



OTO-ANTİKORLARIN TANISINDA YENİ YÖNTEMLER

Doç.Dr Orhan Cem AKTEPE
Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi

XXXIV.Türk Mikrobiyoloji Kongresi , Girne 7-11 Kasım 2010



ACR ANA Task Force önerileri

- ANA testlerinde IFA altın standard kabul edilir.
- Laboratuvarlar mikro-bead temelli multiplex platformlar, dot-blot testleri veya ELISA ile ANA testi yaptıklarında da bu yöntemlerin özgüllüğü ve duyarlılığı IFA ile kıyaslanabilir aralıkta olmalıdır.
- Bu yöntemler için ulusal ve / veya uluslararası belirlenmiş (WHO gibi) standartlara uyulmalıdır.
- Laboratuvarlar ANA raporu verirken hangi yöntemi kullandıklarını belirtmelidir.

Yeni Testler – Eski Testler

- 1-ELISA Testleri
- 2-Dot-Blot Testleri
- 3-Mikro- Boncuk Testleri
- 4-Counter immünoelektroforez (CIE)
- 5-İmmünopresipitasyon (Farr)
- 6-Hemaglütinasyon, Lateks aglütinasyon

Parametreler

- ANA
- Anti-DNA
- RNP /Sm antijen
- Anti-histon
- SS-A,SS-B
- Scl-70, centromer
- PM-Scl
- Jo-I

Parametreler

- ENA
- ASMA
- AMA-M2
- LKM, LC-I
- SLA / LP
- Anti-Gliadin
- Anti-Transglutaminaz
- Anti-TPO, Anti- Tg

Parametreler

- Anti-İnsülin
- Anti-Parietal cell
- Anti-GBM
- ANCA
- Anti-PR3, Anti-MPO
- Anti-BPI
- Anti-Elastaz
- Anti-Lizozim

Parametreler

- Anti-CCP
- Anti- CVM
- Anti-Cardiolipin
- Anti-Fosfatidil Serin
- Anti-Fosfatidil İnositol
- Anti-Anexin
- Anti-Protrombin



www.hayalevi.com

ELISA TESTLERİ

- ELISA testleri oto-antikorların saptanmasında en yaygın kullanılan yöntemler arsındadır.
- Sistemler,
- Mikro-ELISA
- Kemilüminesans
- Strip -ELISA

ELISA Uygulamaları

- ANA ve ENA profilleri en sık kullanım alanı bulan testlerdir.
- Uygulamadaki başarı nedeniyle, anti-ds-DNA ELISA diğer yöntemlere göre tercih edilmektedir.
- Tiroid oto-antikor parametreleri ikinci sıklıkta yaygın kullanılan testlerdir.
- Tüm oto-antikorların ELISA versiyonları bulunmakta ve kullanılmaktadır.

Kullanım kolaylığı

- Örnek döngüsü yüksek laboratuvarlarda , otomatize ELISA sistemleri uygulama kolaylığı ve ekonomik olmaları nedeniyle tercih edilmektedir.
- Örnek sayısının daha az olduğu merkezler ise sonuçların bekleme süresini azaltmak için , strip-ELISA esaslı sistemlerle hastalara anında sonuç vermeyi seçmektedirler.

Değişik ELISA Kitleriyle Saptanan ANA Pozitifliğinin IFA Sonuçlarına Göre Kıyaslanması

Çalışma	IFA Pozitifliği	ELISA Pozitifliği	
Bernardini 2004 (n:55)	%91 (1:80)	Radim	%87
		EIA Zeus	%89
		VarElisa ReCombi	%78
Fenger 2004 (n:35)	%97 (1:160)	Quanta Life	%100
		Bio-Rad	%94
		Relisa	%100
		UniCap	%62

DOT-BLOT TESTLERİ

- Dot-blot testleri, nitroselüloz membranlar üstüne SDS-PAGE yardımıyla yerleştirilen oto-antijenler şeklindedir.
- Aynı grupta yer alan (ANA alt bileşenleri gibi) birden fazla oto-antikörün spesifik bantlar oluşturarak saptanmasını sağlar.
- Bu yapılarıyla hızlı ve güvenilir sonuç veren test sistemleridir.

Dot-blot uygulamaları

- Bu uygulamalar için semi-otomatik ve tam otomatik Dot-Blot cihazları geliştirilmiştir.
- Cihazlarda kullanılan yazılımlarla daha önce gözle değerlendirilen striplerde,
- Bantların **Net, Kantitatif** değerlendirilebilir, görüntüleri **Saklanabilir** (Arşivlenebilir) olması ve hastaların seyri esnasında test sonuçlarının karşılaştırılabilmesi sağlanmıştır.

**AUTOMATED
EUROBlotMaster**



3.5 hrs
Incubation (up to 30 strips)

**AUTOMATED
EUROBlotCamera
+
EUROLineScan
software**

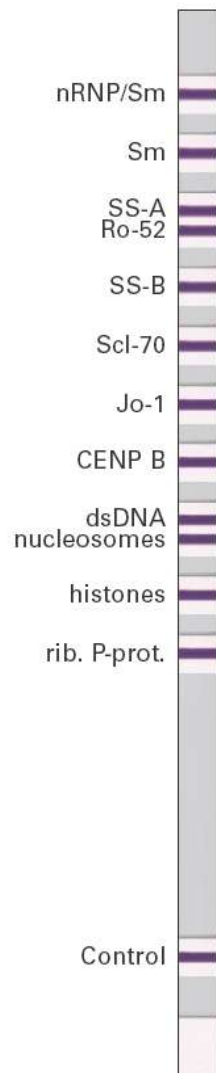


2 min
Evaluation

Dot-Blot Profilleri

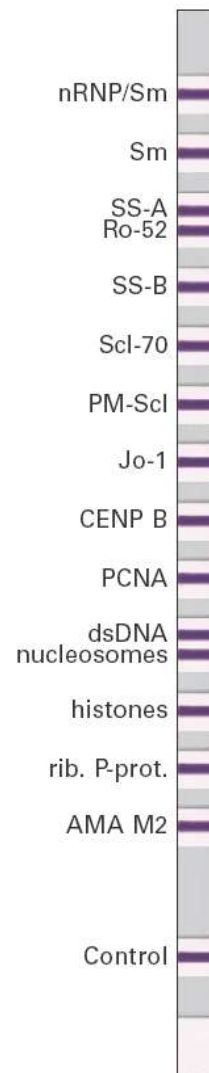
- Dot-Blot sistemleriyle başta ANA ve ENA profillerindeki alt gruplar olmak üzere sistemik ve bir çok organ spesifik oto-antikorlar bakılabilmektedir.
- Bunlardan ANCA profili alt grupları, anti-tiroid antikorları, anti-GBM ve hepatobilier grup oto-antikorlar başlıcalarıdır.
- Yanısıra neuronal dokulara karşı gelişen oto-antikorlar ve myozit profili de vardır.

ANA Profile 1



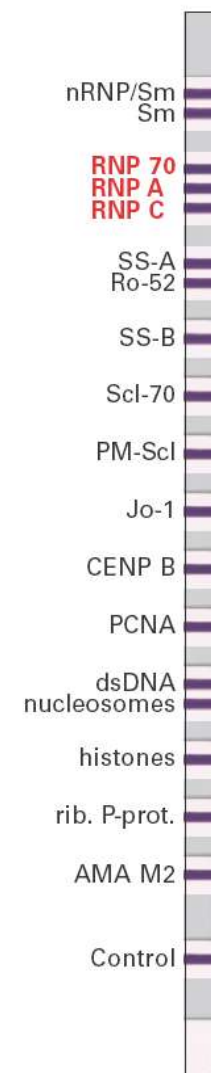
DL 1590-1601-8 G

ANA Profile 3



DL 1590-1601-3 G

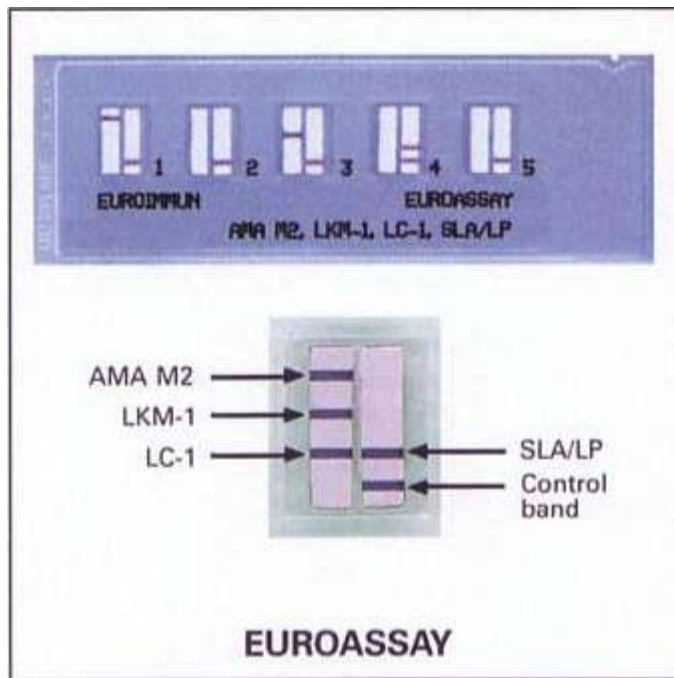
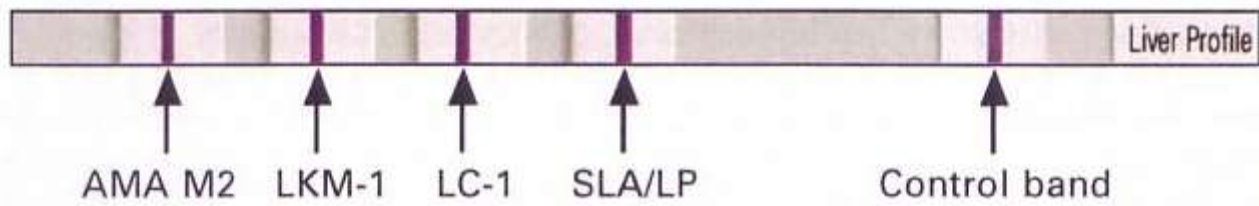
ANA Profile 5



DL 1590-1601-5 G

[illegible]

Figure 1: Western blot analysis of ALD protein expression. The blot shows 10 lanes labeled Control, Ro-52, SLA/LP, LC-1, LKM-1, gp210, PML, Sp100, M2-3E (BPO), and AMA-M2. Each lane has a corresponding ALD label on the left. The bands represent ALD protein expression, with varying intensities across the different cell lines and treatments.



HayalEvi



www.hayalevi.com

ANA alt grupları için kullanılan yöntemlerde sorunlar ve avantajlar

Yöntem	Sorunlar	Avantajlar
Immunoblotting (IB)	Kalitatif, tüm antijen, emek yoğun	Duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek antijen
ELISA	Düşük afiniteli antikorları saptar, saf antijenlere ihtiyaç duyar, yanlış pozitiflik	Duyarlı, ancak değişken ve IgG spesifik
Haemagglutination	IgG ve IgM antikorları semikantitatif olarak saptar, düşük afiniteli antikorları saptar	Ucuz
Countercurrent immunoelectrophoresis (CIE)	Uzun zaman alır, tüm antijen, semikantitatif total antikor, deneyim gerekir, yanlış negatiflik	Ucuz, özgül ve duyarlı
Immunoprecipitation (Farr)	Radyoaktif, emek yoğun, pahalı ve uygulaması teknik olarak zor, yalancı pozitiflik	Kantitatif, yüksek özgüllükte ve yüksek afiniteli antikorları saptar

W. Egner, *J Clin Pathol* 2000;53:424–432

AKÜ deneyimi

- Laboratuvarımızda 117 hastaya ait test sonuçlarının karşılaştırılması,
- IFA yöntemi ile 81 (%72.6), Dot Blot tekniği ile 98 (%83.8) ve ELISA ile 56 (%47.9) hastada ANA pozitifliği belirlenmiştir.
- Duyarlılık değerleri, Dot Blot için %81.2, ELISA için %71.7 olarak bulunmuştur.
- Özgüllük değerleri, Dot Blot yönteminde %50.0, ELISA ile %85.7 oranında gözlenmiştir.

Mikro-BONCUK TESTLERİ

- Multiplex sistemde, 5.6 mikron çapındaki bir boncuk üzerine yerleştirilmiş farklı renklerde floresan ışıma verebilen birden fazla (100'e kadar varan sayıda) antikörün araştırılmasına olanak veren testlerdir.
- Belirteçleri üstünde taşıyan mikro-bead içeren plaklar ile ışımaları okuyan akım sitometrisini birleştiren sistemlerdir.



Multiplex - Luminex

- Mikro-bead teknolojisini geliştiren Luminex, bir çok kit üreticisi için uygun sistemler geliştiren tek ticari marka olarak sektörde yer almaktadır.
- Bu teknoloji ile ANA profili başta olmak üzere bir çok oto- antikor ufak porsiyonlar halinde çalışılabilmektedir.



Luminex uygulamaları

- Yanısıra geliştirilen antikorlar ile deneysel otoimmünite modellerine de bu sistemin kullanılabilirliği sağlanmıştır.
- Luminex esaslı kit portfovyü,
- Sitokinler
- Doku reseptörleri
- Metabolik ürünler, vb.

Farklı Gruplarda ELISA ve Luminex ile ANA Pozitifliği

Kategori	ELISA	Luminex	Software analizi
KDH Olmayan (n:190)	42	18	7
Olası KDH (n:90)	37	24	10
Kesin KDH (n:45)	42	41	38
SLE (n:34)	34	32	29
Toplam	121	83	55

KDH: Konnektif doku hastalığı

S.R.Binder, Clin Diag Lab Immunol 2005;12:1353–1357

- 
- Otoimmünite etyolojisi araştırılan Hastaların tanısında ve bu hastaların kontrol ile izleminde

Hangi test ile başlanmıŖsa onunla devam edilmelidir

TEŞEKKÜRLER

