

Anti-dense Fine Speckled 70/lens Epithelium Derived Growth Factor p75 Otoantikoruğun Otoimmün Hastalıklarda Klinik Tanıya Katkısının Araştırılması

Investigation of the Diagnostic Value of Anti-dense Fine Speckled 70/lens Epithelium Derived Growth Factor p75 Autoantibody for Autoimmune Diseases

Gamze TÜRKÖĞLU¹, Rukiye BERKEM², Ayşe Esra KARAKOÇ²

¹ Malatya Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği, Malatya.

¹ Malatya Training and Research Hospital, Clinic of Medical Microbiology, Malatya, Turkey.

² Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği, Ankara.

² Ankara Training and Research Hospital, Clinic of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 17.05.2018 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 14.09.2018

ÖZ

Antinükleer antikor (ANA), hücre nükleusu ve/veya sitoplazmasındaki nükleer antijenlere karşı gelişen otoantikörler olup sistemik otoimmün romatizmal hastalıklar (SORH) için önemli tanı kriterleri arasında yer alır. Günümüzde, ANA'ların saptanması amacıyla geliştirilmiş birçok yöntem bulunmaktadır. Ancak, en eski yöntem olarak bilinen indirekt immünofloresan (IIF) tekniği, halen en yaygın kullanılan yöntemdir. Anti-dense fine speckled 70/lens epithelium derived growth factor p75 (anti-DFS70/LEDGF p75) otoantikor genellikle HEp-2 (insan larenks karsinoma) hücrelerinin kullanıldığı IIF yöntemiyle saptanabilmektedir. Dense fine speckled (DFS) paterni diğer ANA'lar ile birlikte bulunduğu IIF yönteminde maskelenilmekte ve gözden kaçabilmektedir. Anti-DFS70 otoantikoru SORH olanlarda sağlıklı bireylere göre daha düşük sıklıkta görülmektedir. Ayrıca, bu antikörler farklı kronik enflamatuvar durumlarda da (interstisyel sistit, kronik yorgunluk sendromu, atopik dermatit, Vogt-Koyanagi-Harada sendromu) ortaya çıkabilmektedir. Bu çalışmada, IIF yönteminde DFS boyanma paterni gösteren ve göstermeyen hasta serumlarında immüno blot (IB) yöntemi ile anti-DFS70 antikoruğun sıklığını saptamak ve bu antikoruğun SORH tanısının konulmasında ANA test istemi algoritmalarında yer almasının klinik tanıya katkısının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada IIF yöntemi ile DFS paterni görülen 60 ve DFS dışı ANA paternleri görülen 67 hasta serumunda IB yöntemi ile anti-DFS70 otoantikoru araştırılmıştır. IIF-DFS paterni pozitif bulunan 60 hasta serumunun 55 (%91.6)'inde IB yöntemi ile anti-DFS70 pozitif bulunurken, IIF'de DFS dışı paternlerin görüldüğü 67 hasta serumunun 3 (%4.5)'ünde anti-DFS70 pozitif bulunmuştur. IIF-DFS paterni/anti-DFS70 birlikte pozitif bulunan 55 hastanın 6 (%11)'isinin SORH tanısı olup IB ile DFS dışı diğer ANA'lar negatif bulunmuştur. DFS dışı diğer ANA paternlerinin görüldüğü grupta ise SORH tanısı almış olan 22 hastanın hiçbirinde IB yöntemi ile anti-DFS70 pozitifliği bulunmamıştır. IIF-DFS paterni pozitif olan gruptaki 16

(%26.6) örnek romatoloji ve fizik tedavi ve rehabilitasyon (FTR) kliniklerinden gelirken, DFS dışı diğer paternlerin görüldüğü grupta bu sayı 32 (%47.7) olarak bulunmuştur. DFS paterni ise diğer kliniklerden gelen örneklerde, romatoloji ve FTR kliniklerinden gelen örneklerle göre anlamlı olarak daha sık saptanmıştır ($p=0.018$). Bu çalışmada, IIF yöntemi ile DFS paterninin uzmanlar tarafından tanımlanabileceği, düşük titrelerdeki homojen benzeri ve miks paternlerle karışabildiğinden anti-DFS70 otoantikoru saptayabilecek iyi valide edilmiş immünojenik ikinci bir teste ihtiyaç olduğu kanısına varılmıştır.

Anahtar sözcükler: Anti-DFS70; DFS paterni; ANA; otoimmün hastalık.

ABSTRACT

Antinuclear antibodies (ANA) are the autoantibodies that are produced against nuclear antigens in the cell nucleus and/or cytoplasm, and are one of the important diagnostic criteria in systemic autoimmune rheumatic diseases (SARD). Until today, several methods have been developed for detecting ANA's. However, indirect immunofluorescence (IIF) technique, that is also known as one of the oldest methods, is still the most commonly used one. Typically, anti-dense fine speckled 70/Lens epithelium derived growth factor p75 (anti-DFS70/LEDGF p75) autoantibody can be detected via IIF method where in HEP-2 (human larynx carcinoma) cells are used. The dense fine speckled (DFS) pattern method can be masked and remain unnoticed by the IIF method when it exists with the other ANA. Anti-DFS70 autoantibodies seldomly appear in SARD patients compared to healthy individuals. Moreover, these antibodies may appear in different chronic inflammatory conditions like interstitial cystitis, chronic fatigue syndrome, atopic dermatitis and Vogt-Koyanagi-Harada syndrome. The aim of this study was to determine the frequency of anti-DFS70 autoantibodies by immunoblot (IB) method in patients sera with and without DFS70 staining pattern by IIF and to determine if the presence of anti-DFS70 has a clinical impact when included in ANA testing algorithm. In our study, a total of 60 patients' sera in which DFS pattern was defined by IIF method and 67 patients' sera in which other patterns observed were included in the study and anti-DFS70 autoantibody was investigated by IB method in these sera. In 67 patient samples which have shown the other patterns three (4.5%) samples were determined to be anti-DFS70 positive by IB. In 55 patients who were determined to have IIF-DFS pattern (+)/IB anti-DFS70 (+), 6 (11%) were diagnosed as SARD and the other antinuclear antibodies (ANA) were found as negative by IB. In the other group with the other ANA patterns detected, none of the SARD-diagnosed 22 patients had shown anti-DFS70 by IB method. Sixteen (26.6%) samples in the group that was positive for the IIF-DFS pattern were obtained from rheumatology and physical therapy and rehabilitation clinics, 32 (47.7%) samples were from the group in which other patterns observed and were also obtained from those clinics. DFS pattern was detected significantly more frequent in the samples from other clinics in comparison to the samples from rheumatology and physical therapy and rehabilitation clinics ($p=0.018$). In our study, it was concluded that DFS pattern can be defined by IIF method by only specialists, however, since homogeneous-like and mixed patterns can be confused especially in low titers, there is a need for a second well-validated immunological test that could detect anti-DFS70 auto-antibody.

Keywords: Anti-DFS70; DFS pattern; ANA; autoimmune disease.

GİRİŞ

Antinükleer antikor (ANA), hücre çekirdeğindeki nükleer bileşenleri hedef alan heterojen antikorların en yaygın görülenleri arasında yer almaktadır. Sistemik otoimmün romatizmal hastalıkların (SORH) tanısında ve sınıflandırmasında önemli bir yardımcı kriter olduğu kanıtlanmıştır^{1,2}. Bu antikorlar enfeksiyon hastalıkları, kanser, tiroid, romatizmal olmayan hastalıklar ile özellikle 40 yaş üstü kadınlar olmak üzere sağlıklı bireyler ve yaşlılarda serumda saptanabilmektedir³.

ANA saptanmasında altın standart olarak önerilen yöntem HEP-2 hücrelerinin substrat olarak kullanıldığı immüno Floresan (IIF) yöntemidir⁴. Pozitif ANA test sonuçları, 150

farklı nükleer antijene karşı oluşmuş serum antikorlarının etkileşimini gösterebilmektedir. Bu antikorlardan sadece bazıları çok iyi tanımlanmış ve hastalıklarla ilişkilendirilmiş olup, diğer antijen antikor reaksiyonları klinik olarak anlam ifade etmeyebilmektedir⁵. Tüm toplumlarda yaygın gözlenen bir ANA boyanma modeli, interfazdaki hücre nükleoplazmasının yoğun ince benekli şekilde boyanıp nükleolusların boyanmaması ve bölünen hücrelerin kromozomlarının da aynı şekilde daha parlak olarak boyanması şeklinde olmaktadır⁶. Bu boyanmaya neden olan otonükleer antijenler immünblot (IB) testinde yaklaşık 70 kDa'luk büyüklükte bir reaksiyon vermekte olup, bu bant Ochs ve arkadaşları tarafından DFS70 olarak adlandırılmıştır. Protein sekans veri taban analizi aynı zamanda DFS70 nükleer antijeninin, transkripsiyon koaktivatör p75 ve lens kaynaklı epitel büyüme faktörü (LEDGFp75) adı verilen bir protein olduğunu ortaya koymuştur^{7,8}.

Anti-DFS70 otoantikörünün, diğer otoantikörlere göre daha sık ve yüksek titrelerde saptanması, herhangi bir hastalığa özgül olmaması, sistemik otoimmün romatizmal hastalıklar dışındaki bazı enflamatuvar durumlarda ve sağlıklı bireylerde de bulunabilmesinden dolayı klinik ve biyolojik önemi tam olarak anlaşılamamıştır. Bu otoantikor SORH tanısı olanlarda çok düşük sıklıkta bulunmakta olup, sağlıklı görünen bireylerde bunlara göre daha sık görülmektedir⁹. DFS70 antijenine karşı oluşan otoantikörlar birkaç farklı kronik enflamatuvar hastalıkta interstisyel sistit, kronik yorgunluk sendromu, atopik dermatit gibi durumlarda da ortaya çıkabilmektedir¹⁰.

IIF yönteminde HEp-2 hücrelerinin mikroskopik değerlendirilmesi yorumlayan kişinin bilgi ve deneyimine bağlıdır, bu nedenle laboratuvar içi ve laboratuvarlar arası sonuçlar farklı olabilmektedir. Bu konuda uzman olmayan bir kişi tarafından yorumlandığında anti-DFS70/LEDGF p75 otoantikörünü diğer nükleer otoantikörlardan ayırt etmek zor olabilmekte ve DFS paterni, diğer ANA paternleriyle karışabilmektedir. DFS paterninin ve diğer ANA paternlerinden ayırt edilememesi, antikor pozitif bireylerde tekrarlayan negatif sonuçların alınmasına ve doğru olmayan SORH tanılarına yol açabilmektedir. Bu nedenle, araştırmacılarda anti-DFS70/LEDGF p75 otoantikörünün saptanması için tek bir ANA test yönteminin yeterli olmadığı konusunda artan fikir birliği bulunmaktadır⁹.

Bu çalışmada, IIF yöntemi ile DFS paterninin görüldüğü hasta serumlarında anti-DFS70 otoantikörünün IB yöntemi ile doğrulanması ve bu otoantikörün SORH tanısında klinik tanıya katkısının olup olmadığının gösterilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Klinik Olarak Tanımlanmış Örnekler

Kasım 2015-Şubat 2016 tarihleri arasında laboratuvarımıza farklı kliniklerden gelen, Hep-20-10 hücrelerinde IIF yöntemiyle tanımlanan, 1/100 ve daha yüksek titrede DFS paternine sahip 60 hasta serumu ve diğer ANA paternlerine sahip 67 hasta serumu çalışmaya dahil edildi. IIF ile değerlendirilen 127 hasta serumunda IB yöntemiyle anti-DFS70 antikor ve diğer nükleer antikorlar araştırıldı. Hastaların SORH tanıları ve klinik verileri hasta kayıtları incelenerek tespit edildi.

İndirekt İmmüno Floresan (IIF) Yöntemi

IIF yönteminde, IIFT Mosaic: Hep-20-10/Liver (Monkey) Kiti ve FITC işaretli anti-insan IgG (Euroimmun, Almanya) kullanıldı. Üretici firmanın önerdiği 1/100 başlangıç dilüsyonu ile tarama yapıldı. Tarama dilüsyonunda görüntünün parlaklığına göre sonuçlar zayıf pozitif (1/100) ve +4 ($> 1/3200$) arasında kalitatif olarak EUROStar III plus marka floresan mikroskobu ile $\times 40$ büyütmede değerlendirildi. Değerlendirme, bu konuda uzman iki ayrı kişi tarafından birbirinden bağımsız olarak aynı gün, farklı zamanlarda yapıldı. Uyumsuz sonuçlar tekrar değerlendirilerek ortak karar alındı.

İmmünblot Yöntemi

Çalışmaya dahil edilen 127 hasta serumuna, nitroselüloz membran üzerinde paralel çizgiler halinde sıralanmış ve kontrol bandı ile birlikte rekombinant ve yüksek oranda saf-laştırılmış nRNP/Sm, Sm, SSA, Ro-52, SSB, Scl-70, PM-Scl, Jo-1, CENP-B, PCNA, dsDNA, nucleosomes, histones, ribosomal protein-P, AMA-M2 ve DFS70 (eksprese insan cDNA) antijenleri ile kaplanmış; ANA Profile 3plus DFS70 DL 1590-1601-30 G kiti (Euroimmun/Almanya) kullanılarak nükleer antijen tip tayini yapıldı. IIF yöntemi ile uyumsuz bulunan sonuçlarda, hasta örnekleri eş zamanlı olarak her iki yöntem ile tekrar çalışıldı ve değerlendirildi.

İstatistiksel Analiz

Verilerin değerlendirilmesinde; tanımlayıcı istatistiklerden sayısal ölçümler için ortalama $\pm$ standart sapma, ortanca değerleri ile niteliksel ölçümler için sayı ve yüzdeler kullanıldı. IIF paterni gruplarında yaş dağılımının normal dağılım gösterip göstermediği Shapiro Wilk testi ile test edildi. Test sonucunda yaşların normal dağılım göstermediği görüldü. Dolayısıyla iki grupta yaş karşılaştırmaları Mann-Whitney U testi ile yapıldı. IIF paterni gruplarında cinsiyet, poliklinik/klinik, tanı, IB yönteminde anti-DFS70 pozitifliği gibi niteliksel ölçümlerin karşılaştırılmasında çapraz tablo analizlerinden ve ki-kare analizinden yararlanıldı. IIF yöntemindeki floresan şiddeti ile IB yöntemi ile saptanan anti-DFS70 sinyal eşik değeri arasındaki korelasyona ise parametrik olmayan Spearman korelasyon katsayısı ile bakıldı. İstatistiksel önemlilik için $p < 0.05$ ise anlamlı kabul edildi ve istatistiksel analizlerin tümünde IBM-SPSS 21.0 for Windows paket programı kullanıldı.

BULGULAR

IIF yöntemi ile DFS paterni görülen grupta yer alan 60 hastanın 45 (%75)'i kadın, 15 (%25)'i erkek olarak tespit edilmiştir ($p = 0.01$) (Tablo I). Hastaların yaş aralığı 5-77 arasında olup, yaş ortalaması 34.2 ± 18.4 yıl olarak saptanmıştır. DFS paterni görülen gruptaki hastaların yaşlarının daha çok ikinci ve üçüncü dekatlar arasında olduğu saptanmıştır ($p = 0.04$) (Tablo II).

Serum örnekleri romatoloji, fizik tedavi ve rehabilitasyon (FTR), dermatoloji, çocuk sağlığı ve hastalıkları, genel dahiliye, göz hastalıkları, gastroenteroloji, ortopedi, nöroloji, hematoloji, nefroloji, endokrinoloji, aile hekimliği ve diğer klinikler (plastik cerrahi, en-

Tablo I. Hasta Gruplarının Yaş ve Cinsiyet Dağılımı

	IIF DFS paterni pozitif hasta grubu (%)	IIF diğer paternleri pozitif hasta grubu (%)
Kadın	45 (75)	54 (80.6)
Erkek	15 (25)	13 (19.4)
Yaş aralığı	5-77	8-80
Yaş ortalaması	34.2 ± 18.4	45 ± 16.8

Tablo II. Hasta Yaşlarının Dekatlara Göre Dağılımı

Dekatlar	IIF DFS paterni pozitif hasta grubu (%)	IIF diğer paternleri pozitif hasta grubu (%)
0-10	5 (8.3)	1 (1.5)
11-20	14 (23.4)	5 (7.5)
21-30	11 (18.3)	6 (9)
31-40	9 (15)	14 (20.8)
41-50	9 (15)	12 (17.9)
51-60	4 (6.7)	19 (28.3)
61-70	5 (8.3)	5 (7.5)
71-80	3 (5)	5 (7.5)
Toplam	60 (100)	67 (100)

feksiyon hastalıkları, çocuk alerji ve immünoloji, acil servis) olmak üzere farklı klinik ve polikliniklerden toplanmıştır (Tablo III). DFS paterni görülen gruptaki hasta serumlarının 16 (%26.6)'sı romatoloji (n= 14) ve FTR (n= 2) kliniklerinden gelmiştir. DFS dışı diğer paternlerin görüldüğü grupta bu sayı 32 (%47.7) olarak belirlenmiştir. DFS paterni diğer kliniklerden gelen örneklerde, romatoloji ve FTR kliniklerinden gelen örnekler göre daha sık saptanmıştır (p= 0.018). DFS paterni görülen hasta serumlarının en sık dermatoloji polikliniğinden (n= 16, %26.7) geldiği gözlenmiştir.

SORH görülme sıklığı, DFS paterni görülen hasta grubunda %11.7, diğer paternlerin görüldüğü hasta grubunda ise %32.8 olarak bulunmuştur (p= 0.006). DFS paterni görülen grupta, SORH tanısı alan hastaların altısında [romatoid artrit (RA) (n= 3); sistemik skleroderma (SSc) (n= 2); Sjögren sendromu (SS) (n= 1)] anti-DFS70 antikoru pozitif, diğer ANA'lar negatif bulunmuştur. Bir hastada [RA (n= 1)] ise hem anti-DFS70 antikoru hem de diğer ANA'lar negatif bulunmuştur. Diğer paternlerin görüldüğü grupta ise SORH tanısı alan 22 hastanın [RA (n= 8); SS (n= 10); SSc (n= 2); ilaca bağlı sistemik lupus eritematozus (SLE) (n= 1); primer biliyer siroz (n= 1)] hiçbirinde anti-DFS70 antikoru pozitif bulunmamıştır (Tablo IV).

Tablo III. Hasta Serumlarının Geldiği Kliniklere Göre Dağılımı

Klinik/Poliklinik	IIF DFS paterni pozitif hasta grubu (%)	IIF DFS dışı paternleri pozitif hasta grubu (%)
Romatoloji	14 (23.3)	27 (%40.3)
FTR	2 (3.3)	5 (%7.4)
Dermatoloji	16 (26.7)	11 (%16.4)
Çocuk sağlığı ve hastalıkları	5 (8.3)	1 (%1.5)
Genel dahiliye	4 (6.6)	1 (1.5)
Göz hastalıkları	3 (5)	3 (4.5)
Gastroenteroloji	1 (1.7)	5 (7.4)
Ortopedi	1 (1.7)	1 (1.5)
Nöroloji	1 (1.7)	3 (4.5)
Hematoloji	1 (1.7)	2 (3)
Nefroloji	1 (1.7)	1 (1.5)
Endokrinoloji	1 (1.7)	1 (1.5)
Aile hekimliği	6 (10)	3 (4.5)
Diğer klinikler	4 (6.6)	3 (4.5)
Toplam	60 (100)	67 (100)

Tablo IV. Hasta Gruplarının Sitemik Otoimmün Romatizmal Hastalık Tanılarına Göre Dağılımı

IB Testi	IIF DFS paterni pozitif hasta grubu (%)		IIF diğer paternleri pozitif hasta grubu (%)	
	Anti-DFS70 pozitif (%)	Anti-DFS70 negatif (%)	Anti-DFS70 pozitif (%)	Anti-DFS70 negatif (%)
SORH pozitif	6 (10)	1 (1.7)	0 (0)	22 (32.8)
SORH negatif	49 (81.7)	4 (6.6)	3 (4.4)	42 (62.8)
Toplam	55 (91.7)	5 (8.3)	3 (4.4)	64 (95.6)

IIF yönteminde DFS paterni görülen hasta grubunda 60 hastanın 55 (%91.7)'inde IB yöntemi ile anti-DFS70 antikoru pozitif saptanırken, diğer ANA paternlerinin görüldüğü (granüler, n= 25; granüler ve homojen, n= 37; homojen, n= 2; nükleoler ve homojen, n= 1; sentromer, n= 2) 67 hastanın 3 (%4.5)'ünde anti-DFS70 antikoru pozitif saptanmıştır (p= 0.0001). IIF yönteminde DFS paterni (+)/Anti-DFS70 (-) olan beş hastadan dördünün floresan şiddeti zayıf pozitif, bir hastanın ise bir pozitif şiddetinde saptanırken, IIF DFS dışı paternler/anti-DFS70 pozitif olan üç hastada ise bir pozitif granüler ve nükleer homojen boyanma paterni bulunmuştur (Tablo V, VI).

Tablo V. IIF Yönteminde DFS Paternlerinin Floresan Şiddetlerine Göre Dağılımı ve Anti-DFS70 Antikor Durumu

IIF DFS Paterni floresan şiddeti	Anti-DFS70 pozitif	Anti-DFS70 negatif
Zayıf pozitif granüler ve granüler kromozom	-	4
+ granüler ve granüler kromozom	34	1
++ granüler ve granüler kromozom	13	-
+++ granüler ve granüler kromozom	7	-
++++ granüler ve granüler kromozom	1	-
Toplam	55	5

Tablo VI. IIF Yönteminde Diğer Paternlerin Floresan Şiddetlerinin Dağılımı ve anti-DFS70 Antikor Durumu

IIF diğer paternler ve floresan şiddetleri	Anti-DFS70 pozitif	Anti-DFS70 negatif
Zayıf pozitif granüler	-	1
Zayıf pozitif granüler ve nükleer homojen	-	5
+ Granüler	-	1
+ Granüler ve zayıf nükleer homojen	3	-
+ Granüler ve nükleer homojen	-	21
++ Granüler	-	2
++ Granüler ve nükleer homojen	-	4
++ Nükleer homojen	-	1
++ Nükleolar ve + nükleer homojen	-	1
+++ Granüler	-	8
+++ Nükleer homojen	-	1
+++ Granüler ve nükleer homojen	-	1
++++ Granüler	-	13
++++ Granüler ve nükleer homojen	-	3
++++ Sentromer	-	2
Toplam	3	64

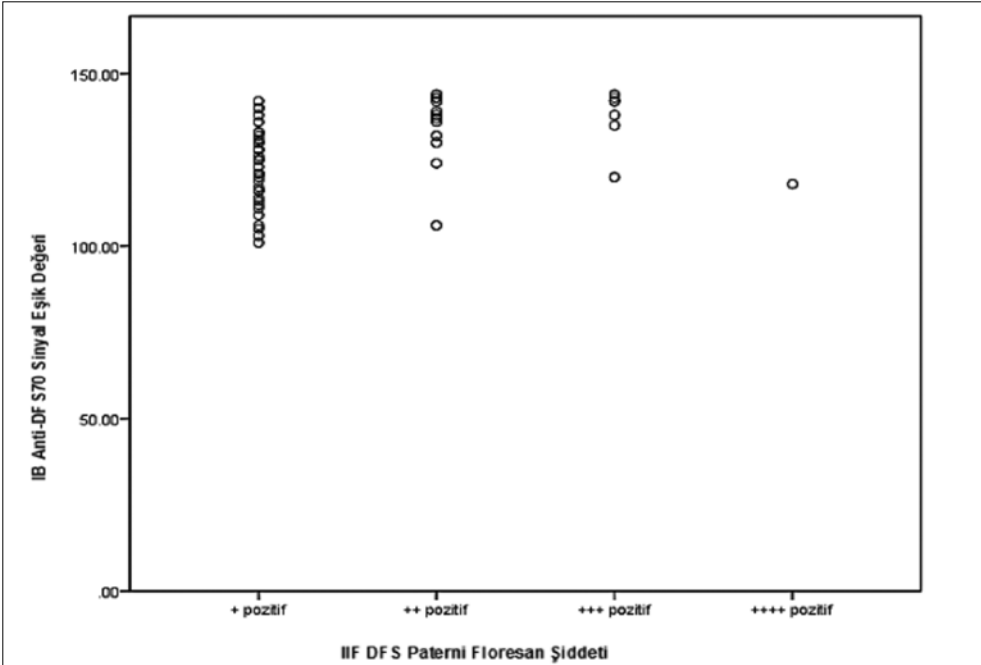
DFS paterninin görüldüğü grupta anti-DFS70 pozitifliği saptanan 55 hastada herhangi bir başka antikor pozitifliği saptanmamıştır.

Çalışmamızda DFS paterni; IIF yöntemi ile saptanmaya ve anti-DFS70 antikoruna özgül olarak hazırlanmış IB yöntemi ile doğrulanmaya çalışıldığında; DFS paterninin saptanmasında IIF yönteminin duyarlılığı %95, özgüllüğü %93, pozitif prediktif değeri %92, negatif prediktif değeri %95 olarak tespit edilmiştir (Tablo VII).

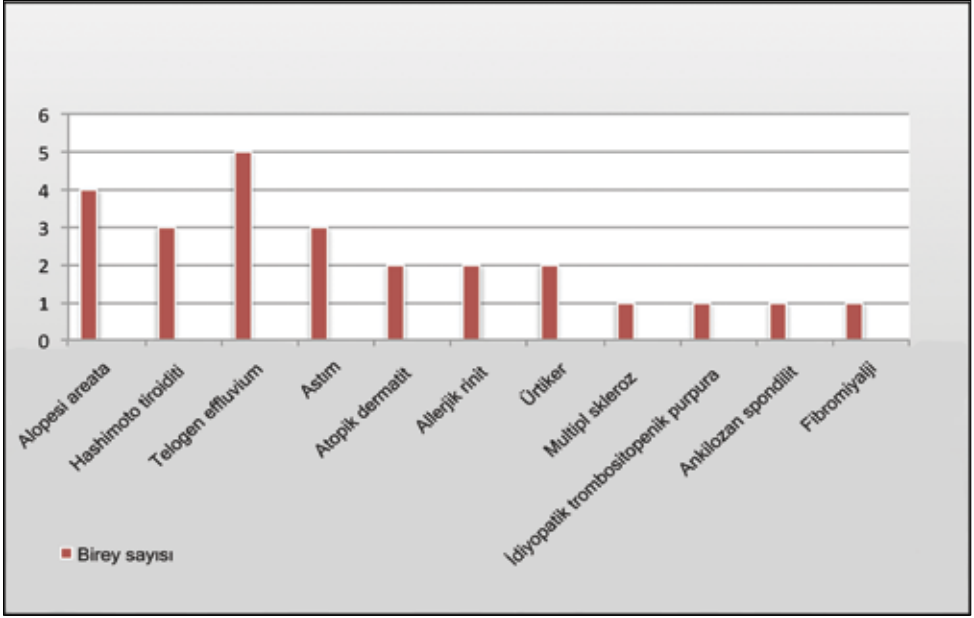
IIF DFS paterni/anti-DFS70 birlikte pozitif olan hasta serumlarının IIF yönteminde saptanan floresan şiddeti ve IB yöntemindeki anti-DFS70 sinyal eşik değeri arasında Spearman rho testiyle yapılan analizde, iki parametre arasında orta düzeyde uyum saptanmıştır ($p= 0.001$, $\rho= 0.49$) (Şekil 1).

Tablo VII. DFS paterninin saptanmasında IIF testi ve IB doğrulama testinin değerlendirilmesi

IIF Testi	IB Testi		Toplam
	Anti-DFS70 pozitif	Anti-DFS70 negatif (%)	
DFS paterni pozitif	55	5	60
DFS paterni negatif	3	64	67
Toplam	58	69	127



Şekil 1. IIF DFS paterni (+)/Anti-DFS70 (+) hasta serumlarında floresan şiddetlerinin ve IB testinde anti-DFS70 sinyal eşik değerlerinin arasındaki uyum.



Şekil 2. Anti-DFS70 pozitif hastalarda klinik tanılar.

Anti-DFS70 pozitif 58 hastanın klinik tanıları incelediğinde; 5 (%8.6)'inde telogen effluvium, 4 (%6.9)'ünde alopesi areata, 3 (%5.2)'er hastada Hashimoto tiroiditi ve astım, 2 (%3.4)'şer hastada atopik dermatit, allerjik rinit ve ürtiker, 1 (%1.7)'er hastada multipl skleroz, idiyopatik trombositopenik purpura, ankilozan spondilit ve fibromiyalji saptanmıştır (Şekil 2).

TARTIŞMA

Anti-DFS70 otoantikoru, SORH tanısı olan hastalarda saptandığında genellikle diğer SORH'lere spesifik otoantikorlar ile birlikte bulunmaktadır. Ancak, bu boyanma paterni tek başına saptanması durumunda SORH tanısını ekarte edebileceği bildirilmektedir. Bu da anti-DFS70 otoantikorunun SORH tanısını ekarte etmede yararlı bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini ve geliştirilen algoritmalarda yer almasının klinik yararının olabileceğini düşündürmektedir⁹.

Miyara ve arkadaşlarının¹¹ yaptıkları bir çalışmada IIF yönteminde DFS paternine sahip 100 hastanın 12'si SORH tanısı alırken, diğer paternlerin görüldüğü grupta 100 hastanın 58'i bu tanıyı almıştır. Lee ve arkadaşları¹² IIF yönteminde DFS paterni gösteren 181 hasta ve kontrol grup olarak da diğer paternlerin görüldüğü 50 hasta olmak üzere toplamda 231 hastanın klinik verilerini inceleyerek 60 hastada ANA ilişkili romatizmal hastalık saptamışlar ve bu hastaların sadece 4 (%6.7)'ünde ELISA yöntemi ile anti-DFS70 antikorunu pozitif, diğer ANA'ları negatif bulmuşlardır. Bizzaro ve arkadaşları¹³ da otoimmün hastalığa sahip 50 hastada [SLE (n= 10), skleroderma (n= 10), SS (n= 10), polimiyozit (n= 10) ve ANA negatif Hashimoto tiroiditi (n= 10)] anti-DFS70 antikorunu göstermek amacıyla

CIA yöntemini kullanmışlar ve pozitif sonuç tespit etmemişlerdir. SLE tanısı konmuş 251 hasta ile yapılan bir çalışmada anti-DFS70 antikor sıklığı %2.8, 124 bireyden oluşan sağlıklı grupta ise %8.9 olarak bildirilmiştir¹⁴. Mariz ve arkadaşları¹⁵ DFS paternini IIF yöntemi ile araştırmışlar ve 918 sağlıklı bireyin 39 (%4.2)'unda pozitif sonuç bulurken, 153 SORH tanısı olan hastanın ise hiçbirinde pozitif sonuç bulmamıştır. Çalışmamızda, DFS paterni gösteren 60 hastanın 7 (%11.7)'si SORH tanısı alırken, diğer paternlerin görüldüğü grupta 67 hastanın 22 (%32.8)'si SORH [RA (n= 8); SS (n= 10); SSc (n= 2); PBS (n= 1); ilaca bağlı SLE (n= 1)] SORH tanısı almıştır. Diğer bir deyişle SORH tanılı 29 hastanın 6 (%20.7)'sında anti-DFS70 antikoru pozitif olarak gözlenirken, diğer ANA'lar negatif olarak saptanmıştır. Çalışmamızda anti-DFS70 antikorunun pozitif saptanma sıklığının diğer çalışmalara göre yüksek olmasının nedeni klinisyenlerce DFS paterninin yeterince anlaşılabilmesi nedeniyle, ANA pozitif sonuçların gereksiz endişeye yol açması ve hatalı SORH tanıların ortaya çıkması şeklinde yorumlanabilir.

Literatürde, anti-DFS70 antikorunun daha çok gençlerde görüldüğü saptanmış olup, sebebinin DFS70 antijeninin timus dokusunda diğer dokulara göre daha fazla eksprese edilmesi; ileri yaşla beraber görülme sıklığının azalmasının ise timus dokusunun yıllar içinde atrofiye uğramasından kaynaklanabileceği bildirilmiştir^{7,16}. Watanabe ve arkadaşları¹⁶ anti-DFS70 antikoru pozitif 64 hastada, yaş ortalamasını kadınlarda 28 ± 6 , erkeklerde 30 ± 5 olarak bulmuşlardır. Okamoto ve arkadaşları¹⁷ da anti-DFS70 antikoru pozitif saptanan 22 alopesi hastasının 11 (%50)'inin, sekiz sağlıklı bireyin de 6 (%75)'sinin yaş ortalamasının ikinci ve üçüncü dekatlar arasında olduğunu saptamışlardır. Çalışmamızda da anti-DFS70 antikor pozitifliği ikinci ve üçüncü dekatlar arasında ve kadınlarda daha sık bulunmuştur.

IIF yöntemi ile HEp-2 hücrelerinde DFS paterni saptanabilmesine rağmen, doğru şekilde tanımlayabilmek kolay değildir¹⁸. Bizzarro ve arkadaşları¹⁹ IIF yönteminde DFS paterni gösteren orta ve yüksek titrelerdeki hasta serum örneklerinin, %86'sının DFS70 antijenine özgül ELISA yöntemiyle tanımlanmasında başarısızlık olduğuna dikkat çekmişlerdir. Bu örneklerin analizinde farklı ticari kitlerin kullanılması HEp-2 slaytlarında tutarsız sonuçlara neden olmuştur. Araştırmacılar tutarsız sonuçları farklı HEp-2 substratlarının hazırlanmasına, ELISA yönteminde DFS70/LEDGF p75 epitop tipine ve IIF yönteminde DFS paterninin deneyimsiz kişiler tarafından yorumlanmasına bağlamışlardır¹⁸. Mahler ve arkadaşları¹⁴ çalışmalarında anti-DFS70 pozitif saptanan yedi SLE hastasının altısında daha önce tanımlanandan farklı tipte bir DFS boyanma paterni gördüklerini bildirilmişlerdir. Tutarsız sonuçlarla ilgili diğer bir sebep ise IIF yönteminde DFS paterni gösterebilen DFS70/LEDGF p75'ten farklı bir nükleer otoantijenin varlığının olmasıdır. DFS70/LEDGF p75 transkripsiyon düzenlenmesi ile ilişkili nükleoprotein kompleksinin bir parçasıdır. IIF yönteminde DFS70/LEDGF p75'in, DFS paternine benzer bir patern oluşturabilen proteinlerle etkileşim içinde olup onlarla bir arada bulunduğu saptanmıştır^{18,20,21}. Bizzarro ve arkadaşları²² yaptıkları başka bir çalışmada da DFS paterni gösteren 576 hastanın 175 (%30.4)'ünde anti-DFS70 antikoru CIA yöntemiyle pozitif bulmuşlar ve daha spesifik bir yöntem olan CIA yöntemi kullanıldığında serumların yalnızca bir kısmının pozitif ol-

duğunu, IIF yönteminde ise DFS paterninin yeterince doğru olarak tanımlanamadığını belirtmişlerdir. DFS paterninin IIF yönteminde yeterince doğru tanımlanamamasının, kişilerin yorumları arasındaki değişkenlik, laboratuvar personelinin DFS paternini tanımadaki yetersizliği ve HEp-2 hücrelerinde kullanılan çeşitli substratların farklı duyarlılıklarda olmasından kaynaklandığını belirtmişlerdir^{13,22}.

IIF yönteminde DFS paterninin klinik laboratuvarlarda önceleri tanınıp tanınmadığı net değildir^{18,23}. DFS paterninin homojen benzeri paternlerden ayrımı rutin laboratuvarları zorlamaktadır^{18,24}. Çalışmamızda IIF yönteminde DFS paterni gösteren 60 hastanın 55 (%91.6)'inde, diğer paternleri gösteren 67 hastanın ise 3 (%4.5)'ünde IB yöntemi ile anti-DFS70 antikorunu pozitif bulunmuştur. IIF yöntemindeki DFS paterni floresan şiddeti ve IB testindeki anti-DFS70 sinyal eşik değeri arasında orta düzeyde uyum saptanmıştır ($\rho = 0.49$, $p < 0.001$). IIF yönteminde, düşük titrelerdeki DFS paterni ve metafazdaki kromatin bantlarını değerlendirmenin güç olduğu tespit edilmiştir. DFS'deki kromatin bantlarının homojen benzeri patern ve mikst boyanma (granüler ve homojen) paternlerindeki kromatin bantlarından ayrımının zor olduğu; anti-DFS70 negatif bulunan dört hastanın kromatin bantlarının floresan şiddeti zayıf olduğu için değerlendirme hatası olabileceği düşünülmüştür. Diğer paternlerin görüldüğü grupta ise anti-DFS70 antikor pozitifliği saptanan üç hastada bir pozitif şiddetinde granüler ve nükleer homojen boyanma paterni gözlenmiş olup mikst boyanma paterni görülmesinin DFS paternini maskeleyiş olabileceği, özellikle düşük titrelerdeki pozitifliklerin değerlendirilmesinin daha zor olması nedeniyle ANA patern tanımlama hatalarına yol açabileceği kanısına varılmıştır. Yapılan çalışmalar bizim bulgularımızı destekleyici yönde olup, anti-DFS70 antikorunun doğru şekilde tanımlanmasında, IIF yöntemine ek olarak IB, CIA veya ELISA yöntemlerinden herhangi birisinin kullanılarak doğrulama yapılması ve testlerin konunun uzmanları tarafından yorumlanması önerilmektedir^{18,25}.

Sonuç olarak, doğru tanımlama için hastalarda tek bir ANA test yöntemi kullanılmamalı; bu antikorların doğrulanmasında tanı algoritmasına iyi valide edilmiş daha spesifik ikinci bir immünolojik test eklenmelidir. IIF yönteminde DFS paterni diğer ANA'larla birlikte bulunduğunda, düşük titrelerdeki pozitiflikler tanımlanamamakta ve gözden kaçabilmektedir. Anti-DFS70 pozitifliği diğer ANA'larla birlikte bulunduğunda hastanın klinik bulguları ile birlikte değerlendirilmeli, klinik tanı ve takibinin planlanmasında laboratuvar ile iletişim içinde bulunulması önerilmelidir.

KAYNAKLAR

1. Suurmond J, Diamond B. Autoantibodies in systemic autoimmune diseases: specificity and pathogenicity. *J Clin Invest* 2015; 125(6): 2194-202.
2. Mahler M, Fritzler MJ. Epitope specificity and significance in systemic autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1183: 267-87.
3. Solomon DH, Kavanaugh AJ, Schur PH. American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Immunologic Testing Guidelines. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: antinuclear antibody testing. *Arthritis Rheum* 2002; 47(4): 434-44.

4. Bayer BF, Fabian B, Hübl W. Immunofluorescence assays (IFA) and enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) in autoimmune disease diagnostics-technique, benefits, limitations and applications. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 2001; 235: 68-76.
5. Abeles AM, Abeles M. The clinical utility of a positive antinuclear antibody test result. *Am J Med* 2013; 126(4): 342-8.
6. Ganapathy V, Casiano CA. Autoimmunity to the nuclear autoantigen DFS70 (LEDGF): what exactly are the autoantibodies trying to tell us? *Arthritis Rheum* 2004; 50(3): 684-8.
7. 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.
8. Singh DP, Ohguro N, Kikuchi T, 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(1): 373-81.
9. Basu A, Sanchez TW, Casiano CA. DFS70/LEDGF p75: an enigmatic autoantigen at the interface between autoimmunity, AIDS, and cancer. *Front Immunol* 2015; 6: 116.
10. Ochs RL, Muro Y, Si Y, et al. Autoantibodies to DFS 70 kd/transcription coactivator p75 in atopic dermatitis and other conditions. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105(6): 1211-20.
11. Miyara M, Albesa R, Charuel J-L, et al. Clinical phenotypes of patients with anti-DFS70/LEDGF antibodies in a routine ANA referral cohort. *Clin Dev Immunol* 2013; 2013: 703759.
12. Lee H, Kim Y, Han K, et al. 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(2): 122-8.
13. Bizzaro N, Tonutti E, Tampoia M, et al. Specific chemoluminescence and immunoassorption tests for anti-DFS70 antibodies avoid false positive results by indirect immunofluorescence. *Clin Chim Acta* 2015; 451(Pt B): 271-7.
14. Mahler M, Parker T, Peebles CL, et al. Anti-DFS70/LEDGF antibodies are more prevalent in healthy individuals compared to patients with systemic autoimmune rheumatic diseases. *J Rheumatol* 2012; 39(11): 2104-10.
15. Mariz HA, Sato EI, Barbosa SH, et al. 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(1): 191-200.
16. Watanabe A, Kodera M, Sugiura K, et al. Anti-DFS70 antibodies in 597 healthy hospital workers. *Arthritis Rheum* 2004; 50(3): 892-900.
17. Okamoto M, Ogawa Y, Watanabe A, et al. Autoantibodies to DFS70/LEDGF are increased in alopecia areata patients. *J Autoimmun* 2004; 23(3): 257-66.
18. Ochs RL, Mahler M, Basu A, et al. The significance of autoantibodies to DFS70/LEDGF p75 in health and disease: integrating basic science with clinical understanding. *Clin Exp Med* 2016; 16: 273-93.
19. Bizzaro N, Tonutti E, Visentini D, et al. Antibodies to the Lens and Cornea in Anti-DFS70-Positive Subjects. *Ann NY Acad Sci* 2007; 1107(1): 174-83.
20. Leoh LS, van Heertum B, De Rijck J, et al. The stress oncoprotein LEDGF/p75 interacts with the methyl CpG binding protein MeCP2 and influences its transcriptional activity. *Mol Can Res* 2012; 10(3): 378-91.
21. Maertens GN, Cherepanov P, Engelman A. Transcriptional co-activator p75 binds and tethers the Myc-interacting protein JPO2 to chromatin. *J Cell Sci* 2006; 119(12): 2563-71.
22. 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. *Arthritis Rheum* 2011; 63(12): 4036-7.
23. Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, et al. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2003; 349(16): 1526-33.
24. Fritzler MJ. The antinuclear antibody test: last or lasting gasp? *Arthritis Rheum* 2011; 63(1): 19-22.
25. Mahler M, Hanly JG, Fritzler MJ. Importance of the dense fine speckled pattern on HEp-2 cells and anti-DFS70 antibodies for the diagnosis of systemic autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2012; 11(9): 642-5.