OTOANTIKORLARIN LABORATUVAR TANISI

GÜNCELLEME 2024

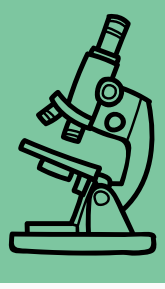
KLİMUD TEMEL İMMUNOLOJI ÇALIŞMA GRUBU

OTOIMMUN HASTALIKLARIN TANISINDA LABORATUVAR TESTLERI

1- Tarama (İmmunfloresan mikroskobi -IIF) Altın standart yöntem

2- Monospesifik antikorların belirlenmesi
(Solid Phase Assay (Katı faz yöntemler) (SPA); ELISA, İmmnblotting (IB))

1. IIF
Altın standart



2. **SPA (ELİSA,IB)**
Monospesifik

ELISA

KULLANIMI

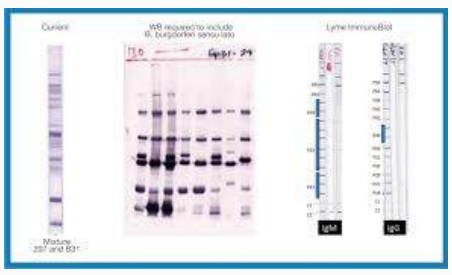
- IIF ile saptanamayan otoantikorların saptanmasında (RF, CCP, SSA, Jo-1)
- Tedavitakibinde (anti-dsDNA)

AVANTAJLARI
Yüksek özgüllük ve NPD
Kolay-ucuz
Objektif
Çok sayıda örnek için uygun
Otomatize
Deneyimli personel gerektirmez

DEZAVANTAJLARI
IIF'e göre duyarlılık düşük
Sınırlı sayıda antikor

IMMUNOBLOT

Doğrulama yöntemi olarak kabul edilir



AVANTAJLARI
Özgüllük yüksek
IIF'e göre duyarlılık düşük
Objektif
Değerlendirmesi kolay

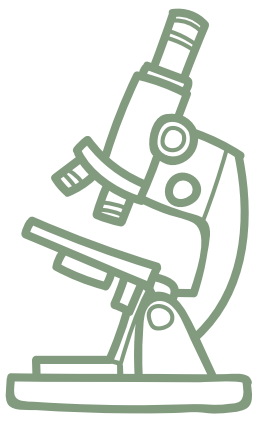
ENA Profil
Karaciğer profili
Miyozit profili
Skleroderma profili

İNDİREKT İMMÜNOFLORESAN (IIF)

İlk basamak tarama testi, Altın standart yöntem

AVANTAJLARI

- Duyarlılık yüksek
- Pek çok otoantijenin taranmasına izin verir
- Tam otomatize sistemler (patern tanıyan yazılım)



DEZAVANTAJLARI

- Özgüllük düşük (yalancı pozitiflik)
- SSA, Jo-1, Rib-P saptanmasında sorun ‼
- Ekpresyonları düşük
- Fiksasyon sırasında denatüre olabilir (saf aseton ile fikse hücreler tercih edilmeli)
- Miyozit otoantikorları ile zayıf ilişki !!!
- Manuel;zaman alıcı
- Standardizasyonu zor
- (Üretici firmalar arasındaki farklılıklar)
- Subjektif değerlendirme (Laboratuvar içi ve laboratuvarlar arası sonuçlarda standardizasyon sorunu)

Notlar

- Katı faz yöntemlerin (SPA) özgüllükleri Hep-2 IFA'dan yüksek ancak duyarlılıkları daha düşük
- IFA ve SPA'ların performansı hastalığa göre değişir:
- Hep-2 IIF ile ANA homojen paternde pozitiflik SLE için temel kriter
- (Örneğin; sistemik sklerozda IIF daha duyarlıyken Sjögren Hastalığında SPA daha duyarlıdır
- En uygun yaklaşım: ANA IIF ve SPA'ların birlikte kullanılması ve yorumlanmasıdır

International Consensus on Antinuclear Antibody (ANA) Patterns (ICAP)

Son olarak ‘’Reflecting on a decade of the international consensus on ANA patterns (ICAP): Accomplishments and challenges from the perspective of the 7th ICAP workshop’’ yayını ile bazı güncellemeler yapılmıştır.

Uluslararası Antinükleer Antikor (ANA) paternleri Konsensüsü'nün (ICAP) resmi web sitesi olan ANApatterns.org'ta, HEp-2 hücrelerinde (HEp-2 IIF) indirekt immünofloresan testinde gözlemlenen morfolojik Paternlerin standardizasyonu için hedeflenmektedir

Table 1
Simple and Composite Patterns classified by the International Consensus on ANA Patterns – ICAP.

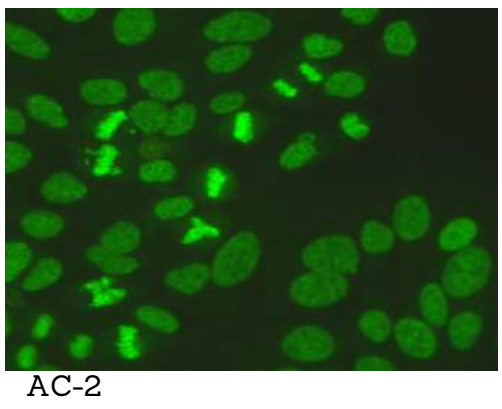
AC code	Designation	Cell domains/regions stained	Number of domains
AC-1*	Nuclear homogeneous	Nucleus and mitotic chromosome mass	2
AC-2*	Nuclear dense fine speckled	Nucleus and mitotic chromosome mass	2
AC-3	Centromere	Centromeres	1
AC-4	Nuclear fine speckled	Nucleus	1
AC-5	Nuclear large/coarse speckled	Nucleus	1
AC-6	Multiple nuclear dots	Nuclear PML bodies	1
AC-7	Few nuclear dots	Nuclear Cajal bodies	1
AC-8	Homogeneous nucleolar	Nucleolus	1
AC-9*	Clumpy nucleolar	Nucleolus and periphery of mitotic chromosome mass	2
AC-10*	Punctate nucleolar	Nucleolus and NORs	2
AC-11	Smooth nuclear envelope	Nuclear envelope	1
AC-12	Punctate nuclear envelope	Nuclear envelope	1
AC-13	Pleomorphic nuclear PCNA-like	Nucleus	1
AC-14*	Pleomorphic nuclear CENP-F-like	Nucleus, midbody, mitotic centromeres, nuclear envelope at prometaphase	4
AC-15	Cytoplasmic fibrillar linear	Cytoplasm cytoskeleton	1
AC-16	Cytoplasmic fibrillar filamentous	Cytoplasm cytoskeleton	1
AC-17	Cytoplasmic fibrillar segmented	Cytoplasm cytoskeleton	1
AC-18	Cytoplasmic discrete dots	Cytoplasmic G/W bodies	1
AC-19	Cytoplasmic dense fine speckled	Cytoplasm	1
AC-20	Cytoplasmic fine speckled	Cytoplasm	1
AC-21	Cytoplasmic reticular/AMA-like	Mitochondria	1
AC-22	Cytoplasmic polar / Golgi-like	Golgi apparatus	1
AC-23	Cytoplasmic rods and rings	Distinct cytoplasmic rods and rings structures	1
AC-24	Centrosome	Centrioles/pericentriolar region	1
AC-25	Spindle fibers	Mitotic spindle fibers	1
AC-26*	NuMA-like	Nucleus and mitotic spindle fibers	2
AC-27	Intercellular bridge	Intercellular bridge	1
AC-28	Mitotic chromosomes	Condensed chromatin only in mitotic cells	1
AC-29*	DNA topo I-like	Nucleus, mitotic chromosome mass, NORs, cytoplasm, nucleolus	5

ICAP Güncelleme

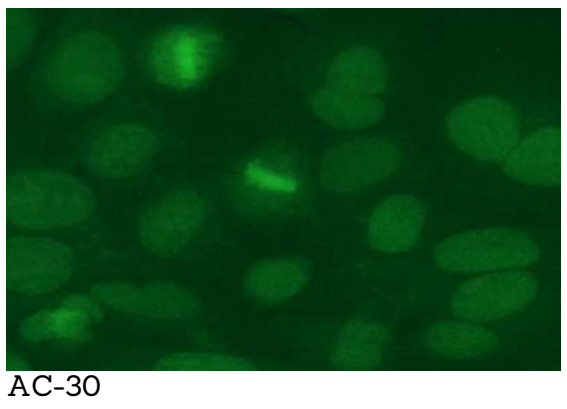
LEC Andrade. Autoimmun Rev. 2024;23(9):103608

AC-30

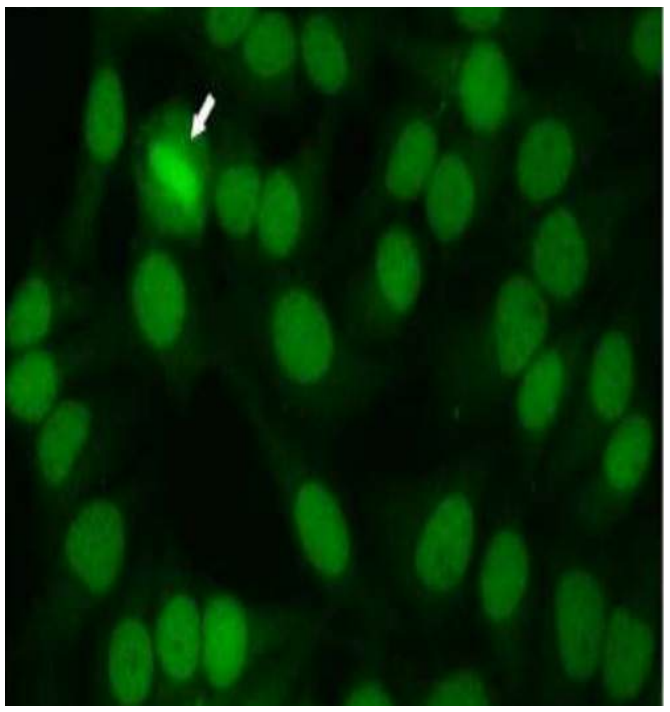
- AC-2 (DFS) benzeri bir paterndir ama metafazda daha "smooth" bir boyanma vardır ve monospesifik testlerde anti-DFS70 negatiftir.
- Nükleozom, dsDNA ve SSA/Ro60 ile ilişkili olabilir
- AC-2 ve AC-30 ayrılamıyorsa: AC-2/30 olarak raporlanması önerilir

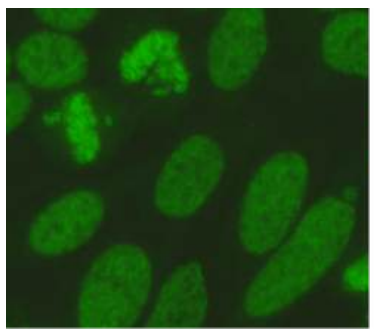


AC-2

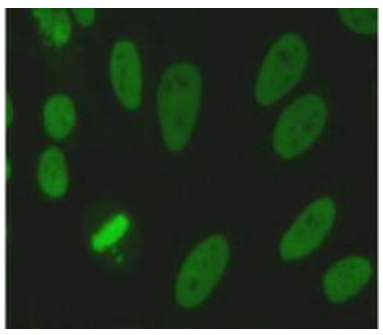


AC-30

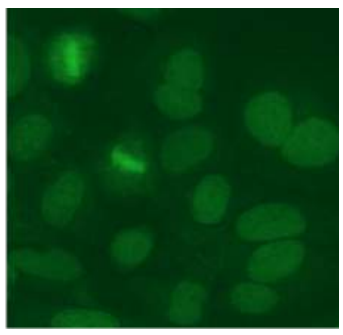




AC-2



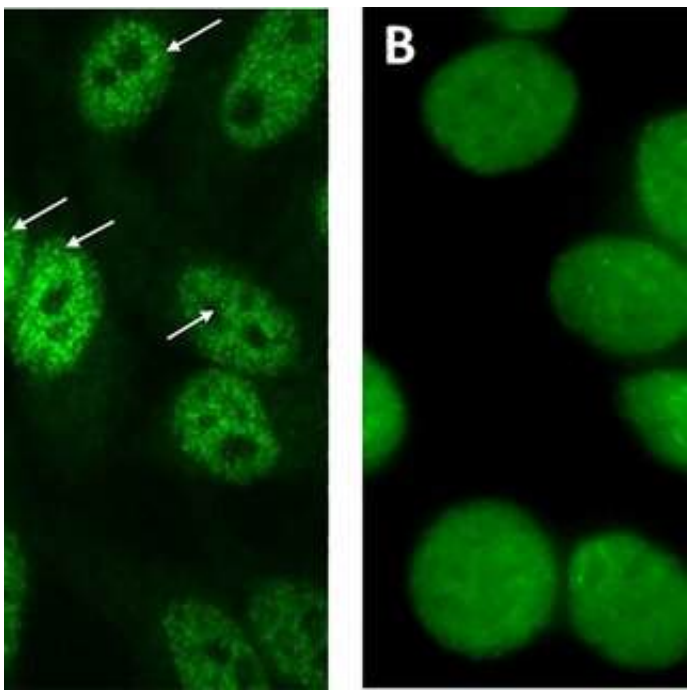
AC-30

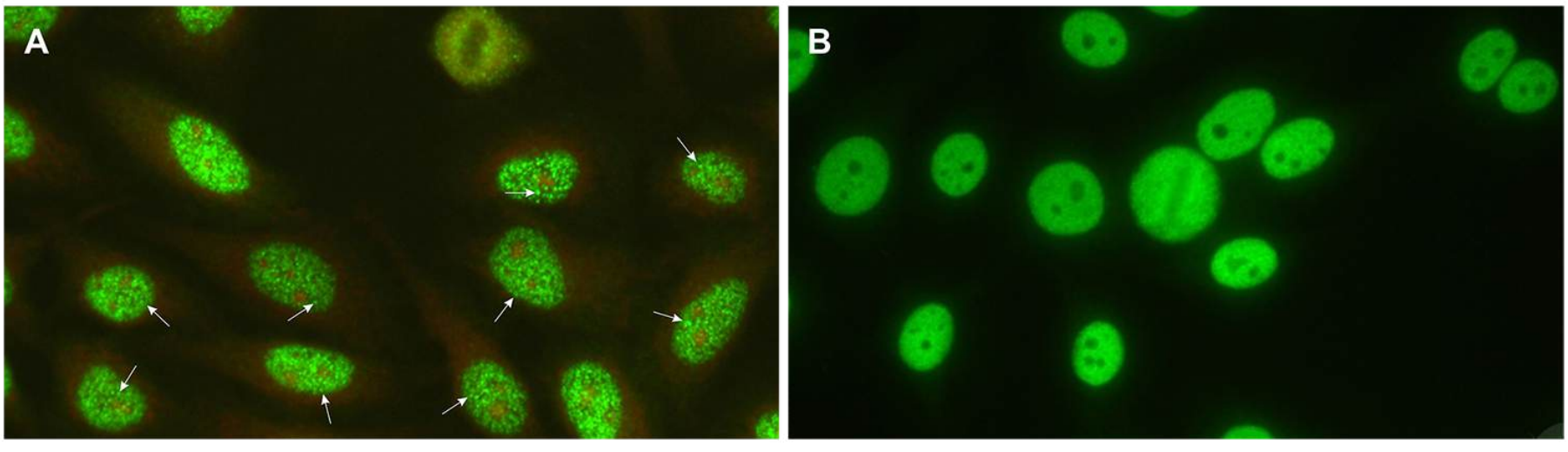


AC-30

AC-31

- AC-4 paternden interfazdaki hücrelerde daha belirgin beneklerin varlığı ile ayrılır (AC-4 daha interfazda ince benekli/homojen bir görüntü vardır)
- AC-31 sadece SS-A/Ro ile ilişkilendirilmiştir
- AC-4 ise SS-Ave SS-B veya SS-A ve diğer antikorların varlığında gözlenebilir
- Benekli bir patern AC-4, AC-5 ve AC-31 olarak ayırt edilemiyorsa: AC-4/5/31 olarak raporlanması önerilir





ICAP Hatırlatma

1

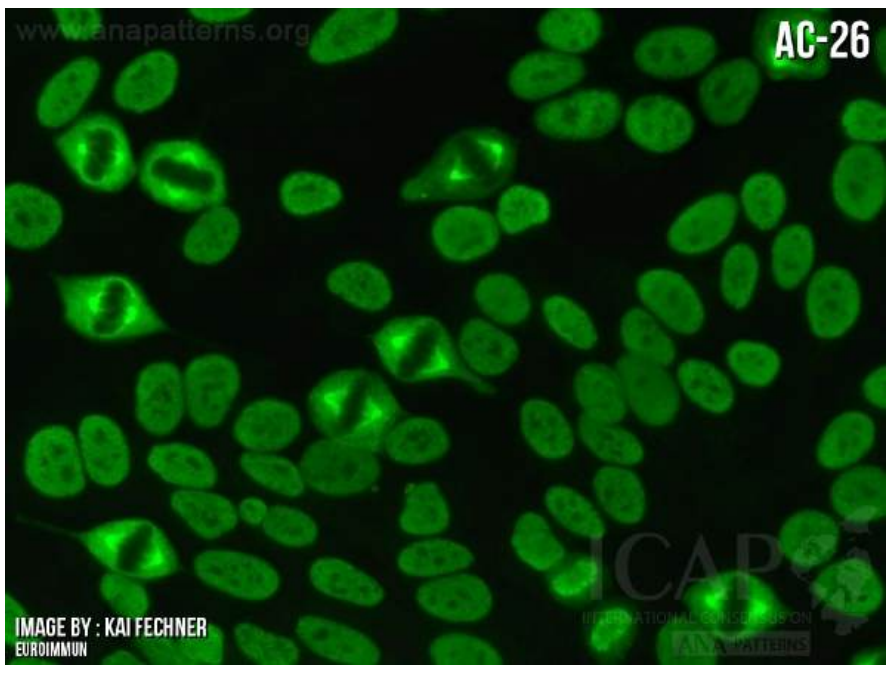
AC-XX

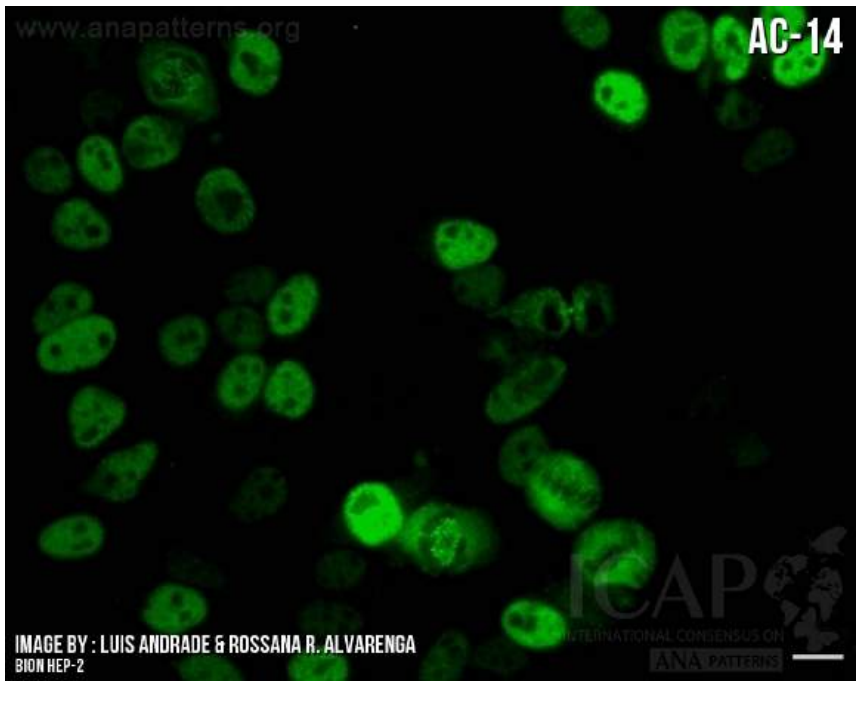
Henüz tam tanımlanmamış/antijenik ilişki kanıtlanmamış paternler için kullanılması önerilen ICAP kodudur.

2

Çoklu paternler: Ayırt edilebilen çoklu paternler bir arada
Miks paternler: Ayırt edilemeyen paternler bir arada (örn. AC4/5)
Kompozit paternler;

- NuMA-1 (AC-26) : AC-4 ve AC-25
- CENP-F (AC-14) : AC-4, AC-27 ve AC-3
- TOPO-1 (AC-29) : AC-4, AC-21 ve AC-8

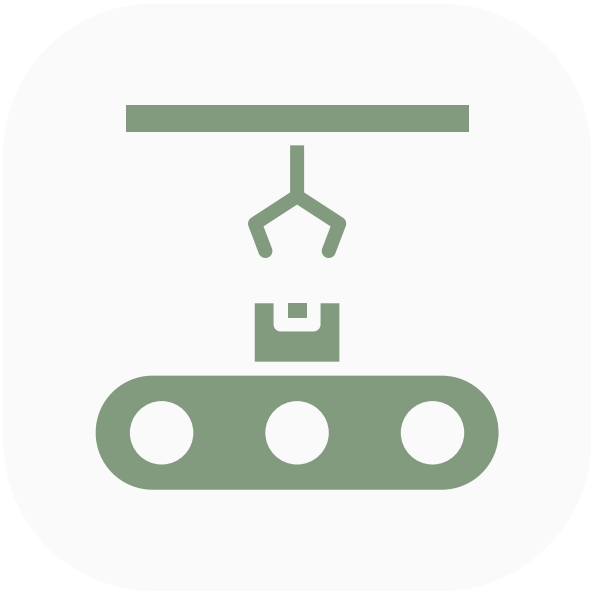




IIF Otomatize Değerlendirme Sistemleri

Matematiksel patern tanıma yazılım sistemleri Patern tanımlama ve floresan şiddeti

- Aklides (Medipan, Dahlewitz, Almanya)
- EUROPattern (Euroimmun AG, Luebeck, Almanya)
- Helios (Aesku Diagnostics,Wendelsheim, Almanya)
- Image Navigator (ImmunoConcepts, Sacramento, CA)*
- NOVA View (Inova Diagnostics,San Diego, CA)
- Zenit G-Sight (A. Menarini Diagnostics, Floransa, İtalya)
- Concepta (Biosystem, İspanya)



TANIMLANABİLEN PATERNLER	TANIMLANMASI PROBLEMLİ PATERNLER
Negatif / Pozitif	Sitoplazmik paternler
Homojen	Miks paternler
Benekli	Kompozit paternler
Sentromer	Nükleer membran
Nükleolar	DFS
Nükleer nokta	

IIF Otomatize Değerlendirme Sistemleri

AVANTAJLARI

- Laboratuvar içi ve laboratuvarlar arası değişkenliğin azaltılması
- İş gücünde azalma
- Karanlık odaya ihtiyaç duyulmaması
- Veri-görüntü kaydetme özelliği ve özel yazılım sistemleri
- İlave dosya depolamaya ihtiyaç olmaması

DEZAVANTAJLARI

- Maliyeti yüksek
- Patern belirlemede bazı hatalar
- Miks paternlerin, sitoplazmik ve daha az görülen boyanma paternlerinin tanımlanmasında iyileştirmeye ihtiyaç vardır

Not:
Patern tanımlamada vizüel mikroskopi, uzman değerlendirmesi önemli
Otomatize sistemler pozitif/negatif ayrımında kullanılabilir !

Otoimmün seroloji test sonuçlarının Likelihood Ratio (LR) ile raporlanması

Klinisyenler arasında genelde pozitif test sonuçlarının «hastalık var» şeklinde yorumlanmasına yönelik aşırı bir eğilim vardır. Otoantikor sonuçları yorumlanırken ‘’antikor düzeyleri’’ ile ‘’hastalık olma olasılığı’’ arasındaki ilişkiyi kanıta dayalı olarak yorumlamak daha uygun bir yaklaşım olabilir ve son zamanlarda bu konuda çalışmalar yapılmaktadır. Henüz LR ile sonuç raporlama için kabul görmüş bir sistem olmamakla birlikte bu yöndeki çalışmalar her geçen gün hız kazanmaktadır

- LR, tanısal doğruluk için duyarlılık, özgüllük ve pozitif prediktif değere göre daha avantajlı olabilir
- Hastalığın yaygınlığına göre değişme olasılıkları daha düşüktür Klinik açıdan daha kullanışlıdır
- Test sırasının seçilmesine yardımcı olmak için de kullanılabilir
- Her test sonucunun kendi LR değeri (olasılık oranı) olmalıdır

Hastalığı olan hastaların belirli bir sonuca sahip olma olasılığının, hastalığı olmayan hastalara göre kaç kat daha fazla/daha az) olduğu

Bazı uluslararası organizasyonlar belli oranda yüksek antikor düzeylerini tanı kriterleri içine almıştır

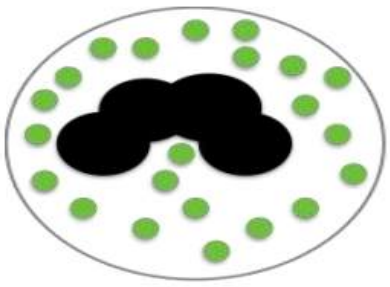
ESPGHAN
Çocuk hastalarda çölyak tanısı için
tTG IgA normalin 10x ise biyopsiye gerek yoktur

EULAR
RA için
RF ve CCP normalin 3x olmasının, normalin üzerinde - <3 kat olmasına göre daha güçlü tanısal değeri vardır

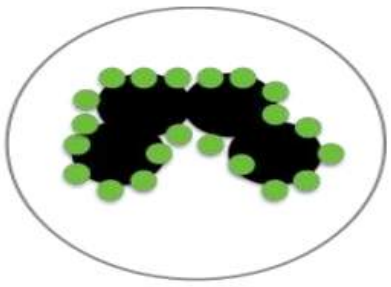
LR>1 test sonucu hastalığın varlığıyla ilişkili
LR<1 test sonucu hastalığın yokluğuyla ilişkili

LR(+) ; LR>10 tanı koymak için güçlü kanıt
LR(-) ; LR<0.1 hastalığı dışlamak için güçlü kanıt
ya da
– LR değeri 1’e yakınsa hastalığın varlığını ve yokluğunu göstermede testin etkisinin az olduğu ya da kullanışsız olduğu düşünülebilir

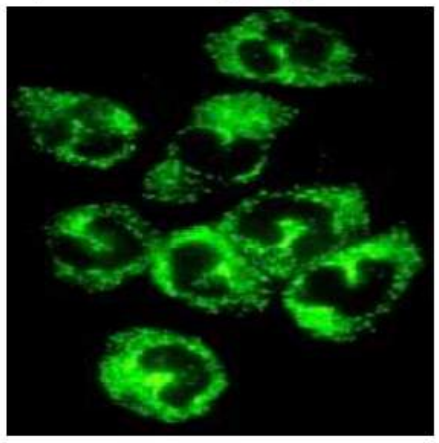
Anti-Nötrofil Sitoplazmik Antikorlar (ANCA)

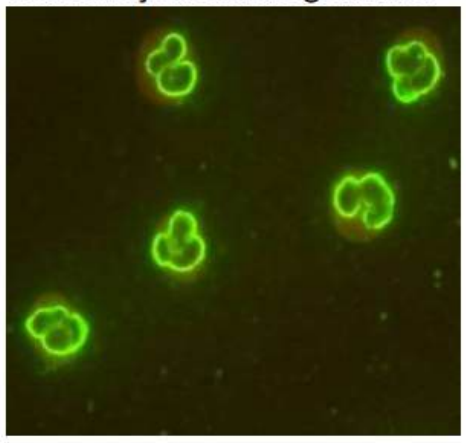


cANCA
Sitoplazmada dağınık granüller



pANCA
Nükleus çevresinde granüller





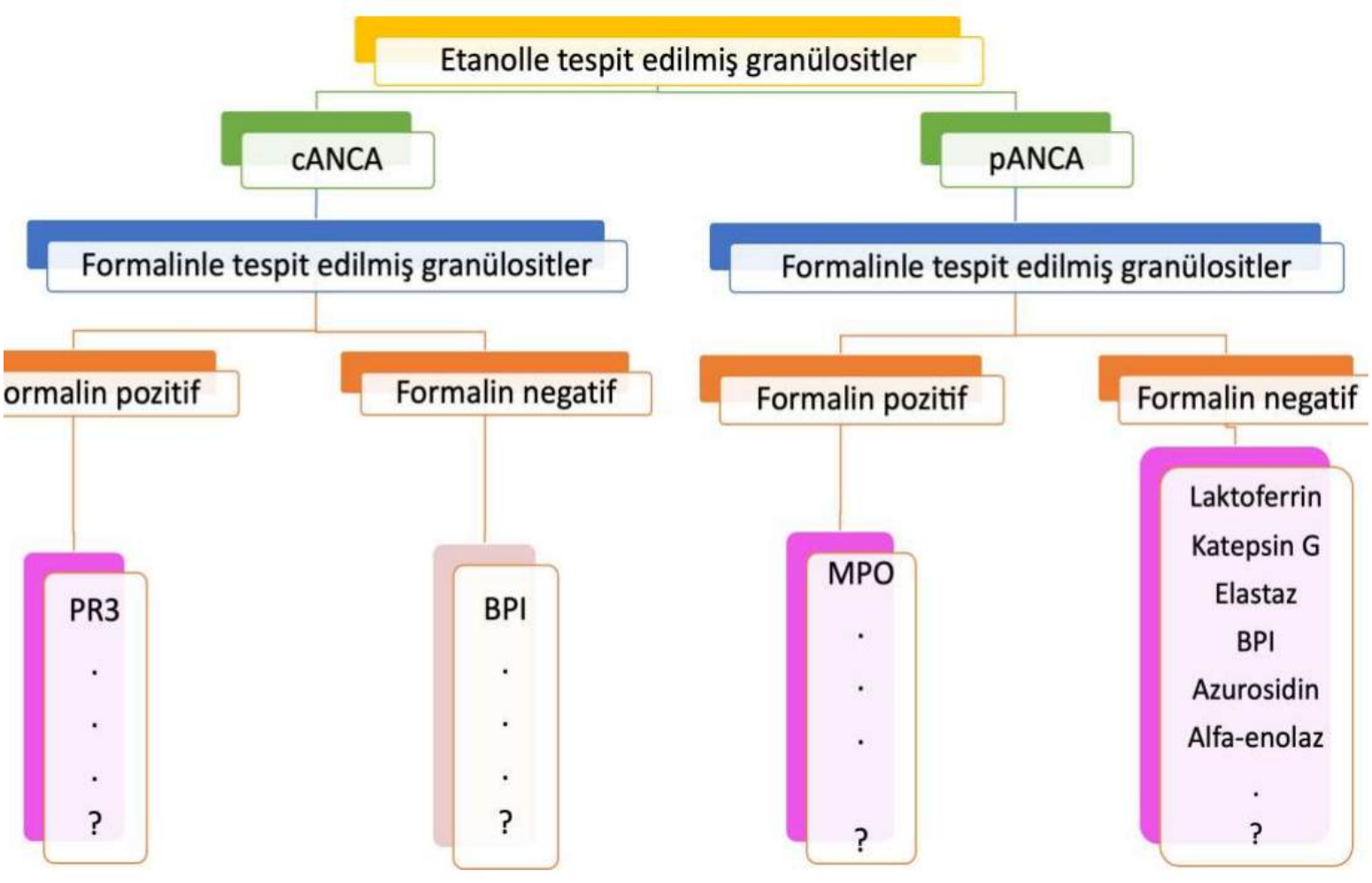
<u>ANCA ilişkili vaskülitler (AAV):</u>

- Mikroskobik polianjit (MPA)
- Granülomatöz polianjit-GPA (Wegener granülomatozis)
- Eozinofilik granülomatöz polianjit
- EGPA (Churg-Strauss sendromu)

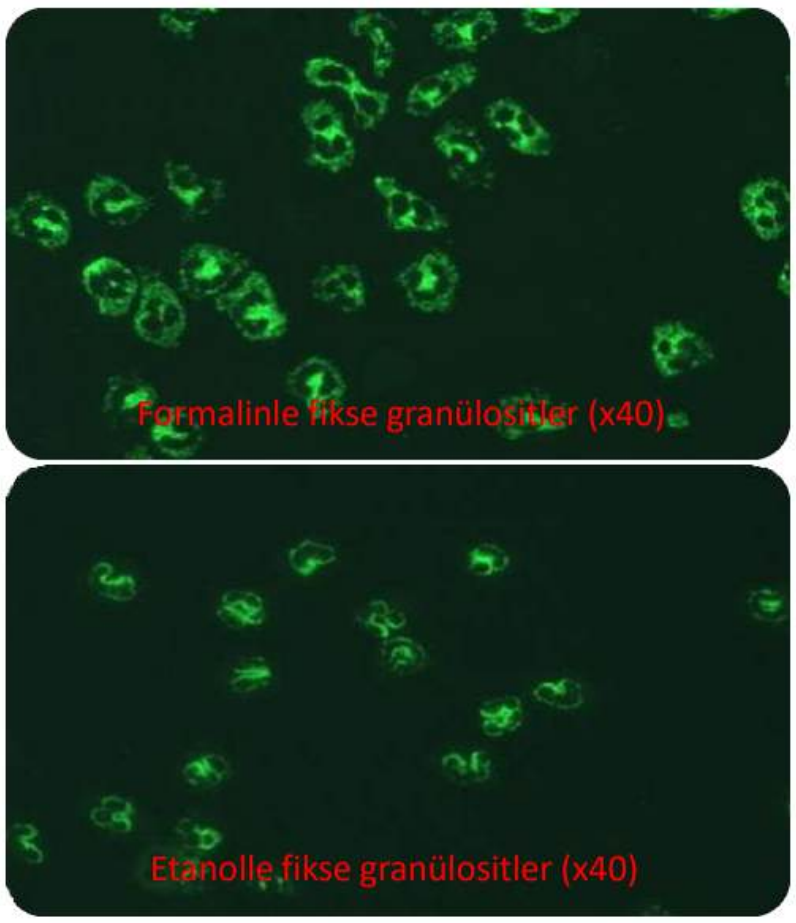
KLİMUD Otoantikorların Laboratuvar Tanısı Rehberi, v3, 2020

Güncel isimlendirme

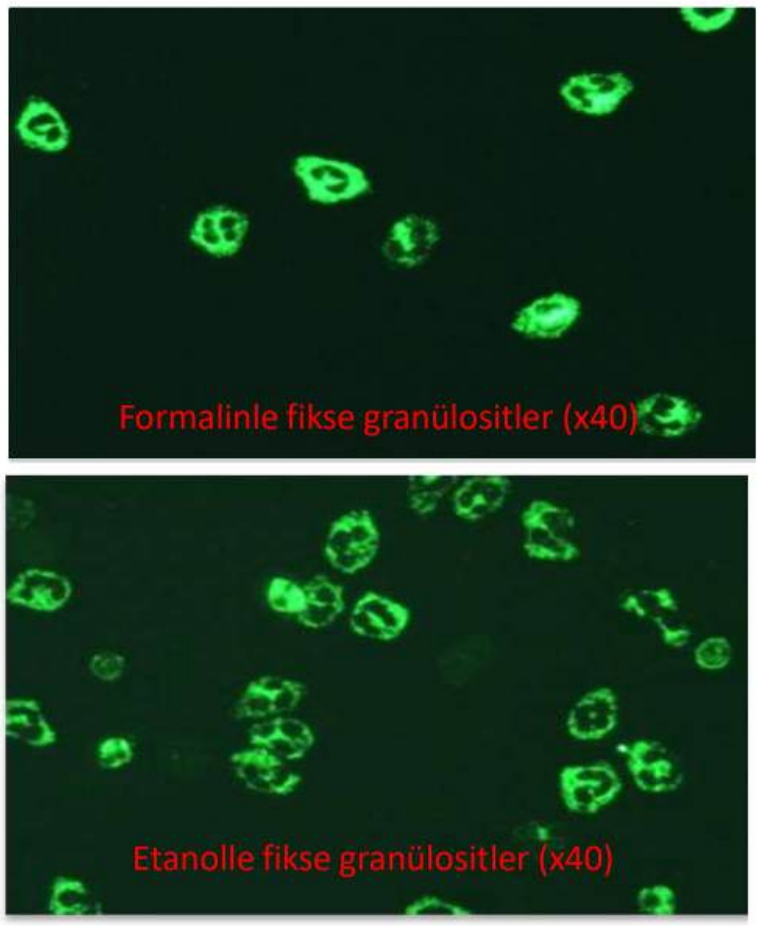
pANCA formalin dirençli	pANCA formalin pozitif
pANCA formalin duyarlı	pANCA formalin negatif
cANCA formalin dirençli	cANCA formalin pozitif
cANCA formalin duyarlı	cANCA formalin negatif



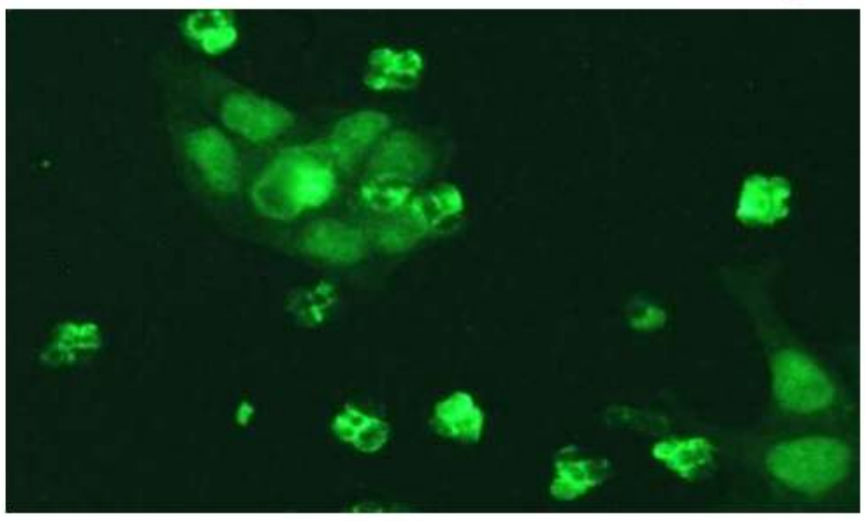
p-ANCA-formalin pozitif
formalin dirençli-(MPO ANCA)

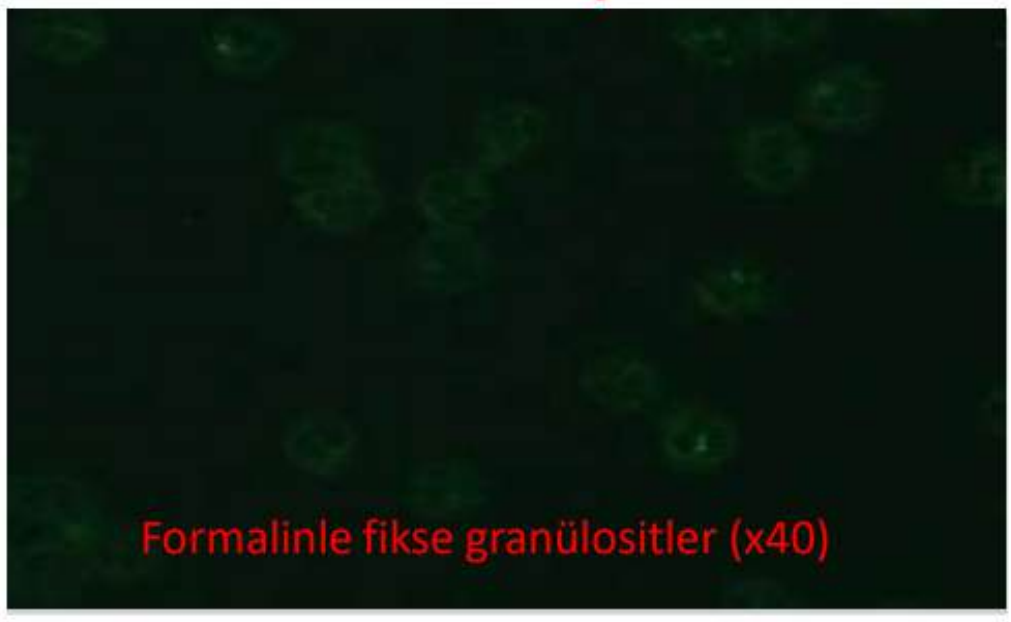


c-ANCA-formalin pozitif
formalin dirençli-(PR3 ANCA)

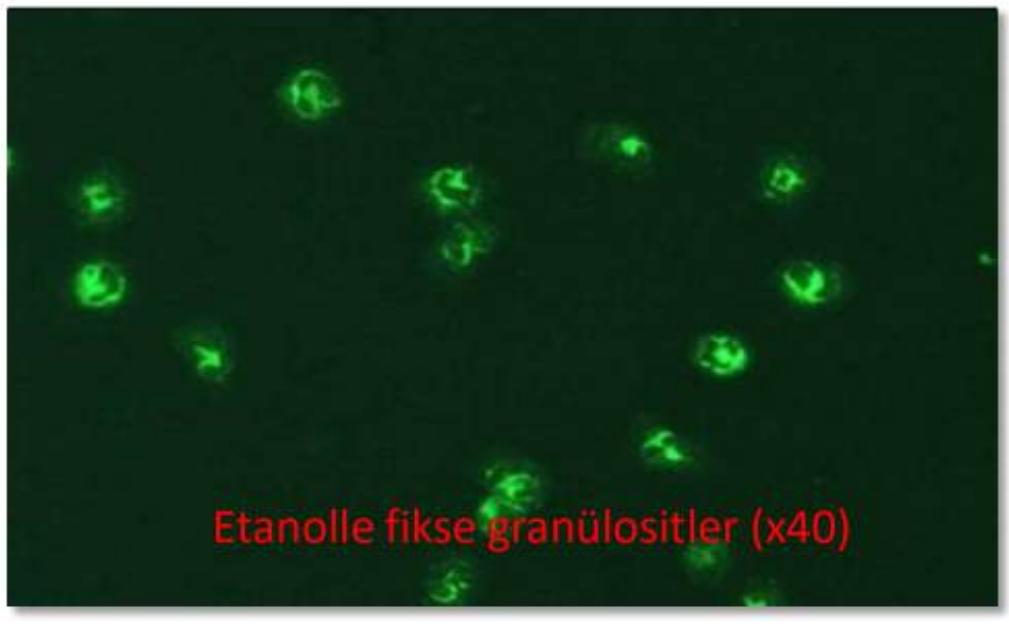


p-ANCA-formalin negatif
formalin duyarlı
atipik p-ANCA


Granülosit içeren HEp-2 hücreleri (x40)



p-ANCA-formalin negatif
formalin duyarlı (atipik p-ANCA)
MPO-ANCA (-)



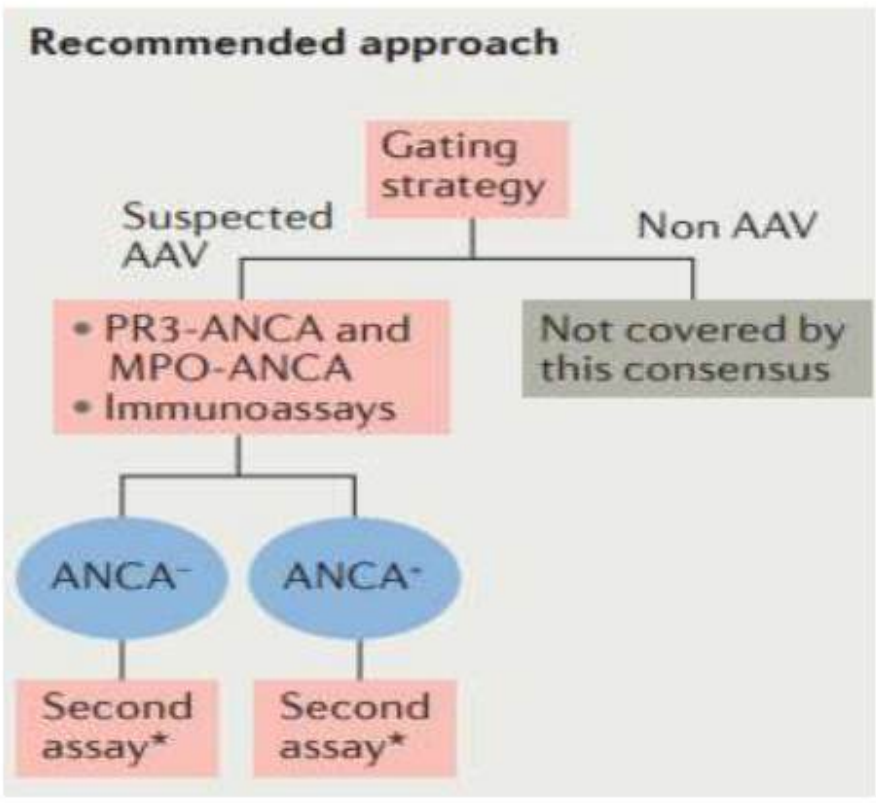
GPA VE MPA'DA ANCA TESPİTİ İÇİN YENİ ULUSLARARASI ÖNERİLER

POSITION PAPER

Revised 2017 international consensus on testing of ANCAs in granulomatosis with polyangiitis and microscopic polyangiitis

1. İlk tarama yöntemi monospesifik PR3-ANCA ve MPO-ANCA antijene özgül testlerle yapılmalıdır (immunoassay)
2. PR3-ANCA ve MPO-ANCA her ikisi de negatif ise başka bir immunoassay ve/veya IIF ile ANCA çalışılmalıdır
3. Pozitif PR3-ANCA ve MPO-ANCA sonucu ANCA ilişkili vaskülit tanısında yardımcıdır, tek başına tanısal değildir
4. Bu yenilenmiş uzlaşı önerileri özellikle GPA ve MPA gibi vaskülitlerin tanısında geçerlidir, ancak İBH, OİH ve ilaç ilişkili otoimmünite tanısı için yardımcı test olarak geçerli değildir

- 2017 konsensusunda, AAV (GPA ve MPA) şüphesi olan hastalarda ANCA tespiti için ilk tarama yöntemi olarak seroimmünolojik testlerin kullanılması önerilmektedir
- AAV şüpheli hastalarda ANCA tanısında IIF artık ilk tarama testi olarak önerilmemektedir ANCA negatif hastalarda AAV tanısı dışlanamaz ve klinik şüpheli seronegatif hastalarda biyopsi yapılmalıdır
- ANCA AAV tanısında yardımcı olsa da, AAV tanısı klinikopatolojik özelliklere dayanmalıdır
- ANCA test sonuçlarının klinik yorumu, antikor seviyelerini hesaba katarak ve olasılık oranlarını (LR) uygulayarak iyileştirilebilir



> *Yüksek klinik şüphesi olan hastalarda veya düşük antikor seviyeleri durumunda negatif sonuçlar için ikinci bir PR3-MPO-ANCA veya IIF düşünülebilir

Kaynaklar ve ileri okuma önerileri

- Bossuyt X. Clin Chem. 2024;70(3):482-485.
- Damoiseaux J. Front Immunol. 2021;12:656796
- LEC Andrade. Autoimmun Rev. 2024;23(9):103608
- Bonroy C, Vercammen M, et al.; EFLM, EASI and ICAP. Clin Chem Lab Med. 2023 Mar 29;61(7):1167-1198.
- Bossuyt, X., et al. Nat Rev Rheumatol 2017, 13, 683–692