آنتی‌بادی‌های ضد هسته‌ای

دکتر محمود اکبریان، دکتر سیده طاهره فائزی

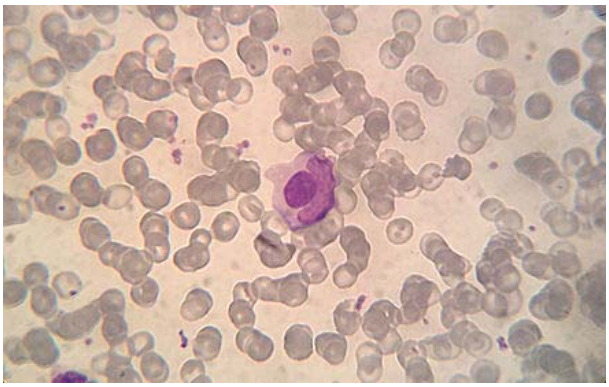
آنتی نوکلئار آنتی بادی‌ها (ANAs) به گروهی از اتوآنتی‌بادی‌ها گفته می‌شود که علیه آنتی ژن‌های داخل سلولی ایجاد می‌شود. بررسی این آنتی‌بادی‌ها به عنوان تست غربالگری در تعدادی از بیماری‌های اتوایمیون سیستمیک شامل لوپوس اریتماتوی سیستمیک، سندرم شوگرن، اسکلرودرمی سیستمیک، MCTD و میوپاتی التهابی ایدیوپاتیک انجام می‌شود. این آنتی بادی‌ها علاوه بر بیماری‌های اتوایمیون سیستمیک در تعدادی از بیماری‌های اتوایمیون اختصاصی ارگان (شامل بیماری‌های خود ایمنی کبد و تیروئیدیت هاشیموتو)، عفونت‌ها، کانسرها، داروها، افراد مسن و در تعدادی از افراد طبیعی جامعه نیز مشاهده می‌شود.[۱-۴]

علیرغم گذشت بیش از ۵۰ سال از استفاده ANAs در روماتولوژی، هنوز خیلی از جوانب این تست نا مشخص و در هاله ابهام می‌باشد.[۵] در این مقاله سعی شده علاوه بر بررسی نقش تشخیصی ANAs در بیماری‌های روماتیسمی به چالش‌های نتایج این تست نیز پرداخته شود.

تاریخچه

بررسی ANAs اولین بار توسط Hargraves و همکارانش در سال ۱۹۴۸، با شناسایی سلول LE (Lupus Erythematosus) در نمونه مغز استخوان بیمار مبتلا به لوپوس انجام شد.[۶] در روش LE

cell که امروزه به ندرت استفاده می‌شود، نمونه خون درون یک لوله حاوی شیشه خرد شده، به هم زده می‌شود. سپس هسته آزاد شده سلول‌ها توسط ANA (آنتی ریبونوکلئوپروتئین) و کمپلمان اپسونیزه می‌شود و توسط سلول‌های نوتروفیل فاگوسیته می‌شود و سلول LE به وجود می‌آید. تصویر شماره ۱.



تصویر شماره ۱: سلول LE را نشان می دهد. در اینجا هسته هموژن شده یک نوتروفیل، توسط یک سلول چند هسته ای بلعیده شده است.

سپس درسال ۱۹۵۷ ازروش ایمنوفلورسانس غیرمستقیم (IFA) با استفاده از نمونه کبد یا کلیه موش‌ها (به جای سوبسترا)، به عنوان روش حساس‌تر نسبت به LE cell در تشخیص بیماری لوپوس و بیماری‌های مرتبط استفاده شد.

آنتی‌ژن‌های موردهدف ANAs

آنتی‌ژن‌هایی که به ANAs باند می‌شوند در ابتدا در هسته سلول‌ها کشف شدند، به همین دلیل نام آنتی‌نوکلئار آنتی‌بادی‌ها به آن‌ها داده شد. اما سپس آنتی‌بادی علیه تعدادی از پروتئین‌های سیتوپلاسمی نیز مشخص شد و در زمره ANAs قرار گرفتند. ANAs به DNA، RNA، پروتئین‌ها، کمپلکس اسید نوکلئیک، پروتئین‌ها باند می‌شوند.[۷] ANAs به ۲ گروه تقسیم می‌شوند، شامل ANAs مرتبط با لوپوس و ANAs مرتبط با بیماری‌های اتوایمیون دیگر. گروه اول شامل آنتی‌بادی‌های علیه DNA، هیستون و نوکلئوزوم ها می‌باشد و گروه دوم شامل آنتی‌بادی‌هایی که به کمپلکس RNA و پروتئین‌های متصل به RNA (RBPs) باند می‌شوند. مثال ANAs که RBPs ها را شناسایی می‌کنند شامل آنتی بادی‌های anti-Sm، anti-RNP، anti-Ro و anti-La می‌باشند.[۸،۹]

اختصاصیت ANA در بیماری‌های مختلف

ارتباط آنتی‌بادی‌های خاص با بیماری‌های خود ایمن شامل:

DNA و anti-Sm با بیماری لوپوس ارتباط خاص دارد و برای تشخیص اختصاصیت بالا دارد.

anti-topoisomerase I با بیماری اسکلرودرمی سیستمیک پیشرونده، anti-centromer با نوع محدود پوستی اسکلرودرمی سیستمیک ارتباط تنگاتنگ دارد.

anti-Jo1 با میوزیت ها ارتباط دارد.

بررسی ANA به عنوان یک تست غربالگری در تعدادی از بیماری‌های خود ایمنی سیستمیک انجام می‌شود و در صورت مثبت شدن ANAs، در مرحله بعد با انجام تست تکمیلی و تشخیص اتوآنتی بادی اختصاصی آنتی ژنی که به ANA باند شده، می‌توان اطلاعات تشخیصی اختصاصی‌تر و مرتبط‌تر با بیماری را به دست آورد، شامل رابطه anti-DNA و anti-Sm با بیماری لوپوس، anti-topoisomerase I با بیماری اسکلرودرمی سیستمیک پیشرونده، anti-centromer با نوع محدود پوستی اسکلرودرمی سیستمیک و anti-Jo1 با میوزیت‌ها. اما تعدادی از ANAs از جمله آنتی بادی علیه آنتی‌ژن‌های Ro60، Ro52 و La، در بیش از یک بیماری اتوایمیون سیستمیک مانند سندرم شوگرن، لوپوس و آرتریت روماتوئید ممکن است وجود داشته باشد. بنابراین در بیمار با تست ANA مثبت، بر اساس یافته‌های بالینی و پاراکلینیک دیگر می‌توان به بررسی ANA اختصاصی بپردازیم. وجود ANAs مثبت در تشخیص تعدادی از بیماری‌های اتوایمیون ضروری و در تعدادی کمک کننده است. (جدول شماره ۱)

Condition	Patients with ANAs (%)
Diseases for Which ANA Testing Is Helpful for Diagnosis	
Systemic lupus erythematosus	99-100
Systemic sclerosis	97
Polymyositis/dermatomyositis	40-80
Sjögren's syndrome	48-96
Diseases in Which ANA Is Required for the Diagnosis	
Drug-induced lupus	100
Mixed connective tissue disease	100
Autoimmune hepatitis	100
Diseases in Which ANA May Be Useful for Prognosis	
Juvenile idiopathic arthritis	20-50
Anti-phospholipid antibody syndrome	40-50
Raynaud's phenomenon	20-60
Some Diseases in Which ANA Is Typically Not Useful	
Discoid lupus erythematosus	5-25
Fibromyalgia	15-25
Rheumatoid arthritis	30-50
Relatives of patients with autoimmune diseases	5-25
Multiple sclerosis	25
Idiopathic thrombocytopenic purpura	10-30
Thyroid disease	30-50
Patients with silicone breast implants	15-25
Infectious diseases	Varies widely
Malignancies	Varies widely
Healthy ("Normal") Persons	
≥1:40	20-30
≥1:80	10-12
≥1:160	5
≥1:320	3

ANA, Anti-nuclear antibody.
Modified from Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, et al. Guidelines for clinical use of the anti-nuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. American College of Pathologists. *Arch Pathol Lab Med* 124:71-81, 2000.

جدول شماره ۱: بیماری‌ها و وضعیت‌های همراه با ANA نشان دهنده ارتباط فاکتورهای ضد سلولی و بیماری‌های خود ایمن می‌باشد.

روش‌های سنجیدن ANA

از زمان استفاده از ANAs در تشخیص بیماری‌های اتوایمیون، روش‌ها و تکنولوژی‌های مختلفی برای سنجش ANAs مورد استفاده قرار گرفته است که به تفصیل به بیان این روش‌ها می‌پردازیم.

روش ایمنوفلورسانس (IFA)

از بیش از ۵۰ سال پیش، روش ایمنوفلورسانس (به عنوان IFA غیرمستقیم شناخته شده) به عنوان تکنیک اصلی وgold standard برای سنجش ANAs مورد استفاده قرار گرفته است.

IFA یک روش ساده است، در ابتدا سرم یا پلاسمای بیمار رقیق می‌شود (به‌طور تیپیک سریالی ۲ برابر رقیق می‌شود) و سپس به یک سوبسترای سلولی شامل نمونه بافتی یا لایه سلولی فیکس شده روی یک لام شیشه‌ای اضافه می‌شود. سپس لام شسته می‌شود. بعد از آن anti-IgG فلورسینه به آن اضافه می‌شود و مجدد لام شسته می‌شود. سپس لام زیر میکروسکوپ فلورسانس مشاهده می‌شود. (تصویر شماره ۲)

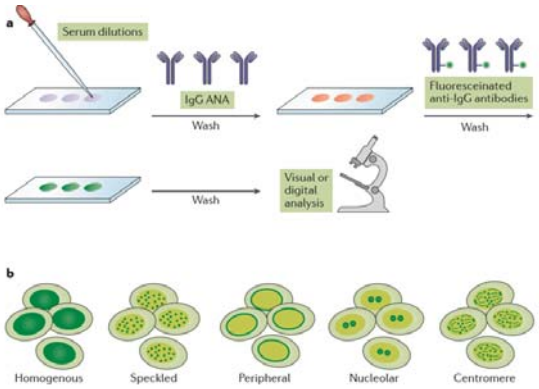


Figure 2 | **IFA testing for identifying the presence of ANAs. a** | In the top panel, the experimental procedure of an indirect immunofluorescence assay (IFA) is illustrated. A slide with tissue culture cells is exposed to dilutions of serum. Following washing steps to remove unbound antibodies, the slide is incubated with a fluoresceinated anti-IgG reagent. Following another washing step, fluorescence microscopy is performed. At present, in most laboratories, a technician visually inspects the slide to determine the presence and pattern of fluorescence. In determining the positivity of a sample, the dilution in which fluorescence is still visible is assessed. This end-point titre provides a quantitative measure of the amount of antinuclear antibodies (ANAs) present. In addition to visual inspection, the presence of fluorescence can be determined from digital images. **b** | The bottom panel illustrates some of the more common staining patterns of ANAs. Each pattern is associated with certain ANAs and, therefore, can occur more commonly in association with certain diseases. The results of IFA can be reported in terms of the end-point titre and staining pattern. For some sera, a mixture of different ANAs is present and, depending on their relative titre, more than one pattern can be observed. For example, a serum can be characterized as 1:640 homogeneous and 1:2,560 speckled. As IFA kits can differ in features related to the cell line, conditions of fixation and properties of anti-IgG reagents, the results can vary. Therefore, it is important to know the characteristics of different assays for interpreting their results. In general, a titre of >1:40 or 1:80 is considered significant meaning that the serum is considered to be ANA positive.

تصویر شماره ۲: مراحل مختلف آزمایش انجام تست ANA با روش ایمنوفلورسانس را نشان می‌دهد.

استفاده از سلول‌های Hep-۲ به عنوان سوبسترای سلولی با منشاء اپیتلیومای لارنکس به دلیل توانایی تکثیر سریع، هسته بزرگ، غلظت بالای آنتی ژن‌های هسته‌ای و سیتوپلاسمی و بیان کردن طیف وسیعی از آنتی ژن‌های مرتبط با بیماری‌های اتوایمیون سیستمیک و استاندارد شدن استفاده از آن به عنوان سوبسترای ارجح در تست FANA می‌باشد. اما تعدادی از آزمایشگاه‌ها از سوبستراهای هتروژن از قبیل بافت کبد یا کلیه جوندگان استفاده می‌کنند که مزیت آن حذف تداخلات آنتی بادی‌های گروه خونی و آنتی بادی‌های هتروفیل می‌باشد، اما حساسیت کمتری در سنجیدن آنتی ژن‌های وابسته به سیکل سلولی شامل Ro/SS-A دارد.

در نتایج تست FANA دو قسمت "الگو(Pattern) و تیتر" اهمیت دارد که به بحث در مورد آن می‌پردازیم.

الگو FANA: الگو (pattern) شامل توصیف شکل مشاهده شده در روش ایمنوفلورسانس می‌باشد. الگو FANA می‌تواند محل آنتی‌ژن و نیز اختصاصیت ANAs را نیز نشان دهد. (جدول شماره ۲)

از آنجایی که تست FANA می‌تواند الگوهای متعددی را نشان دهد، تشخیص الگوهای مختلف نیاز به مهارت تکنیکی فرد مشاهده کننده دارد.[۱۰] در ابتدا الگوهای هسته‌ای (شامل هوموژنوس، speckled، سنترومر و نوکلئولار) توسط آزمایشگاه‌ها گزارش می‌شد. با استفاده از HEp-2 cell به عنوان سوبسترا، الگوهای دیگرهسته‌ای و همچنین الگوی سیتوپلاسمی (واکنش نسبت به اجزای سلولی خارج هسته‌ای) و الگوی میتوتیک (تصویرهای همراه با مراحل مختلف میتوز) نیز مشاهده شدند. با توجه به تفاوت در گزارش الگوها از آزمایشگاه‌های مختلف، به منظور یکسان سازی در نام گذاری و گزارش استاندارد، اخیراً توسط International Consensus on ANA Patterns (ICAP) الگوها در ۳ گروه اصلی: نوکلئار، سیتوپلاسمیک و میتوتیک قرار داده شده‌اند.[۱۰]

با مراجعه به سایت (www.ANApatterns.org) کمیته ICAP همچنین ۲۸ الگوی مختلف براساس سوبسترای HEp-2 cell را شرح داده‌اند. از این ۲۸ الگو، الگوهای نوکلئار: هوموژنوس، speckled، سنترومر، discrete nuclear dots، نوکلئولار و dense fine speckled (AC-1 to AC-14) به عنوان الگوهای True ANA در نظر گرفته شدند. برای الگوهای سیتوپلاسمیک (AC-15 to AC-23)، الگوهای: فیبریلار، speckled، رتیکولار/آنتی میتوکندریال آنتی‌بادی (AMA) و الگوهای polar/ Golgi-like را مطرح نموده‌اند. جدول شماره ۲ الگوهای نوکلئولار و سیتوپلاسمیک FANA و آنتی ژن‌ها و بیماری‌های مرتبط را نشان می‌دهد. تصویرهای شماره ۳ و۴ الگوهای FANA اختصاصی لوپوس اریتماتوی سیستمیک و اسکلرودرمی سیستمیک را نشان می‌دهد.

Table 2 IIFA nuclear/cytoplasmic patterns detected on HEp-2 substrates and related antigens/diagnosis

Most commonly recognised patterns		
Nuclear patterns	**Related antigens**	**Related diagnosis**
Homogeneous	**dsDNA, histones, chromatin/nucleosomes**, HMG	SLE, drug induced SLE/vasculitis, JIA
Coarse speckled	**U1-SnRNP, U2–6 snRNP (Sm)**, nuclear matrix	MCTD, SLE, Raynaud, SSc, SS, UCTD
Fine speckled	**SSA/Ro, SSB/La, Topo-1**, common to many antigens	SLE, SS, SSc, IM, MCTD
Centromere	**Kinetochore: CENP-A, B**, C, F	SSc (limited), Raynaud's
Nucleolar	**PM/Scl**, RNA-polymerase, URNP, U3-RNP, To/Th, B23 phosphoprotein/numatrin	SSc, Raynaud's, IM, overlap
Cytoplasmic patterns	**Related antigens**	**Related diagnosis**
Diffuse	**RibP, Jo-1**, other tRNA synthetases, SRP	SLE, IM
Fine speckled	**Jo-1**, SRP, **PDH (mitochondria)**	IM, DM, PBC, interstitial lung disease
Less commonly recognised patterns		
Nuclear patterns	**Related antigens**	**Related diagnosis**
Peripheral/rim or nuclear envelope	Lamins, LAP1/2 gp210, nucleoporin p62; nuclear envelope and nuclear pore complex antigens	SLE, RA, PBC, IM autoimmune liver diseases
Dense fine speckled	DFS70/LEDGF-P75	Healthy subjects and other inflammatory conditions
Pleomorphic cell cycle speckled (PCNA)	Auxiliary protein proliferating cell nuclear antigen: elongation factor of DNA polymerase delta	SLE, lymphoproliferative diseases, SS
Nucleolar (clumpy)	U3-SnRNP (fibrillarin)	SSc
Multiple/few nuclear dots	Sp100, PML bodies, p80-coilin	PBC, CAH, SS
Centrosome/centriole (formerly:spindle apparatus)	Enolase, ninein, pericentrin	SSc, Raynaud's, inflammatory disease
MSA (mitotic spindle)	NuMA/centrophilin	RA, inflammatory conditions; pneumonia (mycoplasma)
Cytoplasmic patterns	**Related antigens**	**Related diagnosis**
Discrete speckled	Endosome (early endosome antigen 1), GW/Processing bodies, multivesicular bodies/lysosomes	Neurological conditions, SS, SLE, RA, PBC, UCTD
Golgi complex	Golgi proteins/golgins: giantin, golgin 245, golgin 110, golgin 97, golgin 95, others	SLE, SS, RA, overlap syndromes, cerebellar ataxia
Cytoplasmic fibres	Actin, cytokeratin, tropomyosin, vimentin	CAH, DM, infections and other inflammatory diseases

Within the many patterns that can be distinguished the ones specified in the upper part of the table are the most commonly recognised. The relationship between pattern and antigen specificity may differ in certain conditions. Similarly, the specific antigens marked in bold are the most commonly detected by reflex testing, although other antigens may be of importance in different clinical conditions. Less common pattern are specified in the lower part of this table.
CAH, chronic autoimmune hepatitis; CENP, centromere protein; DFS, dense fine speckled; DM, dermatomyositis; dsDNA, double-stranded DNA; GW, glycine—tryptophan; HMG, high mobility group; IM, inflammatory myopathies; JIA, juvenile idiopathic arthritis; MCTD, mixed connective tissue disease; MSA, mitotic spindle; NuMA, nuclear mitotic apparatus; PBC, primary biliary cirrhosis; PDH, pyruvate dehydrogenase; PM/Scl, polymyositis/scleroderma; RA, rheumatoid arthritis; RibP, ribosomal P protein; RNP, ribonucleoprotein; SLE, systemic lupus erythematosus; SRP, signal recognition particle; SS, Sjögren's syndrome; SSc, systemic sclerosis; Topo-1, topo-isomerase 1; tRNA, transfer RNA; UCTD, undifferentiated connective tissue disease.

جدول شماره ۲: الگوهای نوکلئولار و سیتوپلاسمیک **FANA** و آنتی ژن‌ها و بیماری‌های مرتبط

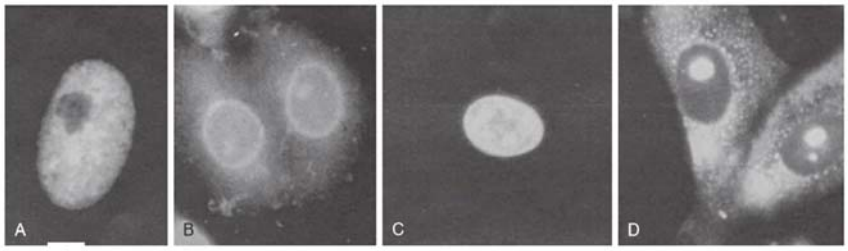


Figure 3 The fluorescent anti-nuclear antibody test: specificities of systemic lupus erythematosus. **A,** Speckled nuclear pattern of anti-Sm antibodies. **B,** Nuclear rim pattern of anti–DNA antibodies. **C,** Homogeneous nuclear pattern of anti-DNA antibodies. **D,** Discrete cytoplasmic and nucleolar pattern of antiribosome antibodies.

تصویر شماره ۳: الگوهای **FANA** اختصاصی لوپوس اریتماتوی سیستمیک

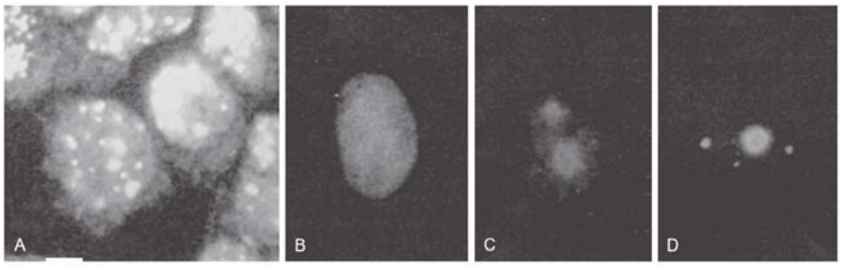


Figure 4 The fluorescent anti-nuclear antibody test: specificities of systemic sclerosis. **A,** Discrete speckled nuclear pattern of anti-kinetochore (centromere) antibodies. **B,** Grainy nuclear and nucleolar pattern of anti-topoisomerase I (sclerosis [Scl]-70) antibodies. **C,** Diffuse nucleolar and sparse nucleoplasmic pattern of anti-Th (ribonuclease mitochondrial RNA processing complex, 7-2) antibodies. **D,** Punctate nucleolar staining of anti-RNA polymerase antibodies. (*A, From the Clinical Slide Collection on the Rheumatic Diseases, copyright 1991; used by permission of the American College of Rheumatology.*)

تصویر شماره ۴: الگوهای **FANA** اختصاصی اسکلرودرمی سیستمیک

تیتر FANA: موضوع دیگر درتست FANA، رقیق نمودن سرم بیمار می‌باشد. رقت اولیه که برای تست‌های اولیه استفاده می‌شود معمولاً ۱:۴۰ یا۱:۸۰ است. درصورت شروع تست با رقت بالاتر، علاوه بر کاهش تعداد نتایج مثبت در جمعیت سالم، نتایج مثبت در بیماران نیز تحت تأثیر قرار می‌گیرد.[۱۱،۱۲] رقت شروع کننده باید به‌طور موضعی تعریف شود و تیتری که بالاتر ازتیتر ۹۵% از افراد طبیعی آن جامعه است به عنوان تیتر غیر طبیعی در نظر گرفته شود. توصیه می‌شود برای سنجش ANAs با سوبسترای HEp-2(000) در افراد بالغ رقت ۱:۱۶۰ مورد استفاده قرار گیرد.[۳] در مطالعه‌ای بر روی ۱۳۲۳۳ نمونه خون نشان داده شد که استفاده از رقت شروع کننده ۱:۱۶۰برای تست FANA، ارزش پیش گویی کننده مثبت برای anti-dsDNA و anti-ENA را افزایش می‌دهد و همچنین فواید کلینیکی و اقتصادی به همراه دارد.[۱۱] در گزارش تیتر، معمولاً آخرین رقتی که الگوی ANA در آن قابل سنجش است را گزارش می‌کند اما این مسئله غیر دقیق و وابسته به نظر شخص است و معمولاً استاندارد کردن داخل آزمایشگاهی انجام نمی‌شود.

چالش‌های آنالیز FANA

عواملی که می‌تواند در نتایج تست FANA اثر بگذارد شامل نوع سوبسترای سلولی، غلظت سلولی، وضعیت فیکساسیون سلولی، نوع وسایل و نشانگرها از قبیل کیفیت anti-human IgG کونژوگه شده با فلورسئین، سرم رفرانس اختصاصی، میکروسکوپ مورد استفاده و مهارت شخص مشاهده‌کننده می‌باشد.[۱۳]

میزان بعضی اتوآنتی‌ژن‌ها از جمله آنتی‌ژن Ro60 درسوبسترای HEp-2 cells کم است، که می‌تواند سنجش آنتی بادی علیه این مولکول را محدود کند و باعث نتیجه FANA منفی در بیماران با anti-Ro شود. به همین دلیل اخیراً از یک لایه سلولی اصلاح شده با نام HEp2000 برای سنجش anti-Ro بوسیله IFA استفاده می‌شود. در این لایه سلولی، بیان شدن Ro60 به دلیل انتقال DNA مکمل Ro60 افزایش می‌یابد.[۱۴] تعدادی از اتوآنتی ژن‌ها در سوبسترای مورد استفاده در روش IFA به میزان کم وجود دارد که می‌تواند باعث منفی شدن تست FANA شود که در این شرایط از روش‌های دیگر از جمله ELISA استفاده می‌شود.

روش‌های جایگزین (Alternative) برای سنجیدن ANA

روش‌های جایگزین برای سنجیدن ANA، شامل روش‌های ایمنواسی منفرد(Single) یا متعدد (Multiple) مولتیپل (شامل ELISA، chemiluminescence immunoassays [CLIAs]، LIAs و MBAs) می‌باشند. از فواید اصلی روش‌های جایگزین در مقایسه با روش ایمونوفلورسانس، آسانی انجام، توانایی انجام آنالیز کمی، قابلیت انجام تعداد زیاد نمونه و objective بودن بیشتر این روش‌ها برای بررسی ANA می‌باشد. از معایب روش‌های جایگزین، غیر قابل اعتماد بودن نتایج منفی به دلیل تعداد محدود آنتی ژن‌های مورد استفاده در این روش‌ها می‌باشد.

روش ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

ELISA یک روش حساس و سریع برای سنجیدن اتوآنتی بادی‌ها می‌باشد. در ELISA از صفحات پوشیده با آنتی‌ژن استفاده می‌شود. هر صفحه microtitre می‌تواند با آنتی‌ژن منفرد (Single) برای سنجیدن آنتی‌بادی اختصاصی و یا آنتی‌ژن (Multiple Ag) برای غربالگری ANAs پوشیده شود. آنتی‌ژن‌ها یا مشتق از سلول و یا نوترکیب (recombinant) هستند. سرم بیمار به صفحه آنتی‌ژنی اضافه می‌شود و سپس شسته می‌شود. اگر آنتی‌بادی باند شده به آنتی‌ژن وجود داشته باشد بعد از شستن هم باقی می‌ماند، سپس یک anti-human آنتی‌بادی کونژوگه به یک آنزیم از قبیل horseradish peroxidase به آن اضافه می‌شود. واکنش آنزیم باعث ایجاد تغییرات در رنگ محلول می‌شود که به میزان آنتی بادی متصل به آنتی‌ژن بستگی دارد.

محبوبیت روش ELISA به دلیل در دسترس بودن کیت ELISA، توانایی انجام این روش در چندین

platform، توانایی انجام تعداد زیاد نمونه کلینیکی و روش سریع آن در مقایسه با IFA می‌باشد، محدودیت این روش تعداد محدود اتوآنتی‌ژن استفاده شده (به طور تیپیک ۸ تا ۱۰) می‌باشد که باعث کاهش حساسیت روش ELISA نسبت به IFA می‌شود. همچنین با توجه به این که روش ELISA می‌تواند اتوآنتی ژن‌ها را دناچوره کند این روش ممکن است نتایج مثبت کاذب بدهد.

از روش ELISA به طور معمول برای سنجیدن anti-DNA استفاده می‌شود. در روش ELISA آنتی بادی‌های با avidity پایین‌تر سنجش می‌کند اما با روش‌های Farr یا Crithidia luciliae می‌توان آنتی بادی‌های با avidity بالا را چک نمود. بنابراین روش ELISA منجر به میزان بالاتر نتیجه مثبت تست anti-DNA می‌شود. ارتباط بین اختصاصیت، avidity و پاتوژنسیتی آنتی‌بادی‌ها هنوز به‌طور واضح مشخص نیست.

روش‌های Multiplex

تعدادی از روش‌های multiplex برای سنجیدن اتوآنتی‌ژن‌های هسته‌ای در دسترس می‌باشند، از بین این روش‌ها ایمونواسی خطی یک تکنیک مفید برای سنجیدن وجود آنتی بادی علیه اتوآنتی ژن‌های اختصاصی است.[۱۵] در این روش یک تعداد محدود آنتی ژن از قبیل پروتئین‌های تصفیه شده، پروتئین‌های نوترکیب یا پپتیدهای سنتز شده در خطوط موازی به یک غشاء نایلونی باند می‌شوند تا سوبسترای لازم برای سنجش آنتی بادی‌ها را فراهم سازند، سپس غشاء نایلونی در معرض سرم رقیق شده بیمار قرار می‌گیرد و وجود آنتی بادی با یک شناساگر anti-human IgG کونژوگه با آنزیم مشخص می‌شود. این سیستم خودکار است و فایده آن سنجیدن همزمان چندین اتو آنتی بادی که ارتباط کلینیکی با هم دارند می‌باشد.

روش دیگر، bead-based multiplex است که روش پیشرفته و جدید برای سنجیدن آنتی بادی‌ها علیه آنتی ژن‌های متعدد هسته‌ای غیر وابسته می‌باشد. در این روش آنتی بادی علیه آنتی ژن‌های مختلف به وسیله فلوسیتومتری به صورت کمی و کیفی گزارش می‌شود. نتایج روش multiplex می‌تواند به وسیله IFA تایید شود.[۱۶] این روش‌ها باندشدن فقط تعداد محدودی از ANAs را بررسی می‌کند و بنابراین می‌تواند خیلی از انواع اتو آنتی‌بادی اختصاصی را برای مثال در میوزیت التهابی از دست بدهد. بیماران مبتلا به پلی میوزیت، آنتی‌بادی‌های مختلفی علیه ترانسفر RNA سنتتاز (tRNA) و دیگر پروتئین‌ها را تولید می‌کنند اما روش multiplex می‌تواند فقط آنتی‌بادی علیه Jo-1 یا هیستیدیل tRNA سنتتاز را بسنجد. در بیماران مبتلا به لوپوس که بیش از ۲۰۰ نوع

ANAs را می‌توانند تولید کنند، با روش multiplex تعدادی از شایع‌ترین آنتی‌بادی‌ها از جمله آنتی بادی علیه DNA، کروماتین، Sm یا RNP69 را می‌توان تشخیص داد. هدف روش‌های multiplex فراهم نمودن تستی کمی و اختصاصی است. اما روش‌های multiplex تعدادی از ANAs پاتوژن را نمی‌توانند بسنجند. همچنین این روش‌ها مشکلی را که در مورد سنجیدن اتوآنتی بادی‌ها در افراد سالم داریم را نمی‌توانند به طور کامل حل کنند. بنابراین مثبت شدن ANA باید همیشه بر اساس وضعیت کلینیکی و احتمال بیماری قبل ازانجام تست تفسیر شود.

اتوماتیزه کردن روش ایمونوفلورسانس برای ANA

با توجه به وجود چالش‌ها و مشکلات موجود در روش‌های دستی ایمونوفلورسانس، در سال‌های اخیر برای سنجیدن ANA به روش ایمنوفلورسانس روش‌های اتوماتیزه استفاده شده است و باعث کاهش چالش‌های موجود در روش‌های دستی شده است. تاکنون سیستم‌های مختلف اتوماتیزه برای سنجیدن ANA ایجاد شده است که تفاوت آن‌ها در تعداد نمونه انجام شده در ساعت توسط دستگاه، فول اتوماتیزه بودن یا نبودن و تعداد الگوی را که می‌تواند تشخیص دهد می‌باشد. برای مقایسه روش‌های اتوماتیزه با روش دستی مطالعات مختلفی انجام شده است که اکثراً نشان دادند که روش اتوماتیزه قابل مقایسه با روش دستی می‌باشد.[۱۷،۴] جدول شماره ۳، مشخصات تکنیک‌های مختلف IFA اتوماتیزه را نشان می‌دهد.[۱۸]

Table 3 Characteristics of automated readers for detecting antinuclear antibodies by IFA testing[a]

Automated system	No. of samples/h	Full automation	No. of patterns recognized[b]	Nuclear stain[c]
Aklides	48–60	No	6[d]	DAPI
EUROPattern	90	Yes	7[d]	PI
Helios	150	Yes	7[d]	None
Image Navigator	90	Yes[e]	Positive/negative	None
NOVA View	48–60	Yes[e]	5[d]	DAPI
Zenit G-Sight	14–48	No	5[d]	None
Cytospot	96	Yes	Positive/negative	None

[a]Adapted from Tozzoli et al. (49) and Bizzaro et al. (50), with modification.
[b]Aklides: cytoplasmic, homogeneous, speckled, nucleolar, centromere, and multiple nuclear dots patterns; Helios: centromere, cytoplasmic, homogeneous, nuclear membrane, nuclear dots, nucleolar, and speckled (granular) patterns; EUROPattern: homogeneous, speckled, nucleolar, centromeric, nuclear dots, nuclear membrane, and cytoplasmic patterns; NOVA View: homogeneous, speckled, centromere, nucleolar, and nuclear dots cytoplasmic patterns; Zenit G-Sight: homogeneous, nucleolar, speckled, centromere, and mitochondrial patterns.
[c]DAPI, 4′, 6-diamidino-2-phenylindole; PI, propidium iodide.
[d]Titer prediction capabilities.
[e]Connection to pipetting station.

جدول شماره ۳: مشخصات روش‌های اتوماتیزه برای سنجیدن **ANA** به روش ایمونوفلورسانس

ANA در افراد طبیعی جامعه

مثبت شدن تست ANA در جمعیت عمومی جامعه نسبتاً شایع است. مطالعات نشان می‌دهند که حدود ¼ افراد طبیعی جوامع مختلف ANAs مثبت با تیترهای ۱:۴۰ یا بیشتر را دارا می‌باشند و حدود ۵ % از افراد طبیعی جامعه ANA مثبت با تیتر ۱:۱۶۰ دارند.[۱۹] در افراد طبیعی جامعه الگوی نوکلئار speckled شایع‌ترین الگو است.[۲۰]

هم چنین بر اساس کیت مورد استفاده در IFA، میزان مثبت شدن تست FANA در افراد طبیعی جامعه می‌تواند تا ۳۰-۲۰ % هم گزارش شود. در تعدادی از مطالعات، تواتر مثبت شدن ANA در زنان بالاتر از مردان است و تفاوت‌های نژادی و قومی نیز روی نتایج تأثیر داشته است.[۲۱] سن ممکن است یک فاکتور مهم نباشد از آنجایی که بچه‌ها نیز ممکن است پاسخ‌های ANA مهمی را نشان دهند.[۲۲] دلیل مثبت شدن ANAs در افراد طبیعی جامعه هنوز ناشناخته است هر چند مثبت شدن ANA می‌تواند به عنوان استعداد زمینه‌ای برای اتوایمیونیتی در نظر گرفته شود.[۱۹]

در یک مطالعه گذشته نگر، بیش از ۹۰ % از افرادی که به دلیل ANA مثبت به درمانگاه روماتولوژی ارجاع شده بودند، بیماری روماتیسمی مرتبط با ANA نداشتند که نشان دهنده انجام تست در افراد با احتمال پایین بیماری روماتیسمی قبل از تست ANA می‌باشد. در این مطالعه ارزش پیش گویی کننده مثبتANA برای بیماری لوپوس ۲/۱ % بود و همچنین هیچ کدام از افراد با ANA با تیتر کم‌تر از ۱:۱۶۰ بیماری روماتیسمی نداشتند.[۵]

مطالعات اخیر نشان داده‌اند که تعدادی از نتایج مثبت ANA در افراد طبیعی جامعه ممکن است در اثر وجود آنتی بادی علیه آنتی‌ژنی به نام DFS۷۰ باشد. [۲۳] anti-DFS70 باعث ایجاد الگو dense fine speckles (DFS) در IFA می‌شود که می‌تواند با الگوی هوموژن اشتباه شود. مطالعات بعدی نشان داد که پروتئین تشخیص داده شده به وسیله این آنتی‌بادی پروتئین PC4 و SFRS1 است (همچنین به عنوان فاکتور رشد مشتق از اپیتلیوم یا LEDGF شناخته شده است). هر چند آنتی بادی علیه DFS۷۰ ممکن است با تعدادی از وضعیت‌های کلینیکی همراهی داشته باشد اما به طور شایعی در افراد سالم یافت می‌شود. بنابراین وجود anti-DFS70 ممکن است تشخیص بیماری اتوایمیون را رد کند.

معمای اختصاصیت ANA

در برخورد با هر تست ANA باید ۳ واقعیت را در نظرگرفت: اول اینکه تواتر مثبت شدن FANA در افراد طبیعی جامعه ممکن است بالا باشد، دوم اینکه بیماری‌های روماتیسمی در جامعه ناشایع هستند وسوم اینکه اغلب افراد با تست ANA مثبت هرگز مبتلا به بیماری روماتیسمی نمی‌شوند. این حقایق به ما نشان می‌دهد که در استفاده از تست ANA به عنوان تست غربالگری برای بررسی بیماران باید احتیاط شود به طوری که تعداد زیادی از نتایج ANA می‌تواند مثبت کاذب باشد. حتی با روش ELISA یا multiplex نیز نتایج مثبت کاذب ممکن است قابل توجه باشد. در پزشکی تواتر بالای مثبت کاذب در یک تست می‌تواند به انجام تست‌های گران قیمت و اغلب غیر ضروری، صرف هزینه و ایجاد نگرانی در بیماران منجر گردد. برای مثال، خیلی از روماتولوژیست ها بیمارانی را داشته‌اند که به آن‌ها گفته شده که به دلیل مثبت شدن ANA ممکن است مبتلا به لوپوس باشند و این امر باعث اضطراب پایدار در بیمار و درمان‌های غیر ضروری شده است. زمانی که برای بیمار تشخیص گذاشته می‌شود اغلب مشکل است که بیمار را متقاعد نمود پزشکی که تشخیص را برای وی گذاشته است اشتباه کرده است.[۱]

از طرفی، بیماران مبتلا به بیماری اتوایمیون از جمله لوپوس سال‌ها قبل از تشخیص بیماری ممکن است تست FANA مثبت داشته باشند که به عنوان مرحله پره‌اتوایمیونیتی شناخته می‌شود.[۲۴] متاسفانه تست ANA معمولاً درافرادی انجام می‌شود که احتمال بیماری قبل از انجام تست پایین است (برای مثال شکایت‌های غیر اختصاصی مانند خستگی یا آرترالژی دارند). دراین گونه موارد، ۲ روش برای نشان دادن ارزشمند بودن یا نبودن نتیجه تست FANA وجود دارد که شامل تیتر و الگوی FANA و در نهایت بررسی آنتی بادی‌های اختصاصی شامل anti-DNA، anti-Ro و anti-La می‌باشد.[۲۵] همچنین از آنجایی که اغلب افراد سالم که ANAs مثبت دارند مبتلا به بیماری همراه با ANA نمی‌شوند، استفاده از روش‌های multiplex درباره اینکه آیا فرد باید به دقت مورد توجه قرار گیرد یا خیر، اطلاعات ارزشمندی می‌تواند به ما بدهد.

توصیه‌های عملی

۱- اتوآنتی‌بادی‌ها (ANAs) در اکثر نزدیک به تمام بیماری‌های خودایمن دیده می‌شوند و گاهی در عفونت‌های مزمن، بیماری‌های لنوپرولیفراتیو، عفونت‌ها و حتی در افراد نرمال جامعه ممکن

است دیده شود.

۲- تست ANA از نظر تشخیصی حساسیت بالا دارد ولی اختصاصیت آن برای تشخیص پایین است.

۳- وقتی در یک بیمار مشکوک به بیماری خود ایمن هستیم، می‌توان برای غربالگری آزمایش ANA درخواست بشود.

۴- در مواردی که تست ANA مثبت می‌باشد، تیتر ANA و مدت زمانی که این تست مثبت می‌باشد، حائز اهمیت می‌باشد.

۵- در صورتی که تست ANA مثبت باشد، با توجه به شرح حال بیمار و معاینات بالینی و برحسب اینکه از نظر بالینی به کدام یک از بیماری‌های خود ایمن مشکوک باشیم، لازم است، آزمایشاتی را که برای آن بیماری اختصاصیت بیشتری دارد و در صفحات قبل توضیح داده شده است، درخواست بشود.

۶- اگر در یک بیمار، فقط تست ANA مثبت باشد و علایم بالینی و آزمایشگاهی التهاب وجود نداشته باشد، نیازی به تجویز دارو وجود ندارد و بیمار را بر حسب علایم بالینی می‌توان پیگیری کرد.

۷- گاهی در بعضی موارد، ANA با عیار بالا مثبت است و هیچگونه علایم بالینی و آزمایشگاهی به نفع بیماری‌های خود ایمن نداریم. در این موارد، در اکثر اوقات بعد از مدتی بیماری خودش را نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری

تست ANA هر چند به عنوان معیار تشخیصی در تعدادی از بیماری‌های اتوایمیون در نظر گرفته شده است اما از طرفی در افراد طبیعی جامعه نیز می‌تواند مثبت باشد. این موضوع باعث پیچیدگی استفاده از تستANA در تشخیص بیماری می‌گردد به خصوص اگر احتمال بیماری قبل از انجام تست پایین باشد. به همین منظور تست ANA باید در افرادی استفاده شود که احتمال بیماری اتوایمیون برای آن‌ها بالا است. در صورت استفاده تشخیصی از تست ANA باید به موارد مثبت و منفی کاذب این تست و عوامل مؤثر بر این نتایج آگاهی داشته باشیم. در صورت مثبت شدن تست ANA در فردی که احتمال بیماری اتوایمیون در وی بالا است، بر اساس تظاهرات بالینی بیمار می‌توان از آنتی‌بادی‌های اختصاصی برای رسیدن به تشخیص استفاده نمود.

References:

1. Pisetsky DS. Antinuclear antibody testing [mdash] misunderstood or misbegotten? Nature Reviews Rheumatology. 2017.
2. Meroni PL, Schur PH. ANA screening: an old test with new recommendations. Annals of the rheumatic diseases. 2010;69(8):1420-2.
3. Agmon-Levin N, Damoiseaux J, Kallenberg C, Sack U, Witte T, Herold M, et al. International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. Annals of the rheumatic diseases. 2013:annrheumdis-2013-203863.
4. Tebo AE. Recent approaches to optimize laboratory assessment of antinuclear antibodies. Clinical and Vaccine Immunology. 2017;24(12):e00270-17.
5. Abeles AM, Abeles M. The clinical utility of a positive antinuclear antibody test result. The American journal of medicine. 2013;126(4):342-8.
6. Hargraves MM, Richmond H, Morton R, editors. Presentation of two bone marrow elements; the tart cell and the LE cell. Proceedings of the staff meetings Mayo Clinic; 1948.
7. Tan EM. Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. Advances in immunology. 1989;44:93-151.
8. Schulte-Pelkum J, Fritzler M, Mahler M. Latest update on the Ro/SS-A autoantibody system. Autoimmunity reviews. 2009;8(7):632-7.
9. Ghillani P, André C, Toly C, Rouquette A, Bengoufa D, Nicaise P, et al. Clinical significance of anti-Ro52 (TRIM21) antibodies non-associated with anti-SSA 60kDa antibodies: results of a multicentric study. Autoimmunity reviews. 2011;10(9):509-13.
10. Damoiseaux J, von Mühlen CA, Garcia-De La Torre I, Carballo OG, de Melo Cruvinel W, Francescantonio PLC, et al. International consensus on ANA patterns (ICAP): the bumpy road towards a consensus on reporting ANA results. Autoimmunity Highlights. 2016;7(1):1.
11. González DA, de León AC, Varela AR, García MG, de Sequera Rahola M, Pérez MdCR, et al. Autoantibody detection with indirect immunofluorescence on HEp-2 cells: starting serum dilutions for systemic rheumatic diseases. Immunology letters. 2011;140(1):30-5.
12. Abeles AM, Gomez-Ramirez M, Abeles M, Honiden S. Antinuclear antibody testing: discordance between commercial laboratories. Clinical rheumatology. 2016;35(7):1713-8.
13. Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, Solomon DH, Homburger HA. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. Archives of pathology & laboratory medicine. 2000;124(1):71-81.
14. Peene I, Van Ael W, Vandenbossche M, Vervaet T, Veys E, De Keyser F. Sensitivity of the HEp-2000 substrate for the detection of anti-SSA/Ro60 antibodies. Clinical rheumatology. 2000;19(4):291-5.
15. Damoiseaux J, Boesten K, Giesen J, Austen J, Cohen Tervaert J. Evaluation of a Novel Line-Blot Immunoassay for the Detection of Antibodies to Extractable Nuclear Antigens. Annals of the New York Academy of Sciences. 2005;1050(1):340-7.
16. De Beéck KO, Vermeersch P, Verschueren P, Westhovens R, Mariën G, Blockmans D, et al. Antinuclear antibody detection by automated multiplex immunoassay in untreated patients at the time of diagnosis. Autoimmunity reviews. 2012;12(2):137-43.
17. Daves M, Blecken J, Matthias T, Frey A, Perkmann V, Dall A, et al. New automated indirect immunofluorescent antinuclear antibody testing compares well with established manual immunofluorescent screening and titration for antinuclear antibody on HEp-2 cells.

Immunologic research. 2017;65(1):370-4.

18. Van den Bremt S, Schouwers S, Van Blerk M, Van Hoovels L. ANA IIF Automation: Moving towards Harmonization? Results of a Multicenter Study. Journal of immunology research. 2017;2017.
19. Olsen NJ, Karp DR. Autoantibodies and SLE [mdash] the threshold for disease. Nature Reviews Rheumatology. 2014;10(3):181-6.
20. Marin GG, Cardiel MH, Cornejo H, Viveros ME. Prevalence of antinuclear antibodies in 3 groups of healthy individuals: blood donors, hospital personnel, and relatives of patients with autoimmune diseases. JCR: Journal of Clinical Rheumatology. 2009;15(7):325-9.
21. Satoh M, Chan EK, Ho LA, Rose KM, Parks CG, Cohn RD, et al. Prevalence and sociodemographic correlates of antinuclear antibodies in the United States. Arthritis & Rheumatology. 2012;64(7):2319-27.
22. Hilário MOE, Len CA, Roja SC, Terreri MT, Almeida G, Andrade LEC. Frequency of antinuclear antibodies in healthy children and adolescents. Clinical pediatrics. 2004;43(7):637-42.
23. Conrad K, Röber N, Andrade LE, Mahler M. The clinical relevance of anti-DFS70 autoantibodies. Clinical reviews in allergy & immunology. 2017;52(2):202-16.
24. Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, Scofield RH, Dennis GJ, James JA, et al. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. New England Journal of Medicine. 2003;349(16):1526-33.
25. Mariz HA, Sato EI, Barbosa SH, Rodrigues SH, Dellavance A, Andrade LE. 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 & Rheumatology. 2011;63(1):191-200.