 45:122–8.
145. Sperotto F, Seguso M, Gallo N, Plebani M, Zulian F. Anti-DFS70 antibodies in healthy schoolchildren: A follow-up analysis. *Autoimmunity Reviews* 2017; 16:210–1.
146. Fritzler MJ. The Antinuclear Antibody Test: Last or Lasting Gasp? *Arthritis Rheum* 2011; 63(1):19-22.
147. Sack U, Conrad K, Csernok E, Frank I, Hiepe F, Krieger T, et al. Autoantibody detection using indirect immunofluorescence on HEp-2 cells. *Ann NY Acad Sci* 2009; 1173:166–73.
148. Wiik AS, Høier-Madsen M, Forslid J, Charles P, Meyrowitsch J. Antinuclear antibodies: A contemporary nomenclature using HEp-2 cells. *J Autoimmun* 2010; 35:276–90.
149. Chan EK, Damoiseaux J, Carballo OG, Conrad K, de Melo Cruvinel W, Francescantonio PLC. Report of the First International Consensus on

Standardized Nomenclature of Antinuclear Antibody HEp-2 Cell Patterns 2014-2015. *Front Immunol* 2015; 6:412.

150. Bizzaro N, Tonutti E, Villalta D. Recognizing the dense fine speckled/lens epithelium– derived growth factor/p75 pattern on HEp-2 cells: not an easy task! Comment on the article by Mariz et al. DOI 10.1002/art.30621.
151. Bizzaro N, Fabris M. New genetically engineered DFS70 knock-out HEp-2 cells enable rapid and specific recognition of anti-DFS70 antibodies. *Autoimmunity* 2018. DOI: 10.1080/08916934.2018.1469013.
152. Bentow C, Fritzler MJ, Mummert E, Mahler M. Recognition of the dense fine speckled (DFS) pattern remains challenging: results from an international internet-based survey. *Auto Immun Highlights* 2016; 7:8.
153. Mahler M, Ngo JT, Schulte-Pelkum J, Luettich T, Fritzler MJ. Limited reliability of the indirect immunofluorescence technique for the detection of anti-Rib-P antibodies. *Arthritis Research & Therapy* 2008; 10(6):R131.
154. Peene I, Ael WV, Vandenbossche M, Vervaet T, Veys E, Keyser FD. Sensitivity of the HEp-2000 substrate for the detection of anti-SSA/Ro60 antibodies. *Clin Rheumatol* 2000; 19(4):291–5.
155. Banhuk FW, Pahim BC, Jorge AS, Menolli RA. Relationships among antibodies against extractable nuclear antigens, antinuclear antibodies, and autoimmune diseases in a Brazilian Public Hospital. *Autoimmune Diseases* Volume 2018, Article ID 9856910, 8 pages. doi.org/10.1155/2018/9856910.
156. Miyara M, Albesa R, Charuel JL, Amri ME, Fritzler MJ. Clinical phenotypes of patients with anti-DFS70/LEDGF antibodies in a routine ANA referral cohort. *Clin Dev Immunol* 2013; 2013:703759.
157. Kongur E, Kaklıkkaya N, Bayramoğlu G, Özkaya E, Önder Ş, Akyol R, et al. Yoğun ince benekli (DFS) paterninde antinükleer antikor varlığı tespit edilen hastaların ICD kodlarının retrospektif olarak araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2016; 46(2):82-7.
158. Ayaki M, Ohoguroa N, Azumab N, Majimac Y, Yatad K, Ibarakie, et al. Detection of cytotoxic anti-LEDGF autoantibodies in atopic dermatitis. *Autoimmunity* 2002; 35(5)319–27.

159. Nilsson AC, Voss A, Lillevang ST. DFS70 Autoantibodies are rare in healthy Danish individuals but may still serve as a diagnostic aid. 2015 The Foundation for the Scandinavian Journal of Immunology. doi: 10.1111/sji.12366.
160. Buchner C, Sachs U, Bein G et al. Significant variations in the prevalence of anti-DFS70 antibodies in blood donors from six countries: USA, Italy, Spain, Germany, United Kingdom and Brazil. 27th Annual AMLI Meeting. [Abstract].
161. Mutlu E, Eyigör M, Mutlu D, Gültekin M. Confirmation of anti-DFS70 antibodies is needed in routine clinical samples with DFS staining pattern. Cent Eur J Immunol 2016; 41(1):6-11.
162. Schmeling H, Mahler M, Levy DM, Moore K, Stevens AM, Wick J, et al. Autoantibodies to dense fine speckles in pediatric diseases and controls. J Rheumatol 2015; 42:2419–26.
163. Bentow C, Rosenblum R, Correia P, Karayev E, Karayev, WilliamsD, et al. Development and multi-center evaluation of a novel immunoabsorption method for anti-DFS70 antibodies. Lupus 2016; 25:897–904.
164. Knütter I, Hiemann R, Brumma T, Büttner T, Grossmann K, Cusini M, et al. Automated interpretation of ANCA patterns – a new approach in the serology of ANCA-associated vasculitis. Arthritis Res Ther 2012; 14:R271.

10. EKLER

Ek 1. Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul Onayı

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
2018

KARAR

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Morfoloji Binası A Blok 1. Kat No: A1-05 Kampüs /ANTALYA
	TELEFON	0 (242) 249 69 54
	FAKS	0 (242) 249 69 03
	E-POSTA	etik@akdeniz.edu.tr
	ETİK KURUL KODU	2012-KAEK-20
PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADE/ SOYADI		Yrd.Doç.Dr.Esret MUTLU
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Klinik Örneklerde DFS Paterinin ve anti-DFS 70 Antikörünün Araştırılması
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 54 -	Tarih: 17.01.2018
	Yukarıda bilgileri verilen çalışmanın yapılmasında bilimsel ve etik açısından sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir. Araştırmacılara çalışmalarında başarılar dileriz	

Prof.Dr. Arslan KATARGİL
Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanı

Öğr.Gör.Dr.M. Levent ÖZGÖNÜL
Başkan Yardımcısı

Prof.Dr. Murat CANPOLAT
Üye

Prof.Dr. Dilma İNAN
Üye (İznil)

Prof.Dr. Selahattin KUMRU
Üye Üye (İznil)

Prof.Dr. Bülent KARSILI
Üye

Prof.Dr. Ali YAZISIZ
Üye

Prof.Dr. Özgür ÇAKIR
Üye

Doç.Dr. Mustafa ÖZGÜR BAYSAL
Üye

Doç.Dr. Dile KIRILAN KORGUN
Üye

Doç.Dr. Burak NİLİ
Üye

Yrd.Doç.Dr. Mehmet TÖRKAY
Üye

Dr.Ünal HÜLÜR
Üye (İznil)

Turgut ALTUN
Üye

Ay Mustafa AÇIKEL
Üye