

Konnektif Doku Hastalıklarının Tanısında Antinükleer (ANA) ve Anti-Double Stranded DNA (Anti-dsDNA) Antikorlarının Önemi

Özlem YILMAZ, Meral KARAMAN, M. Cem ERGON, İ. Hakkı BAHAR, Nuran YULUĞ

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İnciraltı, İzmir

ÖZET: Konnektif doku hastalıklarında (KDH) hücre zarı, hücre reseptörleri, plazma proteinleri, sitoplazmik ve nükleer yapılara karşı otoantikorlar gelişebilmektedir. Antinükleer antikor (ANA) ve anti-double stranded DNA (anti-dsDNA)'ya karşı antikorları araştıran farklı yöntemler KDH' larının tanısında kullanılmaktadır. Bu çalışmada çeşitli konnektif doku hastalıklarında ANA ve anti-dsDNA antikorlarının varlığı ve birlikteliğini araştırmayı amaçladık. Bu amaçla çeşitli KDH ön tanılı 88 hasta serumunda ANA için HEP-2 hücre hattı (Zeus Scientific, Inc. USA) ve anti-dsDNA antikorları için ise *Crithidia luciliae* (BioSystems, Spain) substrat olarak kullanıldı ve immünfloresan (IFA) yöntemi uygulandı. Ayrıca, serumlar ANA Western Blot (WB) Immunoassay (ImmuBlot International Immuno – Diagnostics, , USA) ile ANA ve anti-dsDNA yönünden doğrulamaya alındı. ANA 84 (%96,5) hastada, anti-dsDNA yedi (%7,95) hastada olumlu bulundu. ANA IFA ile saptanan farklı floresan paternlerinin anti-dsDNA sonuçları ile uyumu da değerlendirildi. HEP-2 hücre hattında IFA ile anti-dsDNA olumlu bulunan serumların üçünde mikst patern, dördünde ise homojen patern saptandı. ANA ve anti-dsDNA olumlu yedi olguda ANA WB ile de dsDNA olumlu olarak bulundu ve ANA paternleri de değerlendirildi. IFA yöntemi ile elde edilen ANA ve dsDNA sonuçlarının WB test sonuçları ile uyumlu olduğu gözlemlendi. Sonuç olarak, ANA WB testi gerek dsDNA gerekse ANA paternlerini birarada değerlendirme olanağı sağladığından maliyet ve işgücü açısından KDH'nın tanısında kullanılmasının uygun olduğu kanısına varıldı.

Anahtar sözcükler: Antinükleer antikorlar, anti-dsDNA, konnektif doku hastalıkları, HEP-2 hücre hattı, *Crithidia luciliae*, IFA, Western Blotting

The Importance of Antinuclear (ANA) and Anti-Double Stranded DNA (Anti-dsDNA) Antibodies in the Diagnosis of Connective Tissue Diseases

SUMMARY: Connective tissue diseases (CTD) are characterized by the presence of autoantibodies against several tissues. These autoantibodies occur against cell membrane, cell receptors, plasma proteins, and cytoplasmic and nuclear components. In laboratories, anti-nuclear antibodies (ANA) and anti-double stranded DNA (anti-dsDNA) antibodies are widely used in diagnosis of CTD. The aim of this study was to investigate the presence and accompaniment of ANA and anti-dsDNA antibodies in diagnosis of several CTD and also to study the prevalence of ANA and anti-dsDNA in a group of 88 patients with various types of CTD. ANA were detected by immunofluorescence (IFA) using HEP-2 cells (Zeus Scientific, Inc. USA) and anti-dsDNA antibodies using *Crithidia luciliae* (BioSystems, Spain) as substrates in immunofluorescence. ANA Western Blot (WB) Immunoassay (ImmuBlot, International Immuno–Diagnostics, USA) was also used along with the tests referred to previously. ANA was found in the sera of 84 (96.5%) patients while anti-dsDNA was detected in 7 (7.95%). Moreover different fluorescence patterns were also evaluated with ANA IFA in accordance with anti-dsDNA results. Mixed patterns in three and a homogeneous pattern in four anti-dsDNA positive patients' sera were determined on HEP-2 cell line by IFA. Seven sera which were ANA and anti-dsDNA positive with IFA were also found to be positive with WB and their ANA patterns with the specific ANA WB bands were also evaluated. It was observed that IFA results were in concordance with WB results. Our data indicated that the above findings should be controlled and evaluated with a more advanced method such as western blotting technique in order to confirm the presence of specific antibodies along with clinical outcome of the patients. As a result we think that ANA WB method is an appropriate technique in diagnosis of CTD as anti-dsDNA and ANA bands can be evaluated together with this method.

Key words: Antinuclear antibodies, anti-dsDNA, connective tissue diseases, HEP-2 cell line, *Crithidia luciliae*, IFA, Western blotting

Geliş tarihi/Submission date: 27 Ocak/27 January 2005
Kabul tarihi/Accepted date: 05 Ekim/05 October 2005
Yazışma /Corresponding Author: Özlem Yılmaz
Tel: (+90) (232) 412 45 06 Fax: (+90) (232) 412 45 01
E-mail: ozlem.yilmaz@deu.edu.tr

GİRİŞ

Konnektif doku hastalıklarında (KDH); hücre zarı, hücre reseptörleri, plazma proteinleri, sitoplazmik ve nükleer yapılara karşı otoantikorlar gelişebilmektedir (6). Bu otoantikordardan antinükleer antikorlar (ANA) KDH' larının bir çoğunda saptanabilmektedir. Anti-double stranded DNA (anti-dsDNA) anti-

korları ise daha çok sistemik lupus eritematosus (SLE) ve otoimmün karaciğer hastalıklarında tanı kriteri olarak kullanılmaktadır (2, 8). Yine anti-Sm antikoru en sık SLE' de gözlenmektedir. Anti-RNP antikoru mikst konnektif doku hastalıklarında (MCTD) ve SLE' de, anti-SS-A/Ro ve anti-SS-B/La antikoru Sjögren Sendromu (SS) ve SLE' de, anti-histon antikoru ilaçla indüklenen SLE' de, anti-sentromer antikoru CREST sendromunda, anti-Scl-70 antikoru Progresiv Sistemik Sikleroz' da (PSS), anti-Jo 1 antikoru myozitlerde daha sık gözlenmektedir (3, 6, 8).

ANA ve anti-dsDNA antikoru araştırılmasında indirekt immünfloresan (IFA) , Western Blot (WB) Farr assay ve enzim immün assay (EIA) gibi farklı yöntemler kullanılmaktadır (4, 7). Çalışmamızda KDH' larında ANA ve anti-dsDNA antikoru araştırılmasını ve birlikteliğini IFA ve WB yöntemleri ile araştırmayı amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Serum Örnekleri: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Merkez laboratuvarları, seroloji-immünoloji laboratuvarına çeşitli KDH ön tanısı ile gönderilen 88 hastanın serum örnekleri çalışmaya alındı. Hasta serumları alikotlanarak -20° C' da çalışmaya kadar saklandı.

Testlerin Uygulanması: Seksen sekiz serum örneğinde IFA yöntemi ile ANA ve anti-dsDNA antikoru araştırıldı. ANA ve anti-dsDNA antikoru olumlu bulunan olgular WB ile doğrulamaya alındı.

IFA Yöntemi ile ANA Araştırılması: ANA varlığını araştırmak ve patern değerlendirilmesi için IFA yöntemi (Zeus Scientific, Inc. USA) ve substrat olarak HEp-2 hücre hattı kullanıldı. Test prosedürü üretici firmanın önerileri doğrultusunda uygulandı. Serum örnekleri 1/40 oranında ZORBA-NS örnek dilüenti ile dilüe edildi. Karşıt boya olarak Evans blue kullanıldı. Sonuçlar eş zamanlı olarak ve üç farklı göz tarafından floresan mikroskopunda (Nikon, Optiphot-2, Japonya) E plan 20/0, 4 ve 40/0, 65 objektiflerde incelendi. Nükleer antijenlere karşı yeşil floresans veren otoantikoru varlığı ve gözlenen farklı paternler değerlendirildi.

IFA Yöntemi ile anti-dsDNA Araştırılması: IFA yönteminde substrat olarak *Crithidia luciliae* içeren lamlar (BioSystems, Spain) kullanıldı. Hasta serumları 1/10 oranında fosfat tamponu (PBS) ile dilüe edildi. Karşıt boya olarak Evans blue kullanıldı. Sonuçlar eş zamanlı olarak ve üç farklı göz tarafından floresan mikroskopunda (Nikon Optiphot-2, Japonya) E plan 40/0, 65 ve 100/1, 25 objektiflerde değerlendirildi. Nükleus ve bazal yapı arasında yer alan kinetoplastdaki parlak floresans olumlu, nükleus veya bazal yapıda gözlenen floresans ise olumsuz olarak kabul edildi.

WB Yöntemi ile ANA ve anti-dsDNA Olumlu Serumların Doğrulanması: IFA ANA ve anti-dsDNA olumlu bulunan yedi serum örneği WB yöntemi (ImmuBlot International

Immuno – Diagnostics, USA) ile doğrulamaya alındı. Bu amaçla poliakrilamid jel elektroforezi ile moleküler ağırlıklarına (MA) göre ayrılmış ve polivinilidinden florid (PVDF) membranına transfer edilmiş dsDNA, Scl-70 (100kD), RNP (68kD), SS-A (Ro) (60kD), Jo-1 (56kD), SS-B (La) (48kD), Sm B/B¹ (28, 29kD) ve Cenp A (17kD) antijenlerini içeren stripler kullanıldı. Hasta serumları 1/101 oranında dilüsyon ile çalışıldı. Bu antijenlere karşı antikor varlığını gösteren özgül bantlar, üretici firmanın sağladığı kontrol stripindeki bantlar ile karşılaştırıldı. Beş MA markırından ikisi (45kD, 14.5kD) ince siyah çizgiler, diğer üçü (125kD, 77kD, 70kD) mavieflatun bantlar internal kontrol markırları olarak değerlendirilmeye alındı. Moleküler markırların dışında mavieflatun bantların ve stripin en üst kısmında mavieflatun bir noktanın varlığı olumlu reaksiyon, bu bantların ve noktanın bulunmaması olumsuz reaksiyon olarak değerlendirildi.

BULGULAR

Çeşitli KDH ön tanılı 88 hastada ANA ve anti-dsDNA antikoru IFA yöntemi ile araştırıldı ve IFA ile anti-dsDNA olumlu bulunan serum örnekleri WB ile doğrulamaya alındı.

Çalışmamızda 88 hasta serumunun 84'ünde (%96, 5) ANA, yedisinde (%7,95) anti-dsDNA olumluluğu saptandı. ANA IFA yönteminde HEp-2 hücre hattı kullanılarak saptanan farklı floresan paternlerinin anti-dsDNA sonuçları ile uyumu değerlendirildi, tüm serum örneklerinde en sık gözlenen ANA paterni homojen patern (%51,2) olarak saptandı (Tablo 1).

Anti-dsDNA IFA olumlu bulunan serumların üçünde ANA IFA ile mikst patern, dördünde ise homojen patern izlendi (Tablo 2).

ANA ve anti-dsDNA olumlu yedi serum örneği WB yöntemi ile de çalışıldı ve anti-dsDNA olumluluğu doğrulandı (Tablo 3, Şekil 1).

TARTIŞMA

KDH' da hücrelerin hem nükleer hem de stoplazmik komponentlerine karşı oto antikoru oluşmaktadır. Ribonükleolar proteinlere karşı anti-Sm, anti-RNP, anti-SS-A/Ro, anti-SS-B/La DNA topoizomeras Tip I' e karşı anti-Scl-70, sentromere karşı anti-sentromer (Cenp A), transfer RNA histidil sentetaza karşı anti-Jo-1 ve çift sarmal DNA' ya karşı ise anti-dsDNA antikoru oluşmaktadır (3, 6, 8). Bu antikoru IFA, EIA ve WB gibi farklı yöntemlerle saptanmaktadır (2).

IFA yöntemi ile ANA araştırılması KDH tanısında daha çok tarama testi olarak uygulanmaktadır. IFA testinin uygulanması kolay, hızlı ve maliyetinin ucuz olmasına karşın değerlendirilmesinin subjektif olması önemli bir dezavantajdır (5). Toplumda sağlıklı kişilerde de ANA olumluluğu gözlenmektedir.

Tan ve arkadaşlarının (10) yaptığı çalışmada sağlıklı toplumda 1/40 dilüe edilmiş serumda ANA olumluluğu %31, 7 bulunmuştur. Bu nedenle KDH tanısı sadece ANA olumluluğu ile konulamamakta, ayrıca titrimetrik olarak çalışılması ve yüksek titrelerde (>160) olumluluğun saptanması klinik açıdan gerekmektedir (4). Anti-dsDNA ise SLE'nin tanısında spesifik bir antikor olup kesin tanı kriterlerinden biridir (2).

Tablo 1. ANA pozitif olgularda saptanan paternler

ANA Paternleri	Sayı	%
Homojen	43	51,2
Fine speckled	5	6
Homojen+fine speckled	5	6
Homojen+nükleolar	5	6
Speckled	4	4,8
Homojen+speckled	4	4,8
Nükleolar	3	3,6
Homojen+stoplazmik	3	3,6
Homojen+sentromerik	3	3,6
Corse speckled	2	2,4
Sentromerik	2	2,4
Homojen+corse speckled	2	2,4
Fine speckled+rim	1	1,2
Homojen+nükleolar+corse speckled	1	1,2
Nükleolar+corse speckled+sentromerik	1	1,2
Toplam	84	100

Tablo 2. Anti-dsDNA olumlu olguların HEp-2 hücre hattında IFA ile gözlenen ANA paternleri

ANA Paterni	Anti-dsDNA Olumlu Hasta Sayısı
Homojen	4
Homojen+stoplazmik	2
Homojen+fine speckled	1
Toplam	7

ANA IFA ile yapılan taramalarda KDH' da en sık saptanan ANA paterninin speckled patern olduğunu gösteren çalışmalar

vardır (11, 12). Çalışmamızda ise homojen patern en sık (% 51, 2) gözlenen patern olarak saptandı.

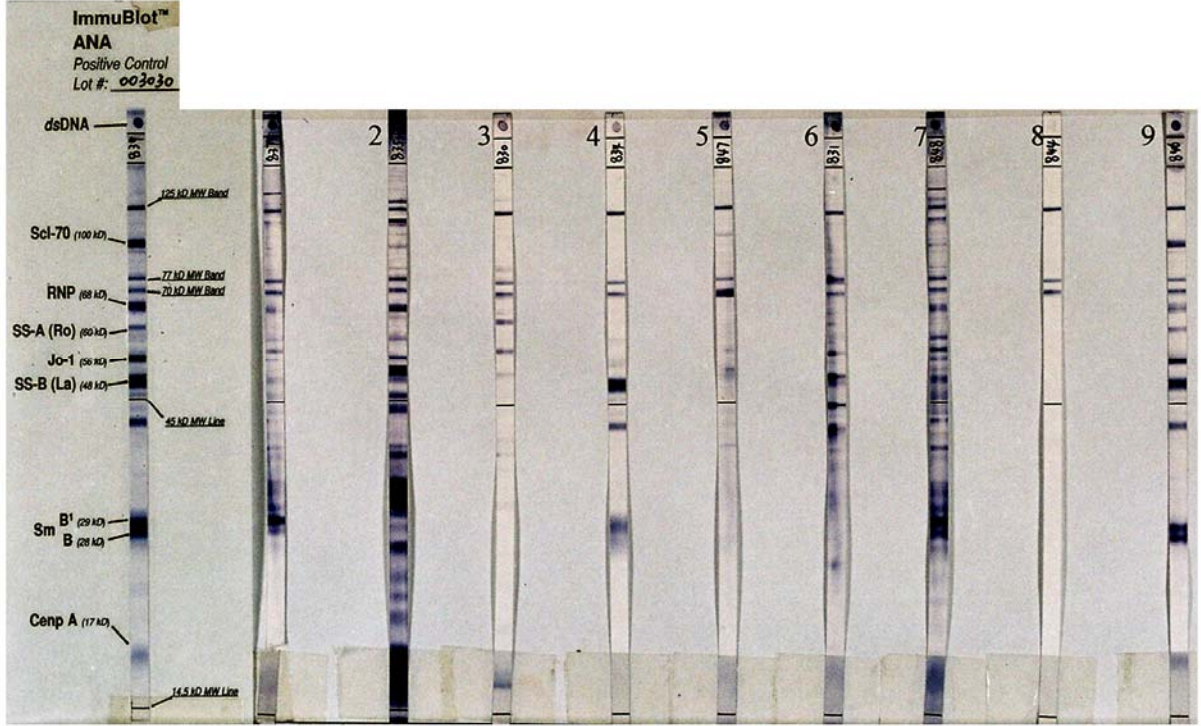
Çalışmamızda ANA IFA ile olumlu bulunan 84 hasta serumundan yedisinde (%8,33) IFA ile anti-dsDNA olumluluğu saptandı. Yapılan başka bir çalışmada ise IFA ANA testi olumlu bulunan 52 serum örneğinin 10 tanesinde (%19,23) *Crithidia luciliae* ile anti-dsDNA antikorları olumlu bulunmuştur (1). IFA ile anti-dsDNA olumlu bulduğumuz yedi hasta serumunda WB ile anti-dsDNA antikorları araştırıldığında yedi hasta serumunun tümünde WB ile de anti-dsDNA olumluluğu saptadık. ANA ve WB testlerinin aynı serumlara uygulanması sonucunda iki testin sonuçları ve patern açısından uyumlu olduğunu gösteren çalışmalar vardır (9, 13, 14). Çalışmamızda da IFA yöntemi ile elde edilen ANA ve dsDNA sonuçları WB test sonuçları ile uyumlu bulundu. SLE' de en sık rastlanılan patern (%60-70) dsDNA' ya karşı antikor varlığını gösteren homojen paterndir (3). Sonuçlarımızda bu literatür bilgisiyle uyumludur. Karışık paternlerin gözlenmesi ise SLE' de birden fazla antijene karşı otoantikor oluşmasına bağlı olabilir.

KDH' da tanımlanan otuzdan fazla antijen-antikor kompleksi bulunmasına rağmen EIA ve WB ile bunların sadece 10-12 kadarını saptamak mümkündür. KDH' da yeni antijen-antikor kompleksleri buldukça IFA bu yeni bulunan komplekslerin saptanmasında tercih edilen metod olmaya devam edecektir. Çünkü IFA' da daha önceleri kullanılan doku kesitlerinin yerini alan hücre hattı substratları teorik olarak hücresel otoantijenlerin hepsini içermektedir (10).

Sonuç olarak ANA IFA yönteminin iyi bir tarama yöntemi olduğu, ancak maliyet ve iş gücü açısından bakıldığında ANA WB testinin gerek dsDNA gerekse ANA paternlerini bir arada değerlendirme olanağı sağlaması nedeniyle KDH tanısında kullanılmasının uygun olduğu kanısına varıldı

Tablo 3. Anti-dsDNA olumlu olguların IFA ANA paternleri ve WB ile elde edilen sonuçlarının karşılaştırılması

IFA	WB								
	Scl-70	RNP	SS-A (Ro)	SS-B (La)	Jo-1	Sm B ₁	Sm B	Cenp A	dsDNA
Homojen	Zayıf +	+	Zayıf +	+	+	-	-	+	+
Homojen	-	-	-	-	-	-	-	Kuşkulu	+
Homojen	-	-	-	+	Zayıf +	-	-	-	+
Homojen	Zayıf +	+	+	+	Zayıf +	+	+	Kuşkulu	+
Homojen + stoplazmik	-	+	-	-	-	+	+	-	+
Homojen + stoplazmik	-	-	-	-	Zayıf +	-	-	-	+
Homojen + Fine speckled	-	-	-	+	-	+	+	-	+



Şekil 1. IFA ANA ve anti-dsDNA olumlu olgularda WB ile moleküler ağırlıklarına göre spesifik ANA ve anti-dsDNA sonuçları

KAYNAKLAR

1. Bahar İH, Yılmaz Ö, Yuluğ N, 1995. Antinükleer antikor olumlu (IFAT-ANA) serumlarda *Crithidia luciliae* ve *Leptomonas* antijenleri kullanılarak indirekt floresan antikor (IFA) ve lateks agglütinasyon (LA) yöntemleri ile anti-nativ (ds) DNA antikorları aranması *T Parazitol Derg*, 4: 487-497.
2. Bootsma H, Spronk PE, Borg EJT, Hummel EJ, Boer G, Limburg PC, Kallenberg CGM, 1997. The predictive value of fluctuations in Ig M and Ig G class anti-dsDNA antibodies for relapses in systemic lupus erythematosus. A prospective long term observation. *Ann Rheum Dis*, 56: 661-666.
3. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL, eds., 1989. *Robbins Pathologic Basis of Disease*. Fourth Edition. Philadelphia: WB Saunders Company, pp. 193-202.
4. Egner W, 2000. The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE. *J Clin Pathol*, 53: 424-432.
5. Feltkamp TEW, 1996. Antinuclear antibody determination in a routine laboratory. *Ann Rheum Dis*, 55: 723-727.
6. Fritzler MJ, Salazar M, 1991. Diversity and origin of rheumatologic autoantibodies. *Clin Microbiol Rev*, 4: 256-269.
7. Kern P, Kron M, Hiesche K, 2000. Measurement of antinuclear antibodies : Assessment of different test systems. *Clin Diagn Lab Immunol*, 7: 72-78.
8. Moder KG, 1996. Concise review for primary-care physicians. *Mayo Clin Proc*, 71: 391-396.
9. Smolen JS, Butcher B, Fritzler MJ, Gordon T, Hardin J, Kalden JR, 1997. Reference sera for antinuclear antibodies. Further definition of antibody specificities in international antinuclear antibody reference sera by immunofluorescence and Western blotting. *Arthritis Rheum*, 40: 413-418.
10. Tan EM, Feltkamp TE, Smolen JS, Butcher B, Dawkins R, Fritzler MJ, Gordon T, Hardin JA, Kalden JR, Lahita RG, Maini RN, McDougal JS, Rothfield NF, Smeenk RJ, Takasaki Y, Wiik A, Wilson MR, Koziol JA, 1997. Range of antinuclear antibodies in healthy individuals. *Arthritis Rheum*, 40: 1601-1611.
11. Tan EM, 1982. Autoantibodies to nuclear antigens (ANA) : Their immunobiology and medicine. *Advances in Immunol*, 33: 167-240.
12. Yılmaz Ö, Atabey N, Toptaş F, Bahar İH, Yuluğ N, 1993. Romatik hastalıkların tanısında antinükleer antikorların ve patern değerlendirilmesinin yeri ve önemi. *Ege Tıp Derg*. 32(1-2): 85-103.
13. Yılmaz Ö, Karaman M, Koşar Y, Bahar İH, Yuluğ N, 2001. Antinükleer antikorların saptanmasında indirek immünfloresan, enzim immünassay ve western blot yöntemlerinin karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bült*. 35(3):473-480.
14. Yılmaz Ö, Karaman M, Ergon MC, Bahar İH, Yuluğ N, 2004. Antinükleer antikorların saptanmasında indirek immünfloresan ve enzim immün yöntemlerinin karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bült*. 38(1-2):85-90.