

Bir Üniversite Hastanesinde Antinükleer Antikor Pozitiflikleri

Antinuclear Antibody Positivity in a University Hospital

Engin Karakeçe,¹ Ali Rıza Atasoy,² Güner Çakmak,³ İbrahim Tekeoğlu,⁴ Halil Harman,⁴ İhsan Hakkı Çiftçi²

¹Sakarya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Kliniği, Sakarya, Türkiye

²Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Sakarya, Türkiye

³Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Sakarya, Türkiye

⁴Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı, Sakarya, Türkiye

İletişim adresi:

Dr. Ali Rıza Atasoy
Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 54040 Sakarya, Türkiye
Tel: +90 505 - 455 77 15
e-posta: atasoya@hotmail.com

©2014 Turkish Journal of Immunology.
All rights reserved.

doi: 10.5606/tji.2014.269

Geliş tarihi: 24 Kasım 2013

Kabul tarihi: 01 Nisan 2014

Amaç: Bu çalışmada antinükleer antikor (ANA) araştırılması için tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen örnekler ile yapılan indirekt floresan antikor (IFA) sonuçları değerlendirildi.

Hastalar ve yöntemler: Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına Mayıs 2012 - Şubat 2013 tarihleri arasında otoimmün hastalık şüphesi ile otoantikor aranması istenen 2268 hastanın sonucu retrospektif olarak değerlendirildi. İnsan epitel kanser (HEp) 2010 hücreleri ile üretici firma talimatları doğrultusunda hazırlanan preparatlar indirekt floresan mikroskopunda değerlendirildi.

Bulgular: Örneklerde değişik titre ve motiflerde %33.3 (n=755) ANA pozitifliği saptandı. Antinükleer antikor pozitifliği en sık (%41.1; n=310) oranı ile Romatoloji kliniğinde ve (%15.0; n=113) oranı ile Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon kliniğinde saptandı. Antinükleer antikor pozitif olarak bildirilen hastaların en sık görülen floresan motifleri nükleer granüler (%30.1) ve nükleolar motif idi (%16.2).

Sonuç: Bu çalışmada ANA pozitifliği oranları, yayımlanmış çalışmalara kıyasla yüksekti. Literatür verileri için standardizasyona ihtiyaç olup, nükleer, nükleolar, mitotik ve sitoplazmik motif başlıklarının kullanılması ortak dil açısından faydalı olabilir. Özellikle düşük titre pozitifliklerinin gözden geçirilmesi, sonuçların optimizasyonu, testin pozitif ve negatif kestirim değerlerinin istenilen düzeyde tutulması için ilgili kliniklerle işbirliği planlanmaktadır.

Anahtar sözcükler: Antinükleer antikor; otoimmünite; indirekt floresan mikroskop.

Objectives: This study aims to evaluate the results of indirect fluorescent assay (IFA) using the specimens sent to the medical microbiology laboratory for antinuclear antibody (ANA) screening.

Patients and methods: Between May 2012 and February 2013, results of a total of 2,268 patients with suspected autoimmune disease were retrospectively analyzed for the presence of autoantibodies by the Medical Microbiology Laboratories of Sakarya University Education and Research Hospital. The preparations which were prepared by the instructions of the manufacturer with human epithelial cancer (HEp) 2010 cells were assessed under indirect fluorescence microscopy.

Results: Antinuclear antibody positivity was detected in 33.3% (n=755) of specimens at various titers and patterns. Antinuclear antibody positivity was highest in Rheumatology clinic (41.1%; n=310), followed by Physical Medicine and Rehabilitation clinic (15.0%; n=113). Among ANA-positive patients, the most common fluorescence patterns were nuclear granular (30.1%) and nucleoli patterns (16.2%).

Conclusion: Antinuclear antibody-positivity rates were higher in our study than other published studies. Standardization is necessary for literature data and titles of nuclear, nucleoli, mitotic, and cytoplasmic pattern can be useful for common terminology. Collaboration with relevant clinics has been made to review low-titer positive patients, particularly, to optimize the results, and to establish positive and negative cut-off values of the test at expected levels.

Key words: Antinuclear antibody; autoimmunity; indirect fluorescence microscopy.

Otoimmün hastalıkların tanısı, prognozu, aktivitesi ve tedavinin takibinde otoantikörlerin saptanması hekime önemli bir yol göstericidir. Otoimmün hasta-

lıkların tanısında ve tedavisinin takibinde 50 yılı aşkın bir süredir otoantikor testleri kullanılmaktadır.^[1] Belirli düzeylerde otoantikor bulunması, otoimmün hastalığın

varlığını düşündürmekte veya otoimmün bir hastalığı olan kişide hastalığın şiddeti ve hastalığa karşı gelişen immün yanıtın şiddeti hakkında bilgi vermektedir.^[2] Her laboratuvarın, otoantikör belirlemede kullandığı teknikleri, bu tekniklerin avantajlarını ve dezavantajlarını, sınırlamalarını iyi araştırması ve klinikle birlikte kendi bölgesi için en uygun yöntemi seçmesi gerekmektedir.^[3] Geliştirilen uygulama ve yöntemlerin detaylarının yayınlanması, elde edilen deneyimin pekiştirilmesi açısından önem taşımaktadır.^[1]

Antinükleer antikor (ANA); sistemik lupus eritematozus (SLE), Sjögren sendromu, sistemik skleroz, enfamatuvar miyozitis, mikso bağ doku hastalığı (MBDH) ve romatoid artrit (RA) gibi sistemik otoimmün hastalıklarda saptanabilen otoantikör grubudur.^[4] 1950'lerin sonunda ANA için indirekt immüno Floresans tekniği geliştirilmesi otoimmün fenomenin daha duyarlı olarak değerlendirilmesini sağlamıştır.^[5] Sonraki bir çalışmada SLE hastalarında Smith antijeni ve MBDH'de nükleer ribonükleoprotein (RNP) antikörleri gösterilmiştir. Günümüzde otoimmün hastalıkların patogenezi açıklayabilecek çok sayıda antikor tanımlanmıştır.^[6]

Bu çalışmada çeşitli kliniklerden ANA araştırılması için tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen hasta örnekleri ile yapılan indirekt floresan antikor (IFA) sonuçların geriye dönük olarak değerlendirilmesi amaçlandı.

HASTALAR VE YÖNTEMLER

Çalışma kapsamında Sağlık Bakanlığı Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarına Mayıs 2012-Şubat 2013 tarihleri arasında otoimmün hastalık şüphesi ile ANA aranması istenen 2268 hasta değerlendirmeye alındı. Çalışmada insan epitel kanser (HEp) 2010 (Euroimmun AG, Lübeck, Germany) hücreleri ile hazırlanan preparatlar kullanıldı. Hasta serum örnekleri üretici firma önerileri doğrultusunda fosfat tamponlu izotonik solüsyon (PBS) ile 1/100 oranında dilüe edildi. Slayt üzerindeki her bir kuyucuğa 30 µl dilüe edilmiş serum ilave edildi ve otuz dakika oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda slaytlar beş dakika aralıklarla iki defa fosfat tamponlu tuzlu su (PBS) ile yıkandı. Floresan işaretli 25 µl anti-human immüno globulin (konjugat) ile kuyucuklar tekrar dolduruldu ve 30 dakika oda ısısında inkübe edildi. İkinci inkübasyonun ardından kuyucuklar PBS ile tekrar yıkandı. Kuyucuklara 30 µl kapatma solüsyonu doldurularak lamel ile kapatıldı.

Hazırlanan preparatlar 200x ve 400x büyütmede EurostarIII (Euroimmun AG, Lübeck, Germany) floresan mikroskopunda değerlendirildi. Hasta örnekleri ile yapılan çalışmalarda 1/100 dilüsyonda ANA pozitif bulunan

örnekler sınır pozitiflik değerlerinin tespiti için hasta örnekleri 1/320, 1/1000 ve 1/10000 oranında dilüe edilip test tekrarlandı. Pozitifliklerin değerlendirilmesi 1/100, 1/320, 1/1000 ve 1/10000 için sırası ile 1 pozitif, 2 pozitif, 3 pozitif ve 4 pozitif olarak yapıldı.

Çalışmada elde edilen verilerin analizleri Windows için 17 versiyon SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) yazılım programı kullanılarak yapıldı, değişkenler arasındaki ilişkinin yönü ve şiddeti Pearson's korelasyon testi ile irdelendi. İstatistiksel değerlendirmede p değeri <0.05 ise anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya Romatoloji (%36.29), Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon (%14.81), Dahiliye (%12.7), Dermatoloji (%11.3) ve Nöroloji (%7.0) klinikleri başta olmak üzere 10 farklı klinikte takip edilen toplam 2268 hasta örneği ile IFA yöntemi ile yapılan çalışmaların sonuçları dahil edildi. İncelenen hasta örneklerinde değişik titre ve motiflerde %33.3 ($n=755$) oranında pozitiflik saptandı. Kliniklerin pozitiflik oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Zira kliniklerden gönderilen örnek sayıları ve pozitiflik oranları arasında anlamlı düzeyde pozitif ilişki ($r=0.994$, $p=0.000$) gözlemlendi. Diğer veriler Tablo 1'de verilmiştir.

Çalışmamızda nükleer, nükleolar, mitotik ve sitoplazmik motifler için antikor pozitifliklerinin dağılımı sırası ile %56.2, %16.2, %14.0 ve %13.6 olarak hesaplandı (Tablo 2) (Şekil 1). Nükleer motif pozitifliği saptanan 425 örneğin ince granüler, kaba granüler, homojen ve nükleer membran motifleri için dağılımı sırası ile %69.4, %14.1, %15.1 ve %1.4 olduğu gözlemlendi.

Antinükleer antikor pozitif bulunan 755 örneğin antikor titreleri 1 pozitif, 2 pozitif, 3 pozitif ve 4 pozitif için sırası ile; %73.8, %13.8, %8.3, ve %4.1 olarak hesaplandı. Antikor titresini açısından 1 pozitif olarak raporlanan 557 hasta örneğinin 198'inde (%35.6) nükleer ince granüler motif pozitifliği saptandı.

TARTIŞMA

Otoimmün hastalıkların erken tanısı hastalık, ölüm ve kalıcı sekellerin önlenmesi açısından önemli olup, tanıya yardımcı otoantikör testleri klinisyenlerin karar sürecine katkı sağlamaktadır.^[2] Hücre çekirdeğinde bulunan, otoantikörlerin hedefi olabilen ve serum fizyolojik ile ekstrakte edilebilen proteinler, ekstrakte edilebilir nükleer antijenler (ENA) adını almaktadır. Ekstrakte edilebilir nükleer antijenlerin ileri analizi, otoimmün bağ dokusu hastalıklarının farklı tiplerinin ayırıcı tanısında kullanılmaktadır.^[7] Ticari otoantikör test kitleri, IFA, immüno difüzyon, immüno blotting, enzim bağlı immüno sorbent assay (ELISA) ve son zamanlarda geliştirilen

TABLO 1

Kliniklere göre örneklerin ve pozitifliklerin dağılımı

Klinikler	Örnek dağılımı		Pozitifliklerin dağılımı	
	Sayı*	Yüzde	Sayı*	Yüzde
Romatoloji	823	36.3	310	37.7
Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon	336	14.8	113	33.6
Dahiliye	289	12.7	88	30.4
Dermatoloji	255	11.2	69	27.1
Nöroloji	161	7.1	41	25.5
Gastroenteroloji	159	7.0	61	38.4
Genel Cerrahi	114	5.0	41	36.0
Diğer	131	5.8	32	24.4
Toplam	2268	100	755	

* Pearson korelasyon analizi sonucunda toplam örnek sayısı ve pozitif örnek sayısı arasında istatistiksel olarak yüksek düzeyde anlamlı ilişki saptandı ($r=0.994$).

lazer antijen ölçüm gibi yöntemleri içermektedir.^[1] Ancak IFA testleri ANA saptanmasında kullanılan yöntemlerden en sık başvurulan güvenilir ve duyarlılığı yüksek olan testlerdir. İndirekt floresan antikor tekniğinde ANA varlığı HEp hücreleri kullanılarak araştırılmaktadır. Bu teknoloji aracılığı ile bilinen ve bilinmeyen tüm antijenlere karşı var olan otoantikörler değerlendirilebilmektedir. Klinik uygulamada, ANA testi pozitif bulunduktan sonra anti-ENA testi istenmektedir. Ancak bazen, anti-ENA, ANA ile birlikte istenmektedir, bu şekilde testin güvenilirliğinin artırılması ya da ANA negatif alt grup pozitiflikleri olan olguları yakalamak amaçlanmaktadır.^[8]

Ülkemizde yapılan çalışmalarda otoimmün hastalık şüphesi ile IFA testi uygulanan hasta örneklerinde ANA pozitiflikleri %8.7-34.4 olarak bildirilmiştir.^[9,10] Çalışmamızda benzer hastalar için ANA pozitiflik oranı ise %33.3 olarak bulundu. Bu oran ülkemiz verileri ile uyumlu olmakla beraber 1 pozitif olarak bildirilen 1/100 titre pozitifliklerinin (%73.8) yüksek oranı dikkat çekicidir. Düşük titre pozitiflikler %30 oranında normal bireylerde genellikle yaşlı ve kadınlarda görülebilmektedir.^[11]

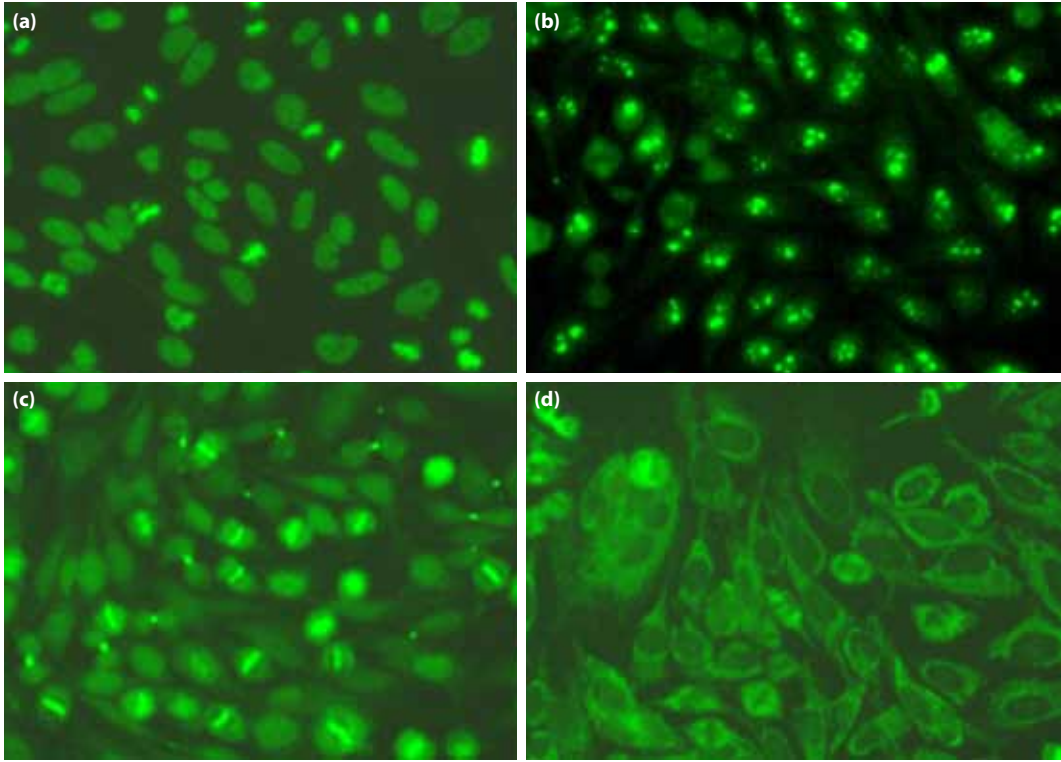
Mikroskopik motiflerin bildirim bakımından ülkemizde yapılan yayınlar irdelendiğinde verilerin bildirim açısından bir standardizasyon söz konusu değildir. Bildirilen motifler nükleer, nükleolar, mitotik ve sitoplazmik başlıkları kapsamında değerlendirilecek olursa toplam ANA içinde nükleer motif pozitifliğinin yurt içi yayınlarda %30.0-62.1 olduğu gözlenmektedir.^[9,10] Bizim çalışmamızda nükleer motif pozitifliği %56.3 olarak hesaplandı. Nükleolar pozitiflik için sınırlı bildirim yapılmış olup; Yanık ve ark.^[12] %2.0 nükleolar motif pozitifliği bulduklarını bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda nükleolar motif pozitifliği %16.2 olarak hesaplandı. Ulaşılabilen başka bir kaynaktan mitotik ve sitoplazmik motif pozitiflikleri için de sırası ile %3.7 ve %16.0 oranları bildirilmiştir.^[10] Çalışmamızda hesaplanan pozitiflik oranları mitotik ve sitoplazmik motif için sırası ile %14.0 ve %13.5 şeklinde idi.

Sonuç olarak, ANA verileri için literatürde yer alan bildirimlerde standardizasyona ihtiyaç olup, nükleer, nükleolar, mitotik ve sitoplazmik motif başlıklarının kullanılması ortak dil açısından faydalı olabilir. Ayrıca çalışmamızda elde edilen pozitiflik oranları literatüre

TABLO 2

İndirekt floresan antikor yöntemi ile tespit edilen antinükleer antikor bulunan olguların oranlarının kliniklere göre dağılımı

Klinikler	Motifler									
	Nükleer		Nükleolar		Mitotik		Sitoplazmik		Toplam	
	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde
Romatoloji	185	43.5	43	35.2	38	35.8	44	43.1	310	41.1
Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	64	15.1	21	17.2	16	15.1	12	11.8	113	15.0
Dahiliye	52	12.2	14	11.5	12	11.3	10	9.8	88	11.7
Dermatoloji	32	7.5	13	10.7	15	14.2	9	8.8	69	9.1
Nöroloji	19	4.5	11	9.0	8	7.5	3	2.9	41	5.4
Gastroenteroloji	30	7.1	7	5.7	8	7.5	16	15.7	61	8.1
Genel Cerrahi	25	5.9	8	6.6	5	4.7	3	2.9	41	5.4
Diğer	18	4.2	5	4.1	4	3.8	5	4.9	32	4.2
Toplam	425	56.3	122	16.2	106	14	102	13.5	755	100



Şekil 1. İndirekt floresan antikor yöntemi ile tespit edilen ANA motifleri **(a)** nükleer, **(b)** nükleolar, **(c)** mitotik ve **(d)** sitoplazmik.

oranla yüksektir. Özellikle düşük titre pozitifliklerinin gözden geçirilmesi, sonuçların optimizasyonu, testin pozitif ve negatif kestirim değerlerinin istenilen düzeyde tutulması için ilgili klinikler ile işbirliği planlandı.

Çıkar çakışması beyanı

Yazarlar bu yazının hazırlanması ve yayınlanması aşamasında herhangi bir çıkar çakışması olmadığını beyan etmişlerdir.

Finansman

Yazarlar bu yazının araştırma ve yazarlık sürecinde herhangi bir finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Fritzler MJ, Wiik A, Fritzler ML, Barr SG. The use and abuse of commercial kits used to detect autoantibodies. *Arthritis Res Ther* 2003;5:192-201.
2. Leslie D, Lipsky P, Notkins AL. Autoantibodies as predictors of disease. *J Clin Invest* 2001;108:1417-22.
3. Tan EM, Feltkamp TE, Smolen JS, Butcher B, Dawkins R, Fritzler MJ, et al. Range of antinuclear antibodies in "healthy" individuals. *Arthritis Rheum* 1997;40:1601-11.
4. Hargraves MM, Richmond H, Morton R. Presentation of two bone marrow elements; the tart cell and the L.E. cell. *Proc Staff Meet Mayo Clin* 1948;23:25-8.
5. Friou GJ. Clinical application of lupus serum nucleoprotein reaction using fluorescein antibody technique. *J Clin Invest* 1957;36:890-5.
6. von Muhlhen CA, Tan EM. Auto-antibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum* 1995;24:323-8.
7. Shur PH, Shmerling RH. Laboratory tests in rheumatic disorders. In: Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH, editors. *Rheumatology*. 3rd ed. Edinburgh: Mosby; 2003. p. 199-214.
8. Paulus HE, Wiesner J, Bulpitt KJ, Patnaik M, Law J, Park GS, et al. Autoantibodies in early seropositive rheumatoid arthritis, before and during disease modifying antirheumatic drug treatment. *J Rheumatol* 2002;29:2513.
9. Şimşek B, Mısırlıoğlu H, Ören S, Muşabak U, Baysallar M, Başustaoğlu A. Retrospektif olarak antinükleer antikor pozitif olan hastalarda indirektimmüno floresan (İİF) ve immüno blotting (İB) test sonuçlarının değerlendirilmesi. 21. Ulusal İmmünoloji Kongresi, 6-9 Nisan 2011, Marmaris, Muğla. *Türk İmmünoloji Derneği* 2011;21:111. [Abstract]
10. İlhan F, Akbulut H, Gödekmerdan A. Laboratuvarımızda saptanan ANA paternlerinin retrospektif incelenmesi. 21. İmmünoloji Kongresi, 6-9 Nisan 2011, Marmaris, Muğla. *Türk İmmünoloji Derneği* 2011; 21:126. [Abstract]
11. Firestein GS. Antinuclear antibodies. In: Firestein GS, Budd RC, Gabriel SE, McInnes IB, O'Dell JR, editors. *Kelley's Textbook of Rheumatology*. Chapter 55, 9th ed. Canada; 2013. p. 792-5.
12. YanıkK, ÜnalN, BirinciA, GünaydınM. İndirektimmüno floresan yöntemi ile antinükleer antikor (ANA) ve Ekstrakte edilebilir nükleer antijen antikor (anti-Ena) pozitif bulunan hastalarda patern dağılımının değerlendirilmesi. 22 Ulusal İmmünoloji Kongresi, 27-30 Nisan 2013, Çeşme, İzmir. *Türk İmmünoloji Derneği* 2013;22: 96. [Abstract]