T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SİSTEMİK LUPUS ERİTEMATOZİS (SLE) TANISINDA ANTİ- ds DNA ELISA TESTİNİN OPTİMAL CUT-OFF DEĞERİNİN BELİRLENMESİ

ABDUH MURSHED

MİKROB İYOLOJİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2017

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2012970134

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SİSTEMİK LUPUS ERİTEMATOZİS (SLE) TANISINDA ANTİ-ds DNA ELISA TESTİNİN OPTİMAL CUT-OFF DEĞERİNİN BELİRLENMESİ

MİKROBİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ABDUH MURSHED

Danışman Öğretim Üyesi: Yrd. Doç. Dr. Yavuz DOĞAN

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2012970134

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mikrobiyoloji Yüksek Lisans Programı öğrencisi **Abduh MURSHED**, **"Sistemik Lupus Eritematozis (SLE) Tanısında Anti-dsDNA ELISA Testinin Optimal Cut-Off Değerinin Belirlenmesi"** konulu Yüksek Lisans tezini **11.09.2017** tarihinde başarı ile tamamlamıştır.

Yrd. Doç. Dr. Yavuz DOĞAN
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
BAŞKAN

Prof. Dr. Sevin KIRDAR
Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi
ÜYE

Doç. Dr. Cem ERGON
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
ÜYE

Prof. Dr. Nuri ÖZKÜTÜK
Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi
YEDEK ÜYE

Prof. Dr. Aydan ÖZKÜTÜK
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
YEDEK ÜYE

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım; geleceğe yönelik bilimsel bakış açısı kazandıran; tezimin her aşamasında destek ve katkılarını gördüğüm; yetişmemde büyük emeği geçen danışman hocam Sayın Yard. Doç. Dr. Yavuz DOĞAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı İmmünoloji Birimi laboratuvar çalışanlarına tez aşamalarında bana gösterdikleri katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimimde emeği geçen Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma ve desteklerinden dolayı arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Saygılarımla

Abduh MURSHED

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER…… i
TABLO DİZİNİ……... iii
ŞEKİL DİZİNİ……... iv
KISALTMALAR…… v
ÖZET……..... 1
ABSTRACT…….....4
1. GİRİŞ VE AMAÇ …… 7
2. GENEL BİLGİLER ……...…....9
2.1. Sistemik Lupus Eritematozus (SLE)'un Tarihçesi.……...9
2.2. SLE Tanımı……. …….....9
2.3. SLE Sınıflama Kriterleri……...……...9
2.4. Etyopatogenez…… ……11
2.5. Lupus oluşumunda hormonların rolü…...…..……14
2.6. Çevresel faktörler…….....15
2.7. Laboratuvar Testleri……...……..17
2.8. Antinükleer Antikorlar ……....17
2.9. Anti-DNA Antikorları ……....18
2.9.1. Anti-ssDNA Antikorları……...……....18
2.9.2. Anti-dsDNA Antikorları……..... 19
2.9.2.1. Antikor Üretimi……...……20
2.9.2.2. Anti-dsDNA Ölçümü…….……21
2.9.2.3. Titre, Patojenite ve Hastalık Aktivitesi…….……..23
2.9.2.4. Patojenik Mekanizması……...……25
2.9.2.4.1. Direkt Etkiler.. ……..... 25
2.9.2.4.2. İndirekt Etkiler…….27
2.9.2.4.3. Patojeniteye Katkıda Bulunabilen Faktörler..…… 28
2.10. Verilerin Değerlendirilmesi…….....……..28
3. GEREÇ VE YÖNTEM……..33
3.1. Araştırmanın Tipi…….....33
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı……..33

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi……..…33
3.4. Çalışma Materyali…….....33
3.4.1. Serum Örneklerinin Toplanması……..……...33
3.5. Araştırmanın Değişkenleri……..….33
3.6. Veri Toplama Araçları……...……..……34
3.6.1. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeleri……..……...…34
3.6.2. Orgentec® Anti-dsDNA EIA Yöntemi…….……..…....35
3.6.2.1. Orgentec® Anti-dsDNA IgG EIA Test İçeriği…….……..35
3.6.2.2. Orgentec® Anti-dsDNA IgG EIA Testinin Çalışılması……..37
3.7. Araştırma Planı……39
3.8. Araştırmanın Sınırlılıkları…….....39
3.9. Etik Kurul Onayı……..……...39
4. BULGULAR ……..40
4.1. Hasta Gruplarının Değerlendirilmesi…… 40
4.2. Demografik Bulgular……..... 41
4.3. Orgentec® Anti-dsDNA EIA Sonuçları…….....43
4.4. Gruplar arasında farklılığın istatistiksel analizi…….....48
4.5. Orgentec® Anti-dsDNA EIA Testinde Eşik Değerin Belirlenmesi 49
4.6. Anti-dsDNA EIA Sonuçları ile ANA ve ENA Profilleri Arasındaki İlişki 62
4.7. Anti-dsDNA EIA Sonuçları ile dsDNA IIF (*Crithidia luciliae, CLIFT*) Testi Arasındaki İlişki 65
5. TARTIŞMA VE SONUÇ……..……....67
6. KAYNAKLAR ……..76
7. EKLER…….....88
7.1. Etik Kurul Onayı……..... 88
7.2. Özgeçmiş……..… 91

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. SLE tanısı için kriterler…….....10
Tablo 2. Sistemik Lupus Eritematoz patogenezinde rol oynayan gen bölgeleri.....12
Tablo 3. Östrojenin bağışık yanıt üzerindeki etkileri 14
Tablo 4. SLE Patogenizinde ilişkili olan çevresel faktörler 15
Tablo 5. SLE'de anti-DNA antikorlarının karşılaştırılması..... 18
Tablo 6. Anti-dsDNA antikorlarının patogenezine katkıda bulunabilen faktörler..... 28
Tablo 7. Orgentec® anti-dsDNA IgG EIA test kiti içeriği…..…….....35
Tablo 8. 96 çukurlu EIA plağı deney şablonu… …...…….... 37
Tablo 9. Çalışmaya alınan örneklerin demografik verileri ……..……..... 42
Tablo 10. Hastalık gruplarına göre elde edilen EIA değerlerinin dağılımı…….....45
Tablo 11. Çalışmaya alınan hastalık gruplarına göre EIA sonuçlarının dağılımı ….....46
Tablo 12. Test sonucu pozitif bulunan gruptaki Anti ds DNA EIA değerlerinin dağılımları.....47
Tablo13. Test sonucu negatif bulunan gruptaki Anti ds DNA EIA değerlerinin dağılımları…….....…...47
Tablo 14. Tek yönlü ANOVA testi.....49
Tablo 15. Çalışmaya alınan tüm gruplara ilişkin EIA test sonuçları..... 50
Tablo 16 . EIA Kesim noktalarının karşılaştırılması.....…….…...60
Tablo 17. Farklı kesim noktalarına göre duyarlılık, özgüllük, PPD, NPD, PLHR ve NLHR değerleri ….....62
Tablo 18. SLE tanılı grupta EIA sonuçları ile CLIFT sonuçları arasındaki ilişki.....65
Tablo 19. SLE tanısı alan hasta grubunda EIA sonuçları pozitif çıkan hasta örneklerinde CLIFT sonuçları arasındaki ilişki..... 66

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. SLE genetik, hormonal ve çevresel faktörleri..... 11
Şekil 2. Sistemik Lupus Eritematozus patogenezi..... 16
Şekil 3. Anti-dsDNA antikorlarının immunofloresan boyanma paterni……..... 19
Şekil 4. *C. luciliae* substratında anti-dsDNA antikorlarının immunofloresan boyanma paterni 22
Şekil 5. Anti-dsDNA antikorlarının patojenik mekanizmaları..… ..…..……..……...26
Şekil 6. Duyarlılık değerinin hesaplanması…….. ……..…….……..... 29
Şekil 7. Hastalığı olan ve olmayan populasyonda test sonuçlarının dağılımı……..31
Şekil 8. ROC eğrisinde gerçek pozitiflik oran ve yalancı pozitiflik oran ilişkisi…..... 32
Şekil 9. Serum örneklerinin hastalık gruplarına göre dağılımı…….……..…….....41
Şekil 10. Orgentec® anti-dsDNA IgG testi örneği ……..……...43
Şekil 11. ROC Analizi……...……..59
Şekil 12. SLE tanısı almış hasta grubunda ANA patern dağılımı…… ….63
Şekil 13. SLE grubu hastalarda ANA pozitif bulunan örneklerin ENA panelinde yer alan özgül antijenlerle bağlantısı..... 64

KISALTMALAR

SLE : Sistemik Lupus Eritematozus
SLICC : The Systemic Lupus International Collaborating Clinics
ANA : Anti nükleer antikor
Anti-dsDNA : Anti çift iplikli deoksiribonükleik asit
Ig : Immunglobulin
CLIFT : *Crithidia luciliae* immunfloresan testi
EIA : Enzim immunassay
IUIS : The International Union of Immunologic Societies
WHO : World Health Organization
AF : Arthritis Foundation
CDC : Centers for Disease Control and Prevention
ENA : Ekstrakte edilebilir nükleer antijen antikorları
ROC : Alıcı işletim karakteristiği
ACR : American College of Rheumatology
IL : İnterlökin
TGF : Transforme edici büyüme faktörü
BLys : B-lenfosit stimulatörü
TNF α : Tümör nekroz faktör α
IF : İmmunofloresan
SSc : Sistemik Skleroz
RA : Romatoid artrit
ssDNA : Tek iplikli DNA
MCTD : Karışıl konnektif doku hastalığı
ELISA : Enzim bağlantılı immunosorbent testi
IIF : İndirekt immun floresan
NMDA : N-metil-D-aspartat
TLR : Toll benzeri reseptör
pDCs : Plazmasitoid dendritik hücreler
PPD : Pozitif prediktif değer
NPD : Negatif prediktif değer
PLHR : Pozitif olabilirlik oranı
NLHR : Negatif olabilirlik oranı

Sistemik Lupus Eritematozis (SLE) Tanısında Anti ds-DNA ELISA Testinin Optimal Cut-Off Değerinin Belirlenmesi

Abduh MURSHED, **Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı İnciraltı/İzmir**

ÖZET

Amaç: Sistemik Lupus Eritematozus birçok organı tutan otoimmun sistemik bağ dokusu hastalığıdır. Hastalık farklı klinik evrelerde kadınlarda çok daha sık olmakla birlikte her yaş döneminde görülebilir. SLE'li hastalarda dolaşımda birçok otoantikor varlığı gösterilmiştir. Bu otoantikorlar arasında dsDNA'ya karşı ortaya çıkan otoantikor yanıtı SLE'nin klinik gelişimiyle doğrudan ilişkilidir. Anti-ds DNA testi hastalığın tanısı ve hastalığın seyrinin takip edilmesi için en sık kullanılan test yöntemidir. Günümüzde anti-ds DNA tespitinde en sık kullanılan yöntem EIA yöntemidir. Anti-dsDNA IgG tespitinde kullanılan ticari kitler incelendiklerinde karar sınır değerlerinin (cut-off) birbirlerinden farklı oldukları görülmektedir. Tanısal testlerin kullanımında ortaya çıkan hatalı kullanımlar ve laboratuvarlar arasında ortaya çıkan uyumsuzluklar otoantikor testlerin standardize edilmesi gerekliliğini ortaya koymuştur. Bu amaçla, Uluslararası Otoimmünite Standardizasyon Komitesi bazı öneriler yayınlamışlardır. Anti-ds DNA test için ortaya koyulan önerilerden birisi de her laboratuvarın ROC analizi ile kendi referans sınır değerini belirlemesidir. Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı İmmünoloji biriminde 2013 yılında yeni bir ticari anti-dsDNA IgG EIA testi kullanılmaya başlanmıştır. Bu testin tanısal sınır değerinin daha önceki kulanılan testin sınır değerinden daha düşük olması nedeni ile pozitif test sonuçlarının sayısında bir artışa gözlenmiştir. Bu çalışmanın amacı anti-ds DNA IgG EIA testinin SLE tanısında tanısal karar vermede yardımcı olacak optimal cut-off değerinin belirlenmesi ve klinisyenlerin karar vermelerinde daha etkin rol oynayarak gereksiz test istem ve tedavi kayıplarını önlemesinin sağlanmasıdır.

Yöntem: Dokuz Eylül Üniversitesi Merkez Laboratuvarı İmmunoloji birimine Aralık 2014-Eylül 2015 tarihleri arasında başvuran anti-dsDNA EIA istemi yapılan klinik olarak SLE tanısı almış 274 hasta ve farklı hastalık tanıları ile gönderilen 627 hastanın anti-ds DNA EIA sonuçları geriye doğru tarandı. Kontrol grubu olarak sağlıklı kan donorlerinden elde edilen

serum örnekleri kullanıldı. Sistemik Lupus Eritematozis (SLE) hasta grubunda anti-ds DNA EIA testini tanısal performansı diğer gruplarla karşılaştırılarak incelendi. Anti-ds DNA EIA sonuçları ile Crithidia IFA (CLIFT) testi arasındaki ilişki incelendi.

Testin tanısal karar verme yeterliliği anti-ds DNA değerleri kullanılarak İşlem Karakteristik (ROC) Eğrisi ile belirlendi. Çalışmada Anti-ds DNA EIA testinin duyarlılığı, seçiciliği, pozitif ve negatif prediktif değer, pozitif ve negatif olabilirlik oranı farklı tanısal sınır değerleri ile karşılaştırıldı.

Bulgular: Çalışmada toplam 924 serum örneğine ait sonuçlar incelendi. Orgentec® anti-dsDNA EIA kitin referans sınır değeri olan 20 IU/mL dikkate alındığında bu değerin altında negatif bulunan 507 örneğin (% 54.87) EIA ortalamaları 11.36 IU/mL (1.58-19.83 ± SE 0.17), ≥ 20 IU/mL üzerinde bulunan pozitif 417 örneğin (% 45.13) EIA ortalamaları 82.12 IU/mL (20-969.79 ± SE 5.81) olarak belirlendi. SLE tanısı alan 274 örneğin 254'ünde (%92,71) EIA sonuçları pozitif olup EIA değerlerinin ortalaması 113,04 IU/mL bulundu. Çalışmaya alınan diğer grupların ağırlıklı EIA ortalamaları ise 30,48 IU/mL olarak belirlendi. SLE tanısı alan gruptaki hastaların EIA ortalamaları diğer gruplarla karşılaştırıldığında istatiksel olarak anlamlılık olduğu belirlendi. Çalışmaya alınan toplam 924 hastada anti-ds DNA EIA pozitif örnek oranı % 45,13'olarak belirlendi. Bu grupta %60,91'i SLE tanısı alanlar iken diğer farklı klinik tanı alanlarda pozitiflik oranı %39,09 olarak bulundu.

CLIFT test istemi yapılan toplam 142 serum örneğinden toplam 67 örnek sonucu (%47,18) birbirleriyle uyumsuz bulunmuştur. Sonuçları uyumsuz örneklerde 3 serum örneğinde sonuçlar CLIFT pozitif EIA negatif iken 64 serum örneğinde sonuçlar CLIFT negatif EIA pozitif olarak belirlenmiştir. EIA test sonuçlarıyla karşılaştırıldığında CLIFT testinin duyarlılığı %51,14 seçiciliği ise %72,72 olarak belirlenmiştir.

ROC analizi sonrası eğrinin altında kalan alan 0,911 ile %95 güven aralığı içerisinde yöntemin tanısal yeterliliği anlamlı bulundu (p:<0,001). Üretici firmanın tanısal eşik değeri dahil olmak üzere en ideal duyarlılık ve seçiciliğe ait farklı kesim noktaları duyarlılık, seçicilik pozitif ve negatif prediktif değer, pozitif ve negatif olabilirlik oranları gibi tanısal bir testin değerlendirilmesinde kullanılan belirteçler birbirleriyle karşılaştırıldı. Üretici firmanın önerdiği

20 IU/mL eşik değer dikkate alındığında testin duyarlılığı %92,70, seçiciliği %74,92 pozitif olabilirlik oranı 3,69 olarak bulundu. Referans olarak 30 IU/mL tanısal eşik değer alındığında değerler sırasıyla %73,35, %88,76 ve 6,63 olarak belirlendi.

Sonuç: Anti-ds DNA EIA pozitifliği SLE tanı alan grupta diğer farklı klinik tanıyla gelen gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde daha yüksektir. Buda anti-ds DNA testinin SLE hastaları için anlamlı olduğunu göstermektedir. Ancak SLE dışında diğer bağ dokusu hastalıkları tanısı almış veya farklı klinik tanı almış hasta gruplarında da anti-ds DNA EIA pozitifliğinin görülmesi bu testin özgül olmadığını göstermektedir. Tanısal algoritmalarda pozitif bulunan EIA sonuçlarının CLIFT ile doğrulanması önerilmektedir ancak çalışmamızda EIA ile CLIFt testinin uyumluluğunun %50 bulunması CLIFT testinin EIA sonuçlarını doğrulamak için kullanılamayacağını göstermektedir. Orgentec® anti-dsDNA EIA testinin ROC analizi sonrası tanısal karar vermede yeterli bir test yöntemi olduğuna karar verildi. SLE dışındaki hasta gruplarında yalancı pozitiflik oranının yüksek olması nedeniyle testin eşik değerinin daha yüksek bir değer ile yeniden değerlendirilmesinin yararlı olacağı düşünüldü. Sonuç olarak laboratuvarlar kullanılan test yöntemi ve performansı konusunda klinisyeni mutlaka bilgilendirmeli ve anti-ds DNA EIA testi için tanısal performansı arttırmak için kendi eşik değerlerini belirleyerek bunu klinisyenlerle paylaşmalıdır. Klinisyen açısından ise test istemleri hastanın klinik olarak SLE şüphesi olduğu durumda istenmelidir ve test sonuçları bunlar göz önünde bulundurularak değerlendirilmelidir. Hastalığın kliniğine göre farklı tanısal eşik değerlerin kullanılabilmesi klinik ile işbirliği içerisinde belirlenmesi gereksiz test istemlerini ve gereksiz tanı ve tedavi uygulanmasını azaltarak sağlık harcamalarının düşürülmesinde katkı sağlayacaktır.

Anahtar kelimeler: SLE, Anti-ds DNA, ROC, bağ dokusu hastalıkları, otoantikor, tanısal sınır değer, cut-off

Determination of Optimal Cut-Off Value of Anti ds-DNA ELISA in the Diagnosis of SystemicLupusErithematosis (SLE)

ABSTRACT

Objective: Systemic Lupus Erythematosus is an autoimmune systemic connective tissue disease that affects many organs. The disease can be seen at any age period with more frequent females at different clinical stages. Many autoantibodies are shown in blood circulation in patients with SLE. Among these autoantibodies, the autoantibody response to dsDNA is directly related to the clinical development of SLE. Anti-ds DNA test is the most commonly used test method for the diagnosis of the disease and the follow-up of the disease. Nowadays, the most commonly used method for detecting anti-dsDNA is the EIA method. When the commercial kits used for the detection of anti-dsDNA IgG were examined, it was seen that the cut-off values were different from each other. Incorrect use of diagnostic test and inconsistencies between laboratories were demonstrated the necessity of standardizing autoantibodies tests. For this purpose, the International Committee on Standardization of Autoimmunity had published some recommendations. One of the proposal for anti-dsDNA testing was to determine each laboratory's own reference cut-off value by ROC analysis. A new commercial anti-ds DNA IgG EIA test was started to be used in the Immunology Unit of Central Laboratory of Dokuz Eylül University Hospital in 2013. An increase in the number of positive test results was observed for the reason that the diagnostic cut-off value of this test was lower than the cut-off value of the previous test used. The aim of this study is to determine the optimal cut-off value of the anti-ds DNA IgG EIA test to assist in diagnostic accuracy in SLE and to prevent unnecessary test request and unsuccessful treatment by playing a more effective role in clinician's decision **Method:**Study samples of 274 patients who admitted to the Immunology Unit of DokuzEylül University Central Laboratory from December 2014 to September 2015 and were clinically diagnosed with SLE and 627 patients who were referred with different disease diagnoses were retrospectively screened for anti-dsDNA EIA.

Serum samples from healthy blood donors were used as the control group. The diagnostic performance of the anti-ds DNA EIA test in the Systemic Lupus Erythematosus (SLE) patient

group was examined to comparing with other groups. The relationship between anti-dsDNA EIA results and the Crithidia IFA (CLIFT) test was examined.

The ability of diagnostic accuracy was determined by the Receiver Operating Characteric (ROC) curve using anti-dsDNA values. In this study, the sensitivity, specificity, positive and negative predictive value, positive and negative likelihood ratio of anti-ds DNA EIA test were compared different diagnostic cut-off value.

Results: A total of 924 serum samples results were examined in this study. According to the reference cut-off value 20 IU/mL in Orgentec® anti-ds DNA EIA kit, the EIA average of 507 (54.87%) negative samples which were < 20 IU/mL was determined 11.36 IU/mL (1.58-19.83 ± SE 0.17) and the EIA average of 417 (45.13%) positive samples which were ≥ 20 IU/mL was determined 82.12 IU/mL (20-969.79 ± SE 5.81). EIA results were positive in 254 (92.71%) of 274 samples diagnosed with SLE and the average of EIA values was 113.04 IU/mL. The average EIA values of other groups in study was 30.48 IU/mL. The EIA averages of the patients diagnosed with SLE were statistically significant when compared with the other groups. The anti-ds DNA EIA positive sample rate was determined as 45.13% in total of 924 patients in this study. While in this group, 60.91% were SLE patients, the positivity rate was 39.09% in patients with different clinical diagnosis.

A total of 67 (47.18%) sample results were found to be incompatible with each other in 142 serum samples which requested to CLIFT test. While the results of three serum samples were CLIFT positive and EIA negative in incompatible sample results, the results of 64 serum samples were determined CLIFT negative EIA positive. The sensitivity of CLIFT test was 51.14% and the specificity was 72.72% when compared with EIA test results.

The area under the ROC curve was 0.911 and the diagnostic accuracy of the test was detected as statistically significant 95% confidence intervals (p:<0,001). The markers used to assess a diagnostic test such as sensitivity, specificity, positive and negative predictive value, positive and negative likelihood ratios, were compared with different cut-off values for optimal susceptibility and specificity, incluiding the manufacturer's diagnostic threshold value. Considering the threshold value of 20 IU/mL recommended by the manufacturer, the sensitivity of the test was 92.70%, the specificity was 74.92% and positive likelihood ratio was 3,69. When the threshold value was evaluated 30 IU/mL as reference, the values were determined as 73.35%, 88,76% and 6.63, respectively.

Conclusion: Anti-dsDNA EIA positivity was significantly higher in the SLE-diagnosed group when compared to other groups with different clinical diagnosis. This showed that anti-ds DNA test was valuable for SLE patients. However, the presence of anti-ds DNA EIA positivity in patients with other connective tissue disorders except SLE or in patients with different clinical diagnosis suggest that this test was not specific. Confirmation of positive EIA results by diagnostic algorithms with CLIFT is recommended, but in our study because of the compatibility of EIA and CLIFT test was detected 50%, indicates that the CLIFT test could not be used to validate EIA results. Orgentec® anti-ds DNA EIA test was decided to be an adequate test method for diagnostic accuracy after ROC analysis. Because of the high rate of false positives in patient groups except SLE, it was considered useful to re-evaluated the threshold value of test with a higher value.

As a conclusion, laboratories should inform the clinicians about the used test method and performance and should share with the clinicians by setting their threshold values to increase the diagnostic performance fort he anti-ds DNA EIA test. From the clinician point of view, the test requirements should be reguested when the patient has clinical SLE suspicion and the test results should be considered accordingly this. The ability to use different diagnostic thresholds according to the clinic of disease and the determination in cooperation with the clinic will help to reduce unnecessary test requirements, diagnosis and treatment, thereby reducing health expenditures.

Keywords: SLE, Anti-ds DNA, ROC, connective tissue disease, autoantibody, diagnostic cut-off value, cut-off

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Sistemik lupus eritematozis (SLE) birçok otoantikor yanıtının görülebildiği otoimmun bir hastalıktır. Günümüzde SLE sınıflandırmasında 2012 yılında kabul edilen SLICC (The Systemic Lupus International Collaborating Clinics, Classification 2012) kriterleri kullanılmaktadır (1, 2). Yeni sınıflandırma kriterleri arasında yer alan immünolojik kriterler anti nüklear antikor (ANA) ve anti-çift iplikli deoksiribonükleik asit (anti-ds DNA) immunglobulin G (IgG) pozitifliğinin belirlenmesidir (1). Anti-ds DNA IgG, SLE şüpheli hastalarda ANA pozitifliğinin saptandığı her durumda istenmektedir. Anti-ds DNA testi hastalığın tanısı ve hastalığın seyrinin takip edilmesi için en sık kullanılan test yöntemidir. Yüksek antikor düzeyi hastalığın aktivitesi ile yakından ilişkilidir (3). Bu yüzden anti-dsDNA antikor sadece hastalığın tanısında değil aynı zamanda hastalığın takibinde de oldukça önem taşır (2).

Günümüzde anti-dsDNA antikor düzeyini belirlemede Farr radioimmunassay, *Crithidia luciliae* immünfloresan test (CLIFT) ve enzim immunassay (EIA) test yöntemleri kullanılmaktadır. CLIFT özgüllüğü yüksek olmasına rağmen duyarlılığı düşük bir yöntem olması nedeniyle daha çok doğrulama testi olarak tercih edilmektedir. Benzer şekilde yüksek affiniteli antikorları saptayabilmesi nedeniyle Farr yönteminin de özgüllüğü yüksektir ancak teknik zorluklar nedeniyle kullanımı kısıtlıdır. Her iki yöntemde EIA ile karşılaştırıldığında duyarlılıklarının daha düşük olduğu genel olarak kabul edilmektedir. EIA temelli testlerin tarama amaçlı olarak kullanılması önerilmektedir (4, 5). EIA gibi daha duyarlı bir test kullanmanın avantaj ve dezavantajları söz konusudur. Hastalığın erken dönemlerinde ortaya çıkabilecek antikor değişikliklerini yakalamak mümkün iken diğer taraftan yalancı pozitif sonuçlar tanısal yaklaşımda sorun oluşturabilir. Anti-dsDNA IgG tespitinde kullanılan ticari kitlerin içerikleri incelendiğinde kullanılan antijenlerin içerikleri açısından farklılıklar olmasına rağmen genel olarak tümünün duyarlılıkları ve özgüllükleri birbirlerine yakın olarak bulunmuştur (6). Buna karşılık cut-off değerleri dikkate alındığında, test kitlerinin farklı cut-off değerleri kullanması nedeniyle testlerin sonuçları arasında belirgin farklılıklar gözlenmektedir (6, 7).

Tanısal testlerin kullanımında ortaya çıkan hatalı kullanımlar ve laboratuvarlar arasında ortaya çıkan uyumsuzluklar otoantikor testlerin standardize edilmesi gerekliliğini ortaya koymuştur. Bu amaçla uluslararası otoimmünite standardizasyon komitesi (The International Union of Immunologic Societies/ WorldHealth Organization/ Arthritis Foundation/ Centers for Disease Control and Prevention (IUIS/ WHO/ AF/ CDC) committee for the standardisation of

autoantibodies in rheumatic and related diseases) ANA, ds DNA ve Ekstrakte Edilebilir Nükleer Antijen Antikorları (ENA) testlerinin standardizasyonu için üç farklı kategoriyi içeren bazı öneriler yayınlamışlardır. Anti-ds DNA test için ortaya koyulan önerilerden birisi de her laboratuvarın Alıcı İşletim Karakteristiği (ROC) analizi ile kendi referans cut-off değerini belirlemesidir (8). Bu araştırma ile SLE tanısı ve tedavi takibinde kullanılan EIA temelli anti-dsDNA test kitinin SLE tanısında kullanılacak optimal cut-off değerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı İmmünoloji Biriminde anti-ds DNA EIA testi 2011 yılından itibaren kullanılmakla birlikte 2013 yılında farklı bir firmanın anti-dsDNA IgG kiti kullanılmaya başlanmıştır. Son kullanılan kitin cut-off değerinin düşük bir değer olması pozitif test sonuçlarının sayısında bir artışa yol açmıştır. Bu araştırmada ROC analizi ile SLE tanı karar eşiğinin belirlenmesi ile klinisyenlerin karar vermelerinde daha etkin rol oynayarak gereksiz test istem ve tedavi kayıplarını önlenmesi sağlanacaktır.

Araştırmanın amacı/hipotezler:

Bu çalışmanın amacı Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı İmmünoloji Biriminde kullanılmakta olan anti-ds DNA IgG EIA testinin SLE tanısında tanısal karar vermede yardımcı olacak optimal cut-off değerinin belirlenmesidir. Araştırmanın katkısı tanı karar düzeyindeki düzenleme ile hasta üzerinde gereksiz tanı ve tedavi uygulamalarının önlenmesi olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sistemik Lupus Eritematozus'un Tarihçesi

Lupus kelimesi "kurt" anlamına gelen Latince bir sözcük olup ilk kez hastalık adı olarak 13. yüzyılda kullanılmıştır. Herbernus'un MS. 916'da bir deri hastalığında ilk kez lupus terimini kullandığı görülmüştür. Biett, lupus hastalığının ilk açık tanımını yapmıştır, daha sonra 1933 yılında öğrencisi olan Cazenava eritema santrifugum adıyla SLE'nin cilt tutulumunu ilk olarak tanımlamıştır. 1946'da Hebra, seborhea congestiva ve malar raş için kelebek benzetmesini kullanmıştır. Kaposi tarafından 1872 yılında lupusun cilt tutulumuna ek olarak kalp ve böbrek tutulumu gibi sistemik tutulumdan da bahsedilmiştir. 1930 yılında Klinge ve daha sonra daha net şekilde 1942 yılında Klemperer lupusun kollajen doku hastalığı olduğunu öne sürmüştür. Hargraves ve arkadaşlarının 1948 yılında lupus hücresini tanımlamasıyla modern dönem başlamıştır. Postmodern dönem olarak nitelendirilen dönemde, 1957 yılında Holman ve Kunkel tarafından, immunofloresan tekniği ile nükleer partiküllere karşı oluşan otoantikorlar tanımlanmıştır. Watson ve Crick'in ds-DNA antikorlarını tanımlaması lupus tanısında bir aşama olarak kabul edilmiştir. İlk kez 1971'de daha sonra 1982'de ve son olarak 1997 yılında Amerikan Romatoloji Derneği herkes tarfından benimsenen LUPUS kriterlerini önermiştir (9).

2.2. SLE Tanımı

SLE birçok organı etkileyebilen, etiyolojisi bilinmeyen, otoantikor üretimi ve immun kompleks yapımı ile karakterize, heterojen klinik ve laboratuvar bulgularına sahip, başlıca deri, eklemler, seröz zarlar ve böbrek tutulumu ile giden, kronik, otoimmun, remisyon ve ataklarla seyreden bir konnektif doku hastalığıdır (9, 10). SLE hastalığında immünolojik bozukluk B hücre hiperaktivitesine yol açmaktadır. Bunun sonucunda otoantikor üretimi ve vital organlarda immunkompleks birikimi meydana gelmektedir (9).

2.3. SLE Sınıflama Kriterleri

SLE tanısı uzman bir romatoloğun kararı ile klinik/laboratuvar tarafından yapılabilmektedir ve henüz erken tanı için hiç bir tanı kriteri yoktur. 1997 American College of Rheumatology (ACR) kriteri ve onun tamamlayıcı kriteri olan 2012 SLICC kriterinin her ikiside SLE'nin sınıflandırılması için dizayn edilmiştir ve tanısal değildir. 2012 SLICC kriteri çok

kompleks/genişletilmiş kriterdir ve ACR SLE sınıflandırılmasını yapamadığı zaman kullanılabilir. Bir hastalığın sınıflandırılması için iki ayrı kriter uygulanması doğal bir yol değildir. Bu nedenle yalnızca sanıflandırılmasında değil aynı zamanda erken tanı için kullanılan tek bir kritere ihtiyaç duyulmuştur. SLE tanısı için revize edilmiş 2015 ACR/SLICC kriterleri Tablo 1'de sunulmaktadır (11).

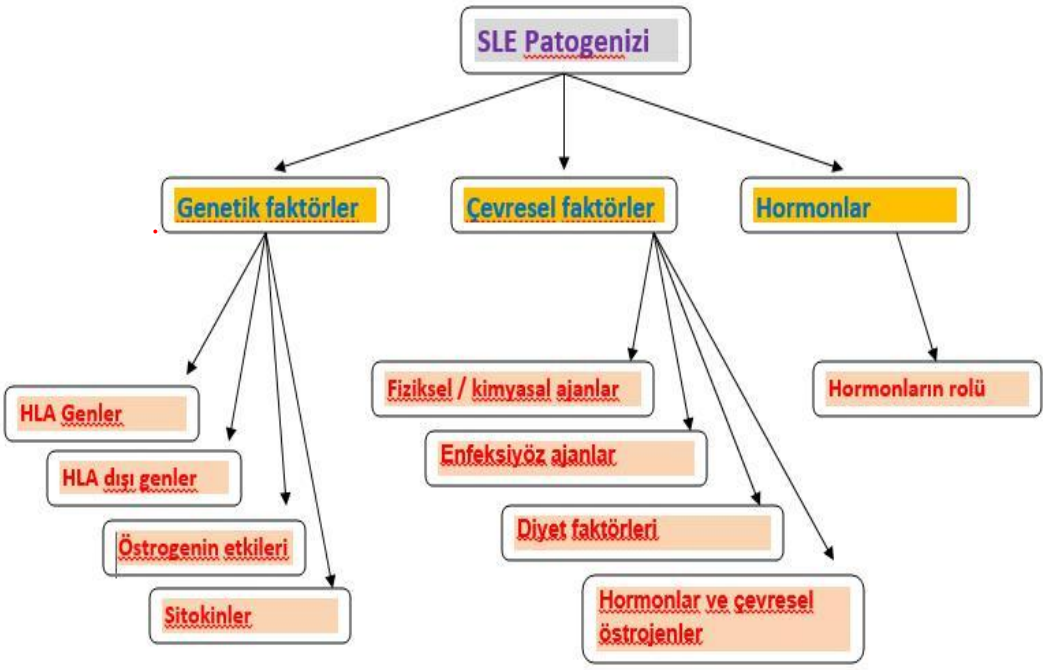
Tablo 1. SLE tanısı için kriterler [a,b,c]

Akut / subakut kutanöz lupus raş	2 puana kadar
• Malar Raş	2.puan
• Subakut kutanöz Lupus eritematozus (SCLE) raş	1.puan
• Palpabl purpura veya ürtikeryal vaskülit	1.puan
• Fotosensitivite	1.puan
Diskoid lupus eritematozus (DLE) raş veya Hipertrofik Lupus raş	1.puan
Skar yapmayan frank tipi kellik[d]	1.puan
Oral/nazal ülserler	1.puan
Eklem hastalıkları	1.puan
Plörit ve/veya perikardit	1.puan
Psikoz ve/veya nöbet ve/veya akut karışıklık	1.puan
Böbrek tutulumu	2 puana kadar
• Proteinüri ≥ 3+ veya ≥ 500 mg/gün veya idrar dökümleri	1.puan
• SLE ile uyumlu biyopsi ile kanıtlanmış nefrit	2.puan
Hematolojik	3 puana kadar
• ≥2 kez WBC sayısı (<4000/mm^3) veya lenfosit sayısı <1500/mm^3 veya 1 kez WBC sayısı (<4000/mm^3) ile lenfosit sayısı <1500/mm^3)	1.puan
• Trombositopeni <100,000/mm^3	1.puan
• Hemolitik Anemi	1.puan
Serolojik testler	3 puana kadar
• Düşük titre pozitif ANA	1.puan
• Homojen veya rim patern ile yüksek titreli ANA	2.puan
• Pozitif anti-ds DNA	2.puan
• Pozitif anti-Sm	2.puan
• Anti-fosfolipid antikorlar (aPL'ler)	1.puan
• Düşük serum komplemanı (C_3 ve/veya C_4 ve/veya CH_{50})	1.puan

[a]Her bir kriter için: hastanın klinik ve ilaç öyküsünü veya fizik muayenesine göre kriterlerin varlığına neden olabilecek başka belirgin bir hastalık yok. [b]Malar raş, diskoit raş, fotosensitivite, oral ülserler, psikoz, nöbet ve idrar dökümleri ile ilgili tanımlar, SLE için ACR ile aynıdır ve nazal ülserler plörezi /perikardit ve eklem hastalıkları ve akut karışıklık ile ilgili tanımları, SLE için SLICC kriteri ile aynıdır. Yüksek titre serolojik testler, normal sınırların 3 katından daha fazla olduğu anlamına gelir. [c]16 üzerinden **4** puan alan hastaların kesin SLE tanısı vardır. **3** puanla büyük ihtimallı SLE, **2** puanla olası SLE ve **1** puan alan hastaların çok az ihtimalle SLE tanısıdır. [d]Pozitif çekme testi ya da görünür kelliği olan görünür kırık tüyler ile yaygın incelme veya saç dökülmesi hastaya doktor danışma talebinde bulunması için ikna edicidir. Bunun yanısıra ilgili deride herhangi bir yara izi bulunmamalıdır.

2.4. Etyopatogenez

SLE, genetik yatkınlığı olan bireylerde hormonal ve çevresel faktörlerin etkisiyle ortaya çıkan, aktivasyon ve remisyon dönemleriyle seyreden kronik otoimmün bir hastalıktır (Şekil 1).



Şekil 1. SLE genetik, hormonal ve çevresel faktörleri içeren multifaktöriyel bir etiyoloji gösterir.

SLE'de temel patolojinin otoantikorlar, immun kompleksler ve T lenfositler tarafından oluşturulan doku hasarı olduğu düşünülmektedir. SLE insidansı ve prevelansı populasyona göre her 100.000 kişide sırasıyla 1.4-21.9'a, 7.4-159.4'e kadar değişkenlik gösterir (12). SLE'de kalıtım oranı yaklaşık %66 olup; uyumluluk oranı monozigotik ikizlerde %24-56, dizigotik ikizlerde %2-4 olarak belirlenmiştir. En önemli genetik özelliği; monozigotik ikizlerde hastalığın birlikte görülme sıklığının, dizigotik ikizlere göre daha yüksek olmasıdır. Bunun yanısıra kardeşler arasındaki sıklıkta söz konusudur. Olguların %12'sinde aile bireyleri arasında bir veya birkaç bireyde hastalık söz konusudur. SLE'li hastalarda yapılan genetik çalışmalar, bu

hastalığın kalıtımsal bir hastalık olduğunu ve en az 3-4 genin kalıtımda rol oynadığını göstermiştir (13). SLE'den sorumlu genlerin hepsi bilinmemektedir ancak bilinen genler olarak; HLA-DR2, -DR3 ve bu genlerin sık olarak birlikte bulunduğu alleller (DR2 icin HLA-A3-B7, DR3 icin HLA-A1-B8-DQw2.01) sayılabilir tablo 2 (13, 14, 15).

Tablo 2. Sistemik Lupus Eritematoz patogenezinde rol oynayan gen bölgeleri

HLA genleri	DR2, DR3 (göreceli riskte 2 5 kat artış)
	DR2, DR3 , DR7, DQw1, DQw2, DQA1, DQB1, B8 (Anti Ro)
	DR3, DR-8, DRw12 (Anti La)
	DR3, DQw2, DQA1, DQB1, B8 (Anti Ro ve Anti La)
	DR2, DR3, DR 7, DQB1 (Anti-DNA)
	DR2, DR4, DQw5, DQw8, DQA1,DQB1 (anti-U1 ribonükler protein)
	DR2, DR4, DR7, DQw6, B61 (antiSm)
	DR4, DR7, DQ6, DQ7, DQw7, DQw8, DQw9 (anticardiolipin ve lupus antikogulant)
	Kompleman genleri (C2, C4, C1q)
HLA dışı genler	Mannoz bağlayıcı lektin polimorfizmleri
	Tümör nekroz faktörü alfa
	T hücre reseptörü
	İnterlökin 6
	CR1
	İmmünoglobülin Gm ve Km

	FcgRIIA (IgG Fc reseptörü)
	FcgRIIIA (IgG Fc reseptörü)
	PARP (Poli-ADP riboz polimerazı)
	Isı şoku proteini 70
	Humhr 3005

SLE patogenezi X kromozomunda bulunan CD40 geni ile ilişkilendirilmiş, bazı patogenetik mekanizmaların self tolerans kaybı ve organ disfonksiyonuna neden olduğu belirlenmiştir (16). Patogenez çalışmalarında sıklıkla en çok etkilenen organlar olan böbrek ve deri'dir. Her iki organ tutulumunda da inflamasyon, antiken-antikor komplekslerinin ve komplemanların birikimi ön plandadır ve doku hasarının oluşumunda temel faktör immün komplekslerdir. Antijen-antikor komplekslerinin oluşumundan sorumlu otoantikorların kaynağı tam olarak bilinmese de ortaya çıkmalarında rol oynayan mekanizmalardan bir tanesi mikrobiyal enfeksiyonları takiben Toll benzeri reseptör aracılı sinyal yolaklarının aktivasyonuna bağlı inlamatuvar yanıtın tetiklenmesidir. İnflamasyonu takiben efektör ve regülatör T hücreler active olurken self-reaktif B hücreler T hücrelerince uyarılmakta böylece ö z denetimden kaçmış B lenfositlerce otoantikorların ortama salınımı geçekleşmektedir. Bu antikorlar başlıca anti-dsDNA, anti-nükleozom ve anti-α-aktinin tibi antikorlardır. Otoantikorlar dolaşımdaki serbest antijenlere bağlanıp immune kompleksler oluşturmakta glomerül ve damar duvarında birikerek patolojik hasara yol açmaktadır. Glomerüler immune kompleks birikimi SLE'de renal tutulumun en erken bulgusu olarak kabul edilir. Başlangıçta biriken küçük ve orta boylu immun kompleksler yerleştikleri mezenkimal alandan h ı zlıca temizlenirler ve burada ancak minimal glemürüler hasara neden olurken daha sonra immune komplekslerin birikiminin devam etmesi sonucu ortaya ç ı kan büyük çaplı kompleksler endotel altında birikerek hücresel ve humoral effektör hücreleri uyararılar. Ortama salınan sitotoksinler ve inflamatuvar yanıtı bir taraftan doku hasarına yol açarken diğer taraftan Fc uyarımlı kompleman aktivasyonu doku hasarınınn artmasına neden olur. Diğer bir mekanizmada apoptoza giden hücreler ortama kromatin fragmanları saçarlar bu fragmanlar nükleozom dsDNA komplekseleri şeklindedir. Kromatin fragmanların ekstrasellüler ortama salınmasını sağlayan olası mekanizmalardan birisi CD8 T hücrelerinin aktivasyonuna bağlı apopitozu uyarması gösterilmektedir. Diğer yandan apoptotik fragmanların ortamdan yeterli derecede temizlenemiyor olması da bunda etkili olmaktadır. (17) SLE apoptotik klirensin yetersizliği ve apoptotik debrisin patojenik etkisi ile ilişkilidir. Erken

apoptotik hücreler, onları yutmak için immün hücreleri harekete geçiren fosfatidilserin gibi hücre-yüzey proteinlerinin "beni-ye" sinyallerini eksprese ederler. Apoptotik hücreler aynı zamanda makrofaj ve dendritik hücreleri kendine çekmek için "beni-bul" sinyallerini de eksprese ederler. Apoptotik materyal fagositler tarafından doğru olarak uzaklaştırılmadığında, antinükleer antikorların gelişmesine neden olan antijen-sunucu hücreler tarafından yakalanırlar (18).

SLE'li insanlar, olgunlaşmamış B hücrelere doğru bir populasyon kayması ile aşırı poliklonal B-hücre aktivasyonuna sahiptir. Artmış CD27+/IgD- bellek B hücreleri immünsupresyona daha az duyarlıdır. CD27-/IgD- bellek B hücreleri artmış hastalık aktivitesi ve renal lupus ile ilişkilidir. B hücre yanıtlarını regüle eden ve hedef dokuların içerisine sızan T hücrelerin; sinyal, adezyon, ko-stimülasyon, gen transkripsiyonu ve alternatif uç birleşmesinde defektleri vardır. Sitokinler B-lenfosit stimülatörü (BLys), IL-6, IL-17, IL-18, tip I interferonlar ve tümor nekroz factor α (TNFα) inflamatuvar sürece neden olur ve bunlar potansiyel terapötik hedeflerdir (Şekil 1) (18-20).

2.5. Lupus Oluşumunda Hormonların Rolü

SLE özellikle doğurganlık yaşındaki kadınlarda daha sık olmak üzere görülme sıklığı kadınlarda erkeklere göre dokuz kat daha fazla görülür. Puberte öncesi ve mebapoz sonrası dönemdeki kadınlarda SLE görülmesi daha nadir bir durum olması hormonal mekanizmaların rol oynadığını düşündürmektedir. Östrojenin 16 α hidroksilasyonuna bağlı olarak 16 α hidroksiöstron konsantrasyonunun aşırı artması ile sonuçlanan östrojen metabolizmasındaki bozukluklar SLE gelişmesinde etkili olduğunu düşündürmektedir (21). Östrojenin bu 16 α metabolitleri östrojenin kadınlık özelliklerini kazandıran kısmıdır. SLE'li kadınlarda artmış östrojen aktivitesinin yanısıra testerone, dehidroepiandrosterone (DHEA) gibi androjenik hormonların serum düzeylerinde düşüklük olduğu saptanmıştır. Benzer şekilde östrojen düzeyi yüksek androjen düzeyi düşük olan erkeklerde de SLE gelişimi daha sık olarak gözlenmektedir. Aşırı östrojen ve düşük androjenik aktivite her iki cinsde de bağışık yanıtı değiştirerek SLE gelişiminde rol oynadığı düşümülmektedir (22). Tablo 3 östrojenin farklı tip immune hücreler üzerindeki etkilerini göstermektedir.

Tablo 3. Östrojenin bağışık yanıt üzerindeki etkileri

ÖSTROJENİN LUPUSDA BAĞIŞIKLIK ÜZERİNE ETKİLERİ		
Hücre Tipi	Etki	Doz
B lenfosit	B hücre farklılaşması ve Ig üretiminde artış	Fizyolojik
	TNF-alfa ve PBMC apopitozunda azalma	Fizyolojik
T lenfosit	Azalmış IL-2R sunumu ve IL-2 üretimi	Yüksek
	Antijen yanıtıile oluşan çoğalmada azalma	Yüksek
	Artmış Calcineurin mRNA	Doz bağımlı
	Artmış CD40L sunumu	Fizyolojik
Monosit	Artmış IL-10 üretimi	Fizyolojik
	Artmış cNOS salınımı	Fizyolojik
Diğer	Endotel hücrelerindeki adezyon moleküllerinin sunumunda artış	Yüksek

Östrojen humoral bağışık yanıtı uyararak B hücre çoğalmasını ve antikor üretimininin de artmasını uyarmaktadır. Diğer taraftan Th1 yanıtını inhibe edilmesi ve T hücrelerinden IL-2 üretimini baskılanması Th2 yanıtının üzerinden sitokin üretimininin ve otoantikor üreten B hücresi çoğalmasını uyarmakta böylece SLE gelişimini sağladığı düşünülmektedir (23).

2.6. Çevresel Faktörler

Genetik ve hormonal faktörler SLE gelişiminde etkili olsalarda hastalığın birçok çevresel ve dış kaynaklarda hastalığın başlamasında tetikleyici rol oynamaktadır (Tablo 4). İnfeksiyöz ajanlar moleküler benzeşimleri (mimicry) ile bağışık kontrol sistemini bozarak otoimmun yanıtı başlatabilirler, diyet inflamatuar mediyatörlerin oluşmasına katkı sağlayabilir, toksinler veya bazı tip ilaçlar hücresel yanıtı etkileyerek otoimmun yanıtı tetikleyebilir. Uv gibifiziksel ajanlar inflamasyonu uyarabilir, bunun gibi birçok dış etken inflamasyonu başlatma, apoptozun tetiklenmesi ve doku harabiyetine yol açmaları gibi birçok nedenle SLE sürecinin başlamasını sağlayabilir.

Tablo 4. SLE Patogenizinde ilişkili olan çevresel faktörler

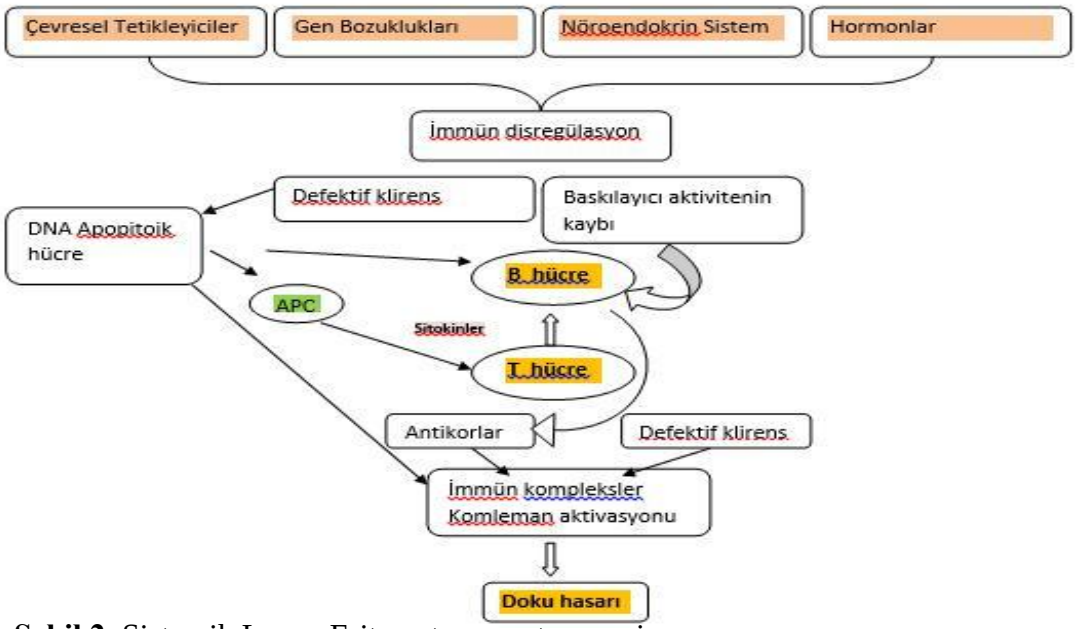
Fiziksel / kimyasal ajanlar
- Aromatik aminler
- Hidrazinler
- İlaçlar (prokainamid, hidralazin, klorpromazin, izoniazid, fenitoin, penisilamin)
- Tütün dumanı
- Saç boyaları
- Ultraviyole ışık

Diyet faktörleri
- L-kanavin
- Doymuş yağların yüksek alımı

Enfeksiyöz ajanlar
- Bakteriyel DNA / endotoksinler
- Retrovirüsler

Hormonlar ve çevresel östrojenler
- Hormonal replasman tedavisi, oral kontraseptif haplar
- Doğum öncesi östrojenlere maruziyet

Genetik yatkınlık, cinsiyet, hormonal değişimler, apoptotik hücrelerin, immun komplekslerin temizlenememesi gibi bağışık yanıtın regülasyonundaki bozukluklar, SLE'nin gelişiminde önemli rol oynar. SLE patogenezi Şekil 2'de özetlenmiştir.



Şekil 2. Sistemik Lupus Eritematozus patogenezi

Bağışık tolerans mekanizmasının bozulması, artmış antijenik uyarım, T hücre yanıtının artması, B hücre sürsesyonunda bozukluk, Th1 yanıtından Th2 yanıtına kaymaya bağlı sitokin yanıtlarındaki dengesizlik, B hücre aktivasyonu ve patojenik otoantikorların ortaya çıkması SLE gelişiminde rol oynayan temel faktörlerdir. Çevresel bazı faktörler bu tablonun oluşumunda hazırlayıcı rol oynamaktadırlar.

2.7. Laboratuvar Testleri

ANA testleri ve anti-ENA SLE için serolojik testlerin temelini oluşturur. Birçok teknik ANA'ların saptanması için kullanılır. Klinik olarak çok yaygın kullanılan metod indirekt immünfloresan (IF)'dir. Floresan patern insanların serumunda bulunan antikor tipini belirtmektedir. Direkt immünfloresan insanların derisinde immünoglobulinler ve kompleman proteinlerin birikimini saptayabilir. Güneşe maruz kalmayan deri test edildiğinde, pozitif bir direkt IF (Lupus band testi olarak adlandırılır) SLE'nin bir kanıtıdır (24).

ANA tarama bir çok konnektif doku hastalıklarında ve diğer otoimmün hastalıklarda pozitif sonuç verebilir ve normal sağlıklı bireylerde de oluşabilir. Antinükleer antikorların alt tipleri (ENA profil) anti-Smith ve anti-dsDNA antikorları (SLE ile bağlantılı) ve anti-histon antikorları (ilaç ile indüklenmiş lupus ile bağlantılı) SLE ile ilişkili antikorlardır. Anti-dsDNA antikorları SLE için yüksek derecede spesifiktir; SLE'si olmayan insanların yalnızca %0.5'inde görülürken, SLE vakalarının %70'inde bulunmaktadır. Bütün vakalarda olmamasına rağmen, anti-dsDNA antikor titreleri aynı zamanda hastalık aktivitesini yansıtma eğilimindedir (25). SLE'li insanlarda bulunabilen diğer ANA anti-U1 RNP (sistemik skleroz ve karışık konnektif doku hastalığında da görülebilir), SS-A (ya da anti-Ro) ve SS-B (ya da anti-La; Sjögren's sendromunda oldukça yaygın olanlardan ikisi)'dir. SS-A ve SS-B neonatal lupus'ta kalp iletim bloğu için spesifik bir risk görülmektedir (26).

2.8. Antinükleer Antikorlar (ANA)

Nükleer antijenlere karşı otoantikorların heterojen bir grubu olan ANA, SLE veya diğer konnektif doku hastalıkları olan hastalarda bir tarama aracı olarak sıklıkla test edilir (27-29). Çeşitli otoimmün romatik hastalıklarda pozitif ANA testlerinin prevalansı oldukça değişir, SLE'de %90-100, sistemik sklerozda (SSc) %60-80, Sjöngren sendromunda %40-70, polimiyosit/dermatomiyositte %30-80 ve romatoid artritte (RA) %30-50'dir ve otoantikorların

prevalansı farklı ırklar arasında değişiklik göstermektedir (28, 30). Otoimmün romatik hastalıkların özellikle SLE'nin taranması için ANA testlerinin yüksek duyarlılığına rağmen, bu antikorlar aynı zamanda genel populasyonda, yaşlı bireylerde, malignensiler, enfeksiyonlar, tiroid hastalığı vb. olanlarda da bulunabildiğinden özgüllüğü düşüktür (28, 31, 32). ANA'nın yorumlanması titre ve patern ile beraber olmalıdır. ≥1:160 titre ANA genellikle anlamlı olarak kabul edilir. (28, 29, 33). Konnektif doku hastalığı olan hastalarda benekli patern (ince ve iri benekli) çok s ı k görülmesine rağmen, yalnızca ince benekli patern sağlıklı bireylerde de bulunmaktadır (34). Anti-dsDNA antikorları ANA ile saptanan antikorların bir k ı smıdır ve SLE'de sıklıkla test edilirler. SLE'ye çok spesifiktir (%97), fakat duyarlılığı çok düşüktür (%60) (21). ANA ve anti-dsSNA, SLE sınıflandırılması için on bir kriterden ikisidir. (2).

2.9. Anti-DNA Antikorları

DNA antikorları başlıca iki gruba ayrılabilir: denatüre olarak reaktif olan tek-iplikli (ss)DNA ve doğal olarak tanınan dsDNA (35). DNA otoantikorları ilk olarak 1950'ler de tanımlanmıştır. Onların hücre nükleuslarına bağlanması HEp-2 hücre hattı substratı kullanılarak gösterilmiştir (36). Anti-dsDNA ve anti-ssDNA antikorları arasındaki bazı farklılıklar Tablo 5'de gösterilmiştir (37).

Tablo 5. SLE'de anti-DNA otoantikorlarının karşılaştırılması

dsDNA	**ssDNA**
TEST ÖZGÜLLÜĞÜ: • SLE için oldukça spesifik • SLE'nin geleneksel belirteçlerini göz önünde bulundur TEST DUYARLILIĞI: • %60	TEST ÖZGÜLLÜĞÜ: • Spesifik değil • Nadiren belirtilir TEST DUYARLILIĞI: • %30–70

2.9.1. Anti-ssDNA Antikorları

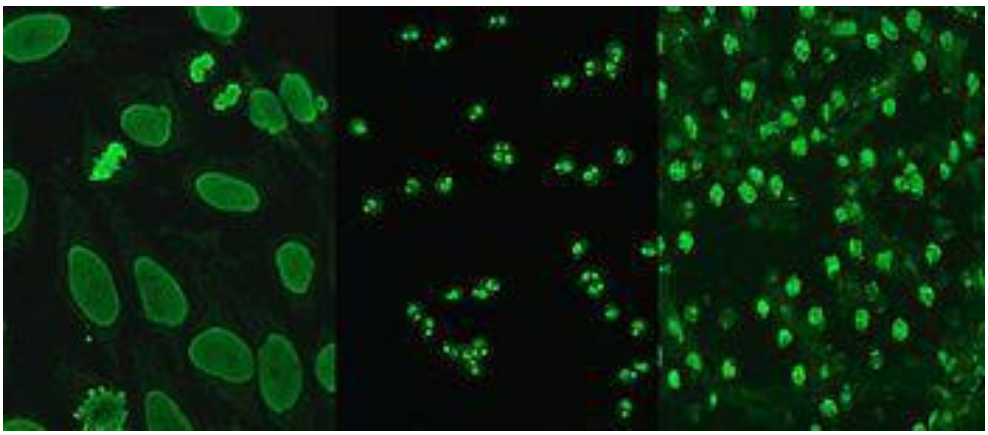
Anti-ssDNA antikorları genellikle SLE tanısında ve yönetiminde kullanışlı değildir. ssDNA antikorları, ilk olarak dsDNA'nın beta heliksi içerisine gömülmüş pürin ve pirimidin bazları ile tepkimeye girer (36).

2.9.2. Anti-dsDNA Antikorları

Anti-dsDNA antikorları yüksek özgüllüğe sahip olması ve bazı hastalarda hastalık aktivitesi ile ilişkili olması nedeniyle SLE'li hastaların değerlendirilmesi ve yönetiminde kullanışlıdır.

Anti-dsDNA antikorları SLE için spesifiktir, bu antikorların varlığı diğer sistemik otoimmün hastalığı olan hastalardan SLE'li hastaların ayırt edilmesi için çok kullanışlıdır (3). Anti-dsDNA antikorları romatoid artrit, Sjöngren's sendromu, skleroderma, Raynaud fenomeni, karışık konnektif doku hastalığı (MCTD), discoid lupus, miyosit, üveyit, juvenil artrit, antifosfolipid sendrom, Grave's hastalığı, Alzheimer hastalığı ve otoimmün hepatiti kapsayan diğer hastalıkları olan hastalarda nadiren bulunmaktadır (3, 38).

Anti-dsDNA antikorları anti-nükleer antikorların bir grubudur ve onların hedef antijeni çift iplikli DNA'dır. Enzim bağlantılı immünosorbent testi (ELISA) ve immünofloresan, tanı labaratuvarlarında anti-dsDNA saptanması için rutin olarak uygulanmaktadır (Şekil 3). SLE için yüksek oranda tanısaldır ve lupus nefritin patogenezinden sorumlu tutulmaktadırlar (28, 39).



Şekil 3. Anti-dsDNA antikorlarının immunofloresan boyanma paterni [Hep-20-10 hücrelerinde (sol), *Crithidia luciliae* (merkez) ve sıçan karaciğerinde (sağ)]

Hem SLE tanısında hem de hastalık aktivitesinin değerlendirilmesinde anti-dsDNA antikorlarının duyarlılık ve özgüllüğü üç parametre ile yakından bağlıdır:

1) Teknikler anti-dsDNA antikorlarının varlığını ve düzeyini değerlendirmek için kullanılır.
2) Kontrol grubu kullanılır (ya sağlıklı denekler ya da diğer otoimmün romatik hastalığı olan hastalar).
3) Cut off değeri bir pozitif ya da bir negatif sonuç vermek için seçilir.

Anti-dsDNA antikorlarının varlığının saptanması için altın standard genellikle Farr testi, radyo immün testi, CLIFT, EIA testleridir (40).

2.9.2.1. Antikor Üretimi

dsDNA antikorlarının oluşumunun tam mekanizması halen bilinmemesine rağmen, ekstrasellüler DNA'nın dsDNA'ya karşı bir immün yanıtın nedeni olması muhtemeldir. Ölü ya da ölmekte olan hücrelerin bu ekstrasellüler DNA'nın büyük bir kaynağı olduğu fikrini destekleyen birçok kanıt vardır (41). Apoptoz, hücrenin nüklear DNA'sı parçalandığı ve fagositoz için sinyalin oluştuğu programlanmış hücre ölümünün yüksek oranda organize edilmiş sürecidir. SLE'li ve diğer otoimmün hastalıklı insanlarda bu sürecin hücre ölümünde bir artış ve/veya ölü hücre klirensi oranında bir düşüşe yol açarak defektli olduğu düşünülmektedir. SLE'li hastalarda apoptoz yüksek oranda bulunmaktadır; genlerde ve proteinlerdeki çeşitli değişiklikler apoptozdaki defektleri içermektedir. Bunlar çözünür Fas ve bcl-2 düzeylerinde artışı ve programlanmış hücre ölümü 1 ve "run-related" transkripsiyon factor X1'de polimorfizmi içermektedir (42).

Bağışıklık sisteminin büyük çeşitliliği, karşılaştığı herhangi bir maddenin hemen hemen hepsinin reseptör-aracılı tanınmasına olanak sağlar (43). Bu çeşitlilik invaziv organizmalarda konağın korunması için önemlidir, fakat aynı zamanda kendinden olanı ayırt edebilmesi ve kendi dokusuna bir yanıt başlatmaması gerekmektedir: bu mekanizma tolerans olarak bilinir. Adaptif immune sistemin B ve T hücreleri, self-reaktif hücrelerin perifere salınmadığından emin olmak için gelişim esnasında reseptör ekleme ya da delesyona tabi tutulmaktadır. Bu mekanizmalara rağmen, bazı otoreaktif hücreler tolerans mekanizmasında kaçar ve döngüye girer. Sağlıklı bireylerde otoreaktif B hücreleri varlığı, enfeksiyondan sonra anti-dsDNA özgüllüğünü içeren otoantikorların geçici görünümü ile gösterilmiştir (44). Önemli bir biçimde, aktif hastalıksız anti-

dsDNA titreleri yükselmiş lupuslu hastaları ve bazı anti-dsDNA otoantikorlarının pasif transferinden sonra hastalık gelişmeyen farelerde kanıtlandığı gibi tüm anti-dsDNA antikorlarının hepsi patojenik değildir (45). Anti-dsDNA otoantikorlarının patojenik potansiyelini etkileyen bir faktör antikor izotipidir: insanda aktif hastalık IgG ile ilişkilidir ve IgM ya da IgA ile ilişkili değildir (46) ve fare modellerinde daha etkili kompleman ve Fc reseptör aktivasyonu nedeniyle IgG2a alt sınıfı IgG1'den daha patojeniktir (47).

2.9.2.2. Anti-dsDNA Ölçümü

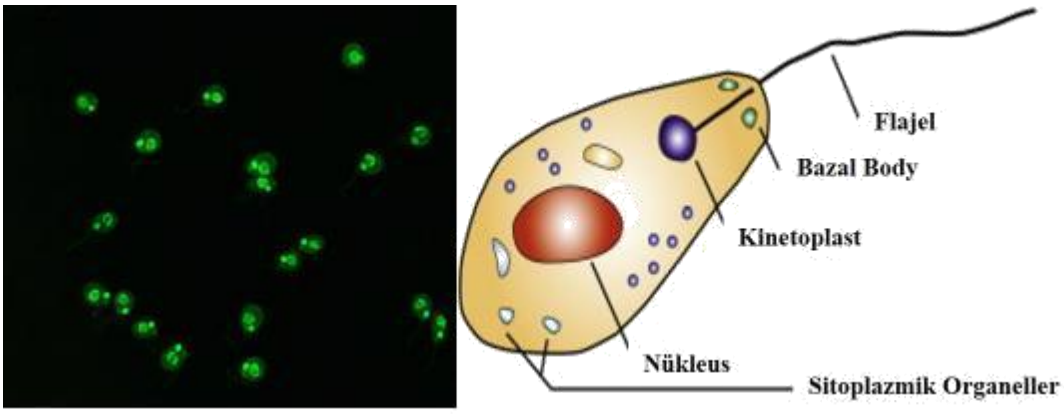
Anti-dsDNA antikorlarını saptamak ve miktarını ölçmek için kullanılan dört temel metod vardır.

i. Farr Testi

Farr testi, %50 doymuş bir amonyum sülfat solüsyonu içinde radyoaktif olarak işaretlenmiş DNA-anti-DNA antikor komplekslerinin çökeltilmesine dayanmaktadır. Bu test primer olarak dsDNA'ya yüksek afiniteli antikorları saptar (48). Tüm SLE hastalarının yaklaşık %50-80'inde bu metotla ölçülen anti-dsDNA antikorlarının düzeyleri yükselmiştir; antikor düzeylerinin hastalık aktivitesi özellikle aktif proliferatif nefrit ile yakından korele olduğu gözlenmektedir (36, 48). Hedef antijen olarak radyoaktif bir DNA kullanımını gerektirmesi ve çalışılmasının deneyim gerektirmesi nedeniyle Farr testi artık anti-dsDNA antikorlarının saptanması için yaygın kullanılmamaktadır.

ii. Crithidia luciliae testi

Crithidia luciliae (*C. luciliae*) flagellalı (kamçılı) tek hücreli bir protozoan'dır (49). Trypanosomatidae ailesi kapsamında, dairesel çift iplikli DNA molekülleri ile birbirine bağlanan kompleks bir ağ olan bir kinetoplast varlığı ile karakterizedir. Bu kinotoplastın varlığı SLE tanısında önemli bir belirteçdir. İmmunofloresan için bir substrat olarak *C. luciliae* kullanılarak, bu organel hastalığın yaygın bir özelliği anti-dsDNA antikorlarının saptanmasında kullanılabilir (50, 51). *C. luciliae* substratında anti-dsDNA antikorlarının immunofloresan boyama paterni Şekil 4'te gösterilmektedir (28).



Şekil 4. *C. luciliae* substratında anti-dsDNA antikorlarının immunofloresans boyama paterni. Sistemik lupus eritematozuslu bir bireyde anti-dsDNA antikorlarının varlığının gösterilmesinde flajelin yakınında yerleşen kinetoplast boyanır.

Crithidia luciliae testi, bir indirekt immun floresan (IIF) testidir ve bu tek hücreli hemoflajellatın bazal vücudunun bir kinetoplast veya dev bir mitakondri içerdiği gerçeği avantaj sağlamaktadır. Mitokondri yalnızca dsDNA içeren küçük bir dairesel DNA içerir (52). HEp-2 hücreleri kullanarak ANA için indirekt immun floresan testinde olduğu gibi, anti-dsDNA antikorlarının semikantitatif bir ölçümü hemoflagellat substratta serumların seri dilüsyonlarının test edilmesi ile saptanmaktadır (53, 54). Kinetoplastın boyandığı en yüksek serum titresi, hasta serumunda anti-dsDNA antikorlarının titresi olarak kabul edilir. *Crithidia luciliae* testi Farr testi ile benzer duyarlılıktadır.

iii. ELISA

ELISA anti-dsDNA antikorlarını saptamak için kullanılan üçüncü bir metottur (55, 56). Bu metotta, mikrotitre plaklarının kuyucukları anti-dsDNA antikorlarını saptamak için substrat olarak kullanılan dsDNA ile kaplıdır. İnsan antikorları, insan immünoglobulinlere karşı direkt olarak bir enzim-konjuge sekonder antiserum kullanarak saptanmaktadır. Enzim, anti-dsDNA antikorlarının miktarını ölçmek için kullanılabilen kimyasal bir reaksiyonu katalizler. dsDNA ELISA testi SLE'li hastaların yaklaşık %70-80'inde pozitiftir. IgG antikor düzeyleri aktif nefrit ile kısmen iyi ilişkilendirilmektedir, ve genelde hastalık aktivitesi ile iyi bir korelasyon vardır. SLE'nin tanısı için ELISA tarafından pozitif bir testin özgüllüğü yaklaşık %70'dir (57).

iv. Floresan boncuklar

Anti-dsDNA antikorlarını saptamak için dördüncü metod, floresan mikroküreleri bağlanmış dsDNA kullanımını içermektedir. Mikroküreler hasta serumu ile ve sonrasında insan immünoglobulinine karşı fikoeritrin-konjuge sekonder antiserum ile enkübe edilmektedir. Flow sitometri mikroküreleri bağlanan floresan düzeyini saptamak ve ölçmek için kullanılmaktadır ve floresan düzeyi serumdaki konsantrasyonla ilişkilidir (58).

SLE tanısı için her bir dsDNA antikor saptama metodunun duyarlılık ve özgüllüğü DNA substratının kalitesine bağlıdır. Test eğer dsDNA kısmen denatüre olduysa dsDNA'nın yanı sıra direkt olarak ssDNA'ya karşı antikorları saptayabilir. Sonuçlanan test SLE tanısı için artmış duyarlılığa fakat azalmış özgüllüğe sahip olabilir (57).

Bazen, bir hasta beklenmedik şekilde anti-dsDNA antikorları testi pozitif ancak ANA testi negatif bulunabilmektedir. HEp-2 hücreleri bol miktarda dsDNA içerir ve anti-dsDNA antikorları için pozitif bir test aynı zamanda ANA pozitif olmalıdır. ANA sonucunda homojen patern veya benekli patern görülmesi durumunda anti dsDNA antikorlarının saptanması için daha duyarlı olabilen Farr, CLIFT, ELISA ya da floresan boncuk testi gibi anti dsDNA testi kullanılması gerekir. IIF tarafından ANA için negatif bir test ortamında, bu testlerden biri tarafından saptanan anti-dsDNA antikorlarının klinik önemi belirsizdir. ANAs için IIF testi negatif olmasına rağmen, Crithidia luciliae testi kullanılarak anti-dsDNA antikorları saptandığı zaman, yalancı-pozitif bir anti-dsDNA'dan şüphelenilebilir. Düşük-dansiteli lipoprotein kompleksleri ve IgG flagellat bazal vücuda spesifik olmadan bağlanabildiği için bu olay meydana gelebilir (59). Eğer serum hastadan bir gecelik açlıktan sonra alındıysa, Crithidia substratı kullanılarak bu yalancı-pozitif test sonucu kaybolabilir.

Amerikan Romatoloji Derneği katı-fazlı testlerin ANA'ları saptamak için başlangıç testi olarak kullanılmamasını önerdiğine dikkat edilmelidir. Çünkü anti-dsDNA antikor testleri farklı duyarlılıklara ve özgüllüklere sahiptir ve yanlış pozitif sonuç olasılığından dolayı, anti-dsDNA antikorlarının saptanması için klinik laboratuvar tarafından hangi metodun kullanıldığının bilinmesi klinisyen için önemlidir.

2.9.2.3. Titre, Patojenite ve Hastalık Aktivitesi

Anti-dsDNA antikorları SLE'ye spesifiktir ve bu nedenle SLE'nin tanısında kullanılmaktadır. Anti-dsDNA antikorlarının yüksek titreleri daha çok SLE'yi düşündürür ve

düşük titreleri hastalığı olmayan insanlarda da bulunabilir. Yüksek özgüllüğe karşın, SLE'de anti-dsDNA duyarlılığı %25-85 oranında gözlenmektedir. Bu nedenle, anti-dsDNA antikorlarının varlığı SLE'yi düşündürür, ancak antikorların yokluğu hastalığı dışlamaz (28).

Dolaşan anti-dsDNA antikorlarının düzeyleri SLE hastalık aktivitesi ile değişmektedir. Antikorların titresindeki artışlar hastalık aktivitesindeki artış ile aynı zamanda ya da hatta ondan önce başlayabilir. Bu nedenle, titreler hastalığın ilerlemesini değerlendirmek için klinisyen tarafından seri bir şekilde gözlenmektedir. Titreler daha aktif lupus olgularında daha sık 1-3 ay aralığında, az aktif lupus olgularında ise 6-12 ay gözlemlenmelidir (28).

dsDNA'yı içeren seçilmiş ANA'lar SLE tanısı için oldukça spesifiktir. SLE hastalığının tanısı için anti-dsDNA antikorlarının duyarlılığı oldukça düşüktür, fakat SLE için anti-dsDNA antikorlarının özgüllüğü onlara bu hastalığın tanısında yardımcı olmak için değerli araçlar yapar (36).

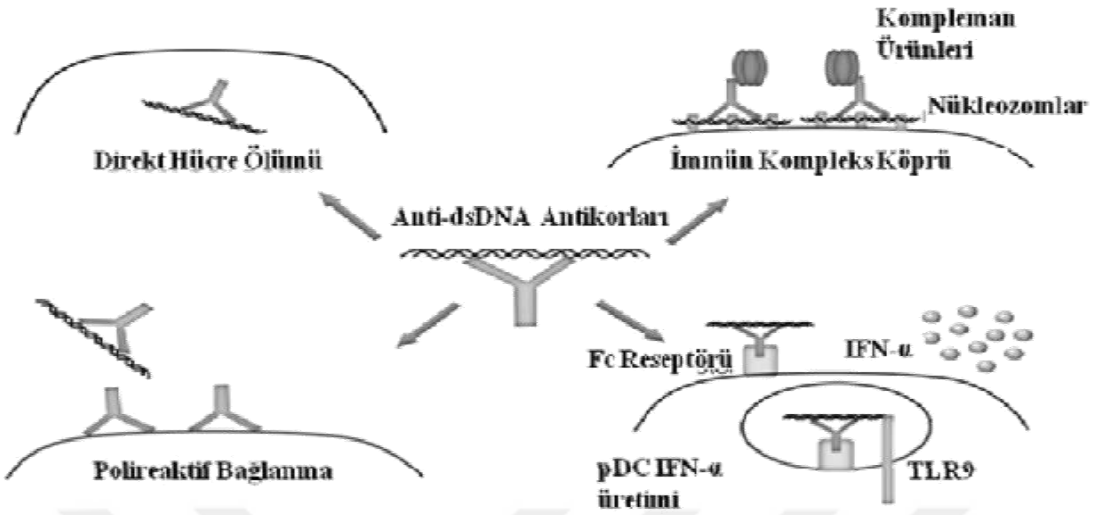
Diğerlerinde olmamasına rağmen, anti-dsDNA'lı bazı hastaların neden SLE geçirmiş olduğu açık değildir. SLE glomerulonefrit durumunda, antijen için avidite, izoelektrik noktası izotip, komplemanı fikse etme yeteneği ve idiotipi içeren anti-dsDNA antikorlarının özelliklerinin bir dizisi onların patogenezini etkileyebilir. Böbrek içinde immune kompleks birikiminin lokasyonu ve IgG anti-dsDNA antikor birikiminin miktarı böbrek hasarının derecesini etkileyebilir (60-62). Bazı çalışmalar anti-dsDNA antikorlarının glomerulusta varolan antijen ile çapraz reaksiyona girebildiğini ve bu çapraz reaksiyona giren antikorların hastalık patogenezinde payı olduğunu belirtmektedir. Bu antikorların özellikleri bireyden bireye, zamanla aynı bireyde ya da hastalık aktivitesi ile daha sabit bir antikor titresi karşısında değişebilir. Böylece, ısrarla hastalık aktivitesinin iyileşmesine rağmen anti-dsDNA antikoru ölçümleri yükselmiş SLE'li bazı hastalar vardır. Aynı şekilde, hastaların küçük ama önemli bir azınlığı anti-dsDNA antikor titresi yükselmeksizin aktif nefrite sahiptir. Anti-dsDNA antikorlarının titre yükseklikleri veya konsantrasyon değerleri SLE'li hastaların izleminde yardımcı olabilir. Hastalık aktif olduğunda anti-dsDNA antikorlarının artma eğilimindedir ve anti-dsDNA antikorlarının düzeyleri ve glomerulonefrit arasında (63, 64) özellikle hipokomplementemi ortamında (63, 65) güçlü bir ilişki vardır. Bazı çalışmalarda, anti-dsDNA antikor düzeyleri ile hastalık aktivitesi arasındaki ilişki istisnaları bildirilmiştir; örnek olarak, bazı hastalar inaktif veya minimal aktif lupus durumunda yükselmiş anti-dsDNA düzeylerine sahiptir (66). Böylece, SLE'li bazı hastalar için antikor düzeyi ve hastalık aktivitesi arasındaki korelasyon gösterilirken,

bu testin klinik yararının kısıtlı olduğu diğer hastalar mevcuttur. Örneğin, SLE'nin nöropsikiyatrik klinik tablosu için antikor titresi ve hastalık aktivitesi arasında ilişki yoktur (67). Genelde, anti-dsDNA antikorlarının izlenmesi, alevlenme öncesi ya da alevlenme esnasında klinik durum ile korele titreleri değişen hastalar için çok önemlidir (68).

2.9.2.4. Patojenik Mekanizmalar

2.9.2.4.1. Direkt Etkiler

Hedef antijenlerin hücresel lokalizasyonu otoantikorların patojenik potansiyelini saptamada önemli bir faktördür (69). Genel olarak, intrasellüler antijenlere karşı otoantikorların patojenik potansiyeli belirsiz iken, ekstrasellüler antijenlere karşı yönlendirilmiş otoantikorların patojenik olduğu düşünülmektedir (50). Anti-dsDNA antikorları intrasellüler bir hedefe sahip olmasına rağmen, SLE hastalarında böbrek hastalığı ile iyi tanımlanmış bir ilişki vardır (70-72). Hareketin potansiyel mekanizması, hücresel DNA takıldıktan sonra apoptoz indüksiyonu aracılığıyla sitopatik etkilerin direkt olarak kullanılması, nükleusa gidiş geliş ve anti-dsDNA antikorlarının hücrelere girme yeteneğidir (Şekil 5) (73-76). İntrasellüler transport mekanizması açıklanamamıştır, fakat başlangıç antikor penetrasyonu, Fc reseptör-aracılı alım, Fc reseptör-aracısız endositoz ve elektrostatik etkileşimi içeren çeşitli mekanizmalar aracılığı ile meydana gelebilir (74, 77, 78). Bu süreç, otoreaktifin B hücre yanıtlarının amplifikasyonu için substrat ilavesine neden olan apoptotik birikinti ve artmış hücre ölümüne neden olabilir. Anti-dsDNA antikorlarının patojenik potansiyeli aynı zamanda polireaktiviteye bağlı olabilir (Şekil 5) (78).



Şekil 5. Anti-dsDNA antikorlarının patojenik mekanizmaları. Anti-dsDNA antikorları ayrıcalıklı olmayan mekanizmaların bir çeşidi ile patolojiye neden olabilir: direkt olarak hücrelere girer ve hücresel DNA'nın (üst sol) bağlanması ile apoptozu indükler; polireaktif bir yolda dsDNA'sız antijenler hücre yüzeyine bağlanır (alt sol); elektrostatik olarak hücre yüzeyine immün kompleks köprü olan nükleozomların DNA komponentine bağlanır (üst sağ); TLR9 için dsDNA ligandı sunarak Fc aracılı alındıktan sonar IFN-α sekresyonunu indükler (alt sağ)

Polireaktif anti-dsDNA antikorları için potansiyel bir hedef aktin-etkileşimli protein α-aktinindir. Bu teoriyi destekleyen, α-aktinin ile çapraz reaksiyona giren yüksek aviditeli anti-dsDNA antikorlarının renal hastalık ile ilişkili olmasıdır (79). Ayrıca, α-aktinin çapraz reaktivitesi renal hastalıklı SLE hastaalrında en sık gözlenmektedir ve α-aktinin için anti-dsDNA antikor afinitesi glomerular bağlanma ile ilişkilidir (80, 81). Polireaktivite, NMDA (N-metil-D-aspartat) reseptörüne anti-dsDNA bağlanmasıyla gösterildiği gibi, böbrek antijenleri ile kısıtlı bir olgu değildir. NMDA reseptörleri nörotransmitter glutamate bağlanır ve beynin hipokampus ve korteksinde bulunmaktadır (82). SLE hastalarında bilişsel yetersizlik ve duygu durumu bozukluğunu içeren merkezi sinir sistemi belirtileri gösterebilir (83). İlginç bir şekilde, bilişsel fonksiyonlar ve duygu durumu stabilitesinin her ikisi birden NMDA reseptörüne gereksinim duyarlar ve bu reseptör ile anti-dsDNA antikor polireaktivitesinin SLE'nin bazı nörolojik belirtilerine katkıda bulunduğu varsayılmaktadır (84-86). Aslında, farelere bu polireaktif anti-dsDNA'ların verilmesi Fc reseptör-bağımsız nöral ölümle sonuçlanır (87). Anti-dsDNA antikorlarının polireaktif doğası, neden bazı anti-dsDNA antikorlarının patojenik olup bazılarının olmamasını en azından kısmen açıklayabilmektedir.

2.9.2.4.2. *İndirekt Etkiler*

Anti-dsDNA antikorları ayrıca hastalığın seyri esnasında oluşturulan antijen-antikor komplekslerinin dolaşımı yoluyla dolaylı bir biçimde patojenik etki gösterebilir. Lupus hastalarının böbreğinde immun komplekslerin varlığı ve bu dolaşımın oluşumu ilk olarak aktif hastalıkla korele olduğu yaklaşık olarak elli yıl önce bildirilmiştir (88-90). Bu immün komplekslerde antikorlar DNA'ya spesifik olmasına rağmen, lupuslu hastaların kanında tespit edilen serbest DNA'dan ziyade nükleozomlar olarak in vivo nükleozomlarla etkileşimde olduğu muhtemeldir (91, 92). Nükleozomlarda pozitif yüklü histonlar elektrostatik etkileşimler aracılığıyla glomerulusun negatif yüklü temel membranına bağlanabilir ve böylece renal dokulara bu immün kompleksleri hedef gösterebilir (Şekil 5).

Aslında, immün kompleks oluşturmak için nükleozomların eklenmesi glomerular antikor birikimi ve kompleman aktivasyonu ile sonuçlanırken, anti-DNA antikorları tek başına böbrek dokusuna bağlanamaz (93). İlaveten, temel membran ilişkili nükleozomlar elektron mikroskobu kullanılarak DNA'ya nefritojenik antikorların hedef olduğu bulunmuştur (94). İmmün komplekslerdeki DNA, Toll-benzeri reseptör (TLR) 9 tarafından tanınan tehlike ilişkili moleküler patern olarak fonksiyon gösterdiğinde; aynı zamanda patojenik etkiler sağlanmış olabilir. TLR9, patojen-ilişkili DNA'ya erişimi sağlamak için ve apoptoz ya da NET oluşumu esnasında salınabilen self-DNA'ya erişimi kısıtlamak için endozomda yerleşmektedir (95). İntrasellüler lokalizasyona rağmen, TLR9 FcγRIIa reseptörler aracılığıyla plazmasitoid dendritik hücreler (pDCs) ile alımdan sonra DNA-içeren immün kompleksler ile aktive edilebilir (Şekil 5) (96). pDCs, SLE hastalarının serumunda yükselen bir sitokin olan IFN-α'nın etkili bir üreticisidir ve hastalık sürecinde önemli olduğu düşünülmektedir (97). Anti-dsDNA antikorları arttırıcı IFN-α'nın olası bir mekanizmasının nötrofillerle etkileşimi yoluyladır. IFN- α'ya karşı nötrofil yanıt hücre yüzeyinde ve en sonunda bakteriyal öldürme kapasitesini arttırmak için NET'te antimikrobiyal peptit LL37'nin upregülasyonunu indükler. İlginç bir şekilde, L37 bazı hastalarda aynı zamanda bir otoantijen olabilir ve nötrofil yüzeyinde anti-LL37 antikor bağlanması hücre ölümünü ve NET oluşumunu indükler. Otoantikor-indüklenen NET'ler daha sonra anti-dsDNA antikorları için antijen sunarlar ve ortaya çıkan immün komplekslerin DNA komponentleri inflamatuvar positif bir geri bildirim döngüsünü kuran pDCs tarafından daha çok IFN-α üretimini tetikler (98, 99). Böylece, DNA içeren immün komplekslerin dolaşımının varlığı, DNA

içeren immün komplekslerin oluşumunun yanısıra anti-dsDNA antikorlarının gelişimini yönlendirebilen substrat miktarının artması ile sonuçlanan bir süreci başlatabilir.

2.9.2.4.3. *Patojeniteye Katkıda Bulunabilen Faktörler*

Bazı araştırmacılar, anti-dsDNA antikorlarının varlığının ve titresinin hastalık aktivitesi ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır, ancak diğer çalışmalarda korelasyon bulunamamıştır. Anti-dsDNA antikorlarının hızlı bir şekilde yükselişinin 2-3 aylık periyotlar da gerçekleştiği ve bunun ardından alevlenme zamanında hızlı bir düşüş olduğu ortaya konulmuştur. Patojenik antidDNA antikorlarının özellikleri yoğun bir araştırma alanıdır. Anti-dsDNA antikorlarının patojenitesine katkıda bulunan faktörler Tablo 6'da özetlenmiştir (100).

Tablo 6. Anti ds-DNA antikorlarının patogenezine katkıda bulunabilen faktörler

1. Yapısı
- (a) Yüklü
- (b) İzotip
- (c) V bölgesi geninde diğerlerinden farklı amino asit kullanımı

2. Fonksiyonu
- (a) Hedef organ antijenleri ile çapraz reaktivite
- (b) İmmün komplekslerin doğası şekillenir
- (c) Hücrelere penetre olma yeteneği
- (d) x komplement yeteneği
- (e) Hücresel fonksiyonda hücre yüzey moleküllerini aktive etme yeteneği

3. dsDNA için avidite

4. Idiotip

2.10. Verilerin Değerlendirilmesi

Duyarlılık ve **özgüllük,** istatistiklerde aynı zamanda sınıflandırma fonksiyonu olarak da bilinen bir ikili sınıflandırma testinin performansının istatistiksel ölçüsüdür:

- **Duyarlılık** (aynı zamanda gerçek pozitif oran olarak isimlendirilir, bazı alanlarda saptama olasılığı) doğru olarak tanımlanan pozitiflerin oranını ölçer (örn. Bu koşulun doğru olarak tanımlandığı hasta kişilerin yüzdesi).
- **Özgüllük** (aynı zamanda gerçek negatif oran olarak isimlendirilir) doğru olarak tanımlanan negatiflerin oranını ölçer (örn. Bu koşula sahip olmayanların doğru olarak tanımlandığı sağlıklı kişilerin yüzdesi) (101).

i. Duyarlılık

Duyarlılık, hasta olanların doğru olarak saptanabilmesi için testin yeteneğini ifade eder. Bir hastalığın belirlenmesinde kullanılan tıbbi bir test örneğinde, testin duyarlılığı hastalığı olanlar arasında hastalık için testin pozitif olduğu kişilerin oranıdır. Matematiksel olarak, aşağıdaki gibi ifade edilir (Şekil 6) (102).

		H+	H-	TOPLAM
Tanı	H+	A (GP)	B (YP)	A+B
Testi	H-	C (GN)	D (GN)	C+D
Sonucu	Toplam	A+C	B+D	A+B+C+D

Duyarlılık =a / (a+b)
= GP / (GP + YN)
= GP / (popülasyondaki hasta bireylerin toplam sayısı)
= hastalığa sahip hastalarda testin pozitif olma olasılığı

Şekil 6. Duyarlılık değerinin hesaplanması

Testin, gerçek hastalar içinden hastaları ayırma yeteneğidir. Gerçek sağlamlara konan tanılar açısıdan; "d" gözü gerçek tanı sonucuna uygun olarak testinde sağlam dediği gerçek negatif (GN) olgulardır. "b" gözü ise gerçekte sağlam oldukları halde testin hatalı olarak hasta dediği yanlış pozitif (YP) olgulardır. Yüksek duyarlılığa sahip bir testte negatif bir sonuç, hastalığın dışlanması için yararlıdır. Yüksek duyarlılığa sahip testin sonucu negatif olduğunda güvenilirdir, çünkü hastalığı olanlara nadiren yanlış tanı koyar. %100 duyarlılığa sahip bir test, pozitif test sonucu ile hastalığı olan bütün hastaları tanıyacaktır. Negatif bir test sonucu, hastada hastalığın varlığını kesin olarak dışlayacaktır. Yüksek duyarlılığa sahip bir testte pozitif bir sonuç hastalık yönetimi için yararlı değildir. Bir "denenecek" test kitinin yalnızca pozitif gösterecek şekilde tasarlandığını varsayalım. Hastalığı olan hastalarda kullanıldığında, tüm

hastalarda test pozitif sonuç vereceğinden teste %100 duyarlılık kazandırır. Ancak tanıma gore duyarlılık yanlış pozitiflikleri hesaba katmaz. Denenecek test aynı zamanda tüm sağlıklı hastalarda da pozitif sonuç verir, bu da yanlış pozitif oranın %100 olmasına neden olur ve hastalığın saptanması ya da "kararın verilmesi" için işe yaramaz hale gelir (102).

ii. Özgüllük

Özgüllük, testin hastalığı olmayan olguları doğru olarak tespit edebilme yeteneği ile ilişkilidir.. Bir testin özgüllüğü, bu test için negatif test sonucuna sahip hastalığa sahip olmadığı bilinen sağlıklı hastaların oranıdır. Testin, gerçek sağlamlar içinden sağlamları ayırma yeteneğidir. Matematiksel olarak, aşağıdaki gibi ifade edilir:

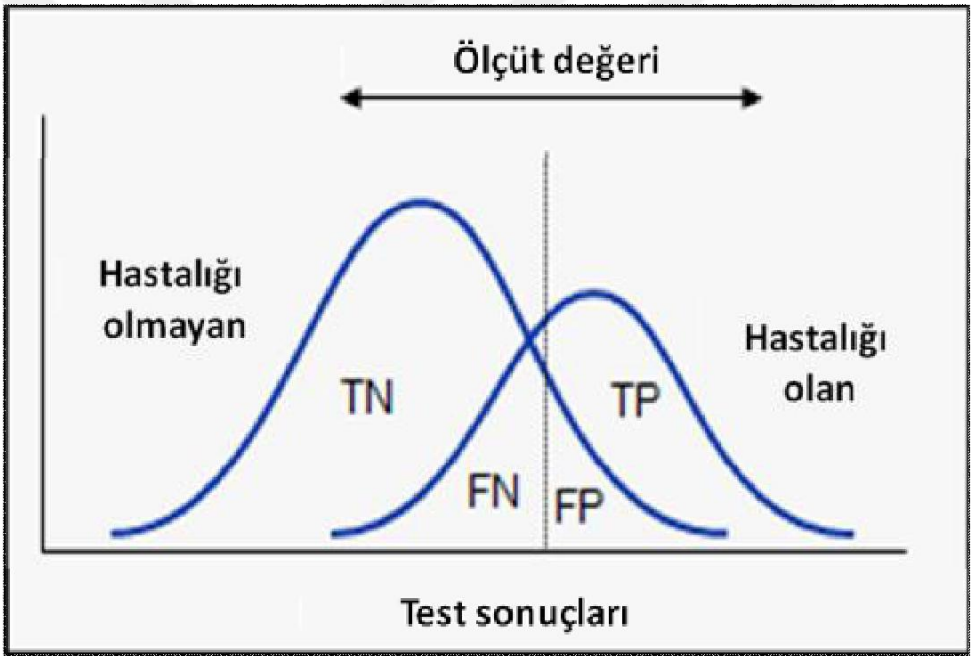
Özgüllük =d / (c+d)
= GN / (GN + YP)
= GN / (popülasyondaki sağlıklı bireylerin toplam sayısı)
= sağlıklı olan hastalarda testin negatif sonuç verme olasılığı

Yüksek özgüllüğe sahip bir testte pozitif bir sonuç, hastalığın yönetimi için yararlıdır. Test sağlıklı hastalarda nadiren pozitif sonuç verir. %100 özgüllüğe sahip bir test tüm sağlıklı hastalardan hastalığı doğru bir şekilde dışlar ve negatif sonuç verir. Pozitif bir sonuç, hastalık varlığının yüksek olasılığını belirtir (103). Duyarlılık ve özgüllük oranlarının tersi olan, testin hatalı yargıları da hesaplanabilir.

- *Pozitif olabilirlik oranı:* Hastalık varlığında pozitif test sonucu verme olasılığı ve hastalık yokluğunda pozitif test sonucu verme olasılığı arasındaki oran
  =Gerçek pozitif oran/Yalancı pozitif oran= Duyarlılık / (1-Özgüllük)
- *Negatif olabilirlik oranı:* Hastalık varlığında negatif test sonucu verme olasılığı ve hastalık yokluğunda negatif test sonucu verme olasığı arasındaki oran
  =Yalancı negatif oran/Gerçek negatif oran= (1-Duyarlılık) / Özgüllük
- *Pozitif prediktif değer:* Test pozitif olduğunda hastalığın bulunma olasılığı (yüzde olarak ifade edilir)
  =a / (a+c)
- *Negatif prediktif değer:* Test negatif olduğunda hastalığın bulunmama olasılığı (yüzde olarak ifade edilir)
  =d /(b+d)

Tıbbi testlerin performanslarının değerlendirilmesinde en önemli ve kullanılan teknik ROC eğrisi yöntemidir. ROC eğrisi tanı testlerinin güvenirliği ve genel doğruluğu açısından standart yöntem haline gelmiştir. ROC eğrisi analizi kullanılarak normal sağlıklı olgular ile hastalıklı olguların ayırt edilmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır (104, 105). ROC eğrileri aynı zamanda iki ya da daha fazla laboratuvarın ya da tanı testlerinin tanı performansını karşılaştırmak için de kullanılabilir (106).

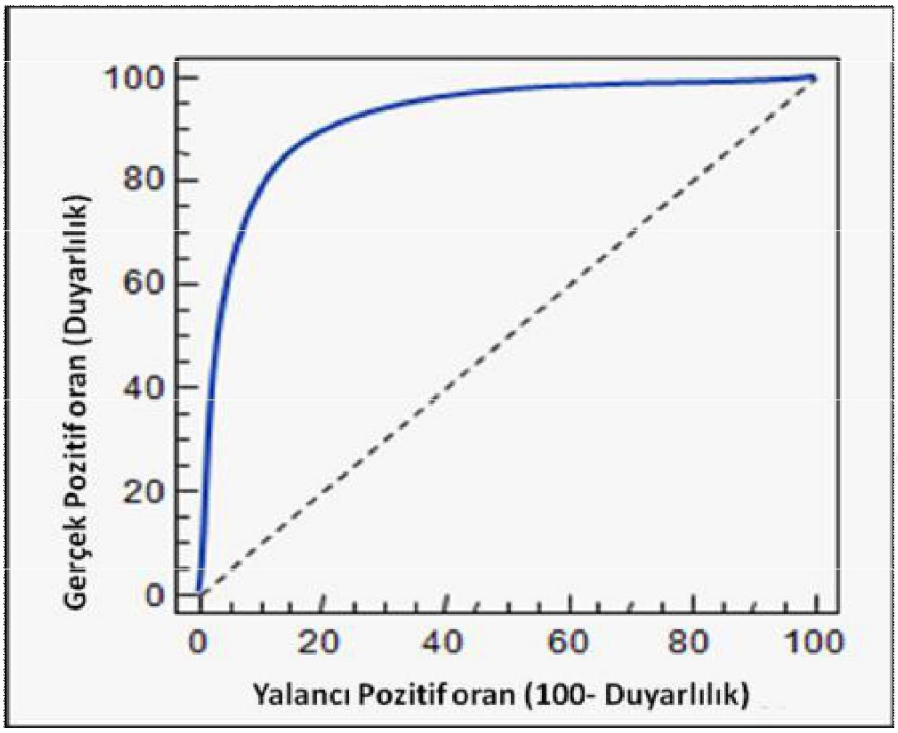
İki popülasyonda (hastalıklı bir popülasyon, hastalıksız diğer popülasyon) belirli bir testin sonuçları değerlendirildiği zaman, iki grup arasında mükemmel bir ayrım nadiren gözlenmektedir. Aslında, test sonuçlarının dağılımı şekilde görüldüğü gibi üst üste çakışacaktır (Şekil 7).



Şekil 7. Hastalığı olan ve olmayan popülasyonda test sonuçlarının dağılımı

İki grup arasında ayrım yapmak için olası eşik noktası yada ölçüt değeri seçilir, pozitif olarak doğru sınıflandırılmış hastalığı olan bazı olgular (TP= gerçek pozitif fraksiyon) olacaktır ve bunlar seçilen eşik değerin üzerine yer alan grupta yer alacaklardır, fakat hastalığı olan bazı olgular eşik değerin altında oldukları için negatif (FN= Yanlış negatif fraksiyon) olarak sınıflandırılacaktır. Bunun yanısıra, hastalığı olmayan olgular doğru bir şekilde negatif (TN= Gerçek negatif fraksiyon) olarak sınıflandırılacak, fakat hastalığı olmayan bazı olgular ise benzer

şekilde eşik değerin üzerinde yer aldıkları durumda pozitif (FP= Yanlış pozitif fraksiyon) olarak sınıflandırılacaktır. ROC eğrisinde, gerçek pozitif oran (duyarlılık) farklı eşik noktaları için yanlış pozitif oranın (100- Özgüllük) işlevi ile çizilir. ROC eğrisinde her nokta belirli bir karar eşiğine karşılık gelen bir duyarlılık/özgüllük çiftini temsil eder. Mükemmel ayırt edebilen (iki dağılımda çakışma olmaz) bir test, sol üst köşeden geçen bir ROC eğrisine sahiptir (%100 duyarlılık, %100 özgüllük). Bu nedenle, ROC eğrisi sol üst köşeye yaklaştıkça, testin genel doğruluğuda o kadar yüksek olur (Şekil 8) (105).



Şekil 8. ROC eğrisinde gerçek pozitiflik oran ve yalancı pozitiflik oran ilişkisi

Uygulanan testlerin performanslarının değerlendirilmesi için dört gözlü tablo oluşturuldu. Testin tanısal karar verme yeterliliği ROC eğrisi ile belirlendi. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlam olup olmadığı student t test ve McNemar Ki-kare kullanılarak değerlendirildi (SPSS Version 21.0 for Windows). $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Yapılan çalışma deneysel nitelikte bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Çalışma, Aralık 2014- Eylül 2015 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı İmmünoloji Birimi'nde gerçekleştirilmiştir.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Dokuz Eylül Üniversitesi Merkez Laboratuvarı İmmunoloji birimine Aralık 2014- Eylül 2015 tarihleri arasında başvuran anti-dsDNA EIA istemi yapılan klinik olarak SLE tanısı almış 274 hasta (252 kadın, 22 erkek; yaş aralığı 7-80), diğer otoimmun hastalık tanıları ile gönderilen 627 hasta (463 kadın, 164 erkek; yaş aralığı 1-88) ve 23 sağlıklı kan donörleri (3 kadın, 20 erkek; yaş aralığı 19-57) çalışmaya alındı.

3.4. Çalışma Materyali

3.4.1. Serum Örneklerinin Toplanması

Aralık 2014- Eylül 2015 tarihleri arasında klinik olarak SLE tanısı almış 274 hastadan, diğer otoimmun hastalık tanıları ile gönderilen 627 hastadan ve 23 sağlıklı kan donörlerinden elde edilen serum örnekleri için Dokuz Eylül Üniversitesi Merkez Laboratuvarı İmmunoloji birimindeki serum arşivinden yararlanıldı.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

SLE hastalarında anti-dsDNA antikorlarının saptanması "bağımlı değişken", cinsiyet, ve yaş "bağımsız değişken"; diğer otoimmun hastalık tanısı alan hastalar olması "kontrol değişkeni" olarak değerlendirildi.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Kullanılan cihazlar ve sarf malzemeleri

Sıra No	**Malzeme Adı**	**Marka**	**Lot No, Model, Seri No, Katalog No**	**Kullanıldığı Analiz**
1.	Anti-dsDNA EIA	Orgentec	OR6604/604305	Anti ds-DNA ELISA
2.	Spektrofotometre	Chromate	4300/2879	Anti ds-DNA ELISA
3	Mikroplak yıkayıcı	Combiwash Human	18460/590864	Anti ds-DNA ELISA
4	Vorteks	XH-C Vortex	412357	Anti ds-DNA ELISA
5	10 ul pipet	Thermo lab systems	S779934500	Anti ds-DNA ELISA
6	100 ul pipet	Thermo electron corporation	CJ069324500	Anti ds-DNA ELISA
7	1000 ul pipet	Brand transfer pette	12 E58181	Anti ds-DNA ELISA
8	Deiyonize su	Poli farma	C-1604048	Anti ds-DNA ELISA
9	1000 ml ölçüm silindiri	Simex Czech republic	-	Anti ds-DNA ELISA
10	100 ml ölçüm silindiri	Simex Czech republic	-	Anti ds-DNA ELISA
11	Plastik kap	FIRATMED	-	Anti ds-DNA ELISA
12	100 ul pipet ucu	Labcon North America	Lot: 342C6-342A	Anti ds-DNA ELISA
13	1000 ul pipet ucu	Labcon North America	Lot: 342C6-342A	Anti ds-DNA ELISA
14	10 ul pipet ucu	Labosel	Lot: 1884101	Anti ds-DNA ELISA
15	Budrasız eldiven	Beybi	Lot: 223033555LLZE	Anti ds-DNA ELISA
16	Buzdolabı	BEKO	D18410 SM	Anti ds-DNA ELISA
17	20 derin dondurucu	BEKO	D18410 SM	Anti ds-DNA ELISA

3.6.2. Orgentec® anti-dsDNA EIA Yöntemi

Anti-dsDNA'ya karşı IgG yanıtının varlığı, hazır ticari EIA testi (Orgentec Diagnostika, Almanya) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışıldı. ORGENTEC firması tarafından üretilen anti-dsDNA kitleri insan serumu ya da plazma numunelerinde dsDNA 'e IgG sınıfı antikorlarının nicel ölçümü için geliştirilmiş EIA test sistemidir. 96 çukurcuktan oluşan EIA plağındaki her bir mikroçukur dsDNA rekombinant insan antijeni ile kaplanmıştır. Kitin ölçüm aralığı 0-200 IU/mL aralığı olarak belirtilmiş olup tanısal cut-off değeri 20 IU/mL olarak belirlenmiştir. Buna göre <20 IU/mL altındaki değerleri "Negatif" olarak değerlendirilmesi, ≥20 IU/mL değerleri "Pozitif" olarak değerlendirilmesi önerilmektedir.

3.6.2.1. Orgentec® anti-dsDNA IgG EIA Test İçeriği

Bu yöntemde antijen olarak rekombinant insan ds-DNA antijeni kullanılmaktadır. Test içeriği Tablo 7'de gösterilmektedir.

Tablo 7. Orgentec® anti-dsDNA IgG EIA Test kiti içeriği

1. Mikroplak	1	Her biri 12 modülden oluşan, bölünebilir 8 kuyulu mikroplak. Kullanıma hazır.
2. Kalibratör (A)	1.5 mL	Kalibratör A 0 IU/ml dsDNA antikorları içeren, serum/tampon matriks (PBS, BSA, deterjan, NaN_3 % 0,09) .Kullanıma hazır.
3. Kalibratör (B)	1.5 mL	Kalibratör B 12.5 IU/ml dsDNA antikorları içeren, serum/tampon matriks (PBS, BSA, deterjan, NaN_3 % 0,09). Kullanıma hazır.
4. Kalibratör (C)	1.5 mL	Kalibratör C 25 IU/ml dsDNA antikorları içeren, serum/tampon matriks (PBS, BSA, deterjan, NaN_3 % 0,09). Kullanıma hazır.
5. Kalibratör (D)	1.5 mL	Kalibratör D 50 IU/ml dsDNA antikorları içeren, serum/tampon matriks (PBS, BSA, deterjan, NaN_3

		% 0,09). Kullanıma hazır.
6. Kalibratör (E)	1.5 mL	Kalibratör E 100 IU/ml dsDNA antikorları içeren, serum/tampon matriks (PBS, BSA, deterjan, NaN_3 % 0,09). Kullanıma hazır.
7. Kalibratör (F)	1.5 mL	Kalibratör F 200 IU/ml dsDNA antikorları içeren, serum/tampon matriks (PBS, BSA, deterjan, NaN_3 % 0,09). Kullanıma hazır.
8. Kontrol (+)	1.5 mL	Pozitif kontrol dsDNA antikorları içeren, serum/tampon matriks (PBS, BSA, deterjan, NaN_3 %0,09). Kullanıma hazır. Konsantrasyonu kit içerisindeki analiz belgesindedir.
9. Kontrol (−)	1.5 mL	Negatif kontrol, dsDNA antikorları içeren, serum/tampon matriks (PBS, BSA, deterjan, NaN_3 %0,09). Kullanıma hazır. Konsantrasyonu kit içerisindeki analiz belgesindedir
10. Konjugat	15 mL	Enzim konjügat; açık kırmızı; Horse radish peroksidaz ile işaretli anti-human IgG antikorları, PBS, BSA, deterjan, koruyucu PROCLIN %0,05 içerir. Kullanıma hazır.
11. Substrat (TMB)	15 mL	TMB Substrat çözeltisi (3,3',5,5'-Tetrametil benzidin). Kullanıma hazır.
12. Dilüent solüsyonu	20 mL	Sarı renkli serum dilüsyon tamponu, PBS, BSA, detergent, sodium azide %0.09, (5X) yoğunlukta.
13. Stop çözeltisi	15 mL	Durdurma çözeltisi; asit içerir. Kullanıma hazır.
14. Yıkama tamponu	20 mL	Yıkama tamponu; Tris, deterjan, koruyucu sodyum azit %0,09; 50X yoğunlukta.

3.6.2.2. Orgentec® anti-dsDNA IgG EIA Testi Uygulaması

Test üretici firma önerileri doğrultusunda aşağıdaki basamaklar izlenerek çalışıldı.

1. Bütün reaktifler çalışmadan önce 30 dakika oda ısısında bekletildi.
2. Tüm reaktifler çalışmadan önce çalkalandı.
3. Çalışma öncesi yıkama tamponu ve serum dilüent solüsyonu hazırlandı.
   - Yıkama Tamponu: 50X yoğunluktaki 20 mL yıkama tampon çözeltisi final konsantrasyonu 1000 mL olacak şekilde distile su ile hazırlandı.
   - Serum dilüent çözeltisi: 5X yoğunluktaki 20 mL yıkama tampon çözeltisi final konsantrasyonu 100 mL olacak şekilde distile su ile hazırlandı.
4. 96 çukurlu EIA plağının birinci kuyucuğundan başlayarak aşağıdaki şablona (Tablo 8) göre kuyulara 100 µl kalibratörler, kontroller ve seyreltilmiş hasta numunelerini pipetlendi.

Tablo 8. 96 çukurlu EIA plağı deney şablonu

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	K1	P1										
B	K2	P2										
C	K3	P3										
D	K4											
E	K5											
F	K6											
G	C+											
H	C-											

(K1-K6) Kalibratörler, C+ Pozitif kontrol, C− Negatif kontrol, (P1, P2, P3) Numune

5. Oda sıcaklığında (20-28°C) 30 dakika inkübe edildi.
6. Mikro yıkayıcıda tüm kuyucuklardaki sıvı çekildikten sonra 300 µl yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkandı.
7. Her kuyunun içine 100 µl enzim konjuge dağıtıldı.
8. Oda sıcaklığında 15 dakika süreyle inkübe edildi.
9. Mikro yıkayıcı da tüm kuyucuklardaki sıvı çekildikten sonra 300 µl yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkandı.
10. Her bir kuyuya 100 µl TMB substrat solüsyonu dağıtıldı.
11. Oda sıcaklığında karanlık ortamda 15 dakika inkübe edildi.
12. Her kuyucuğuna 100 µl stop solüsyonu eklendi
13. Oda sıcaklığında, 5 dakika süreyle inkübe edildi.
14. Otuz dakika içerisinde 450 nm (referans 620 nm) spektrofotemetrede optik yoğunlukları okundu.
15. Sonuçlar üretici firmanın sağlamış olduğu veri analiz programı aracılığı ile 4-Parametre –Fit lin-log ölçüm yöntemine uygun olarak optik yoğunluk ve konsantrasyon arasındaki ilişki kantitatif olarak değerlendirilip hem grafik olarak hem de tablo olarak elde edildi.
16. Test sonuçlarının geçerliliği kit içerisinde bulunan test analiz sertifikasında bahsedilen referans aralıkları ile ile karşılaştırılarak uyumlu ise test sonuçları geçerli olarak kabul edildi.
17. Test sonucunda <20 IU/mL altındaki değerleri “Negatif”, ≥20 IU/mL değerler “Pozitif” olarak değerlendirildi.

3.7. Araştırma Planı

	Ekim 2014	Kas 2015	Ara 2015	Mar 2016	May 2016	Haz 2016	Tem 2016	Ağu 2016	Eyl 2016	Eki 2016 - Nis 2017
Etik Kurul kararı										
Hasta grupların belirlenmesi										
BAP malzeme alımı										
Örneklerin çalışılması										
Verilerin gruplara göre sınıflandırılması										
Istatiksel değerlendirme										
Tezin yazılması										

3.8. Araştırmanın Sınırlılıkları

Çalışma ile ilgili sınırlamalara tartışma kısmında değinilmiştir.

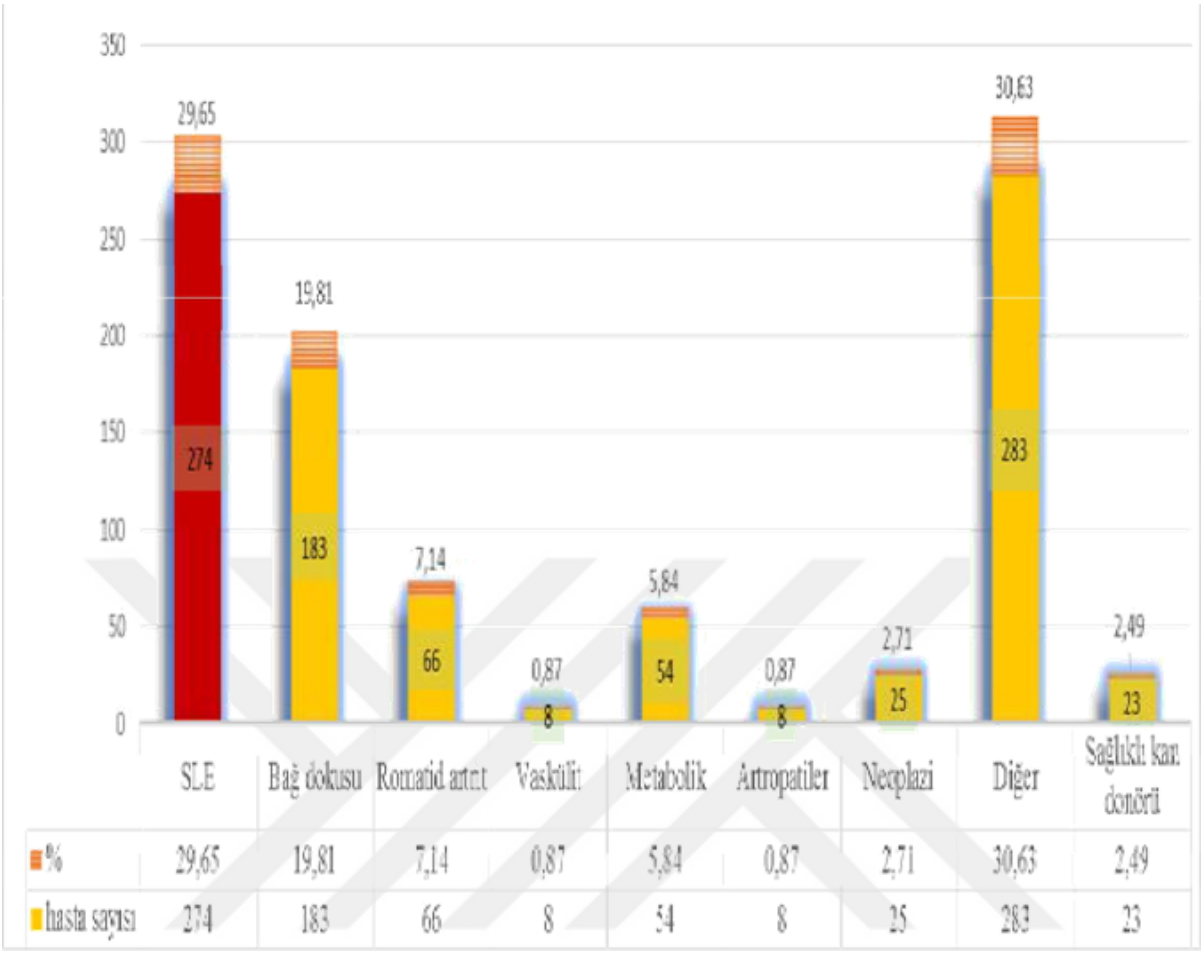
3.9. Etik Kurul Onayı

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 30 Ekim 2014 tarih ve 2014/33-09 nolu toplantısında, 1748-GOA protokol numaralı "**Sistemik Lupus Eritematozis (SLE) Tanısında Anti-dsDNA ELISA Testinin Optimal Cut-Off Değerinin Belirlenmesi"** isimli yüksek lisans tezi araştırma projesinin uygulanması onayı, 03.11.2014 tarih ve 717 sayılı yazı ile bildirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Hasta Gruplarının Değerlendirilmesi

Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı İmmünoloji Birimine Aralık 2014- Eylül 2015 döneminde SLE ve otoimmun bağ dokusu tanısı ile gönderilen serum örneklerinden anti-dsDNA EIA istemi yapılan örnekler çalışma için seçildi. Bu dönem içerisinde laboratuarın iki farklı marka anti-dsDNA EIA kullanması nedeniyle Orgentec® anti-dsDNA EIA istemi yapılan hastaların test sonuçları doğrudan çalışmaya alınırken farklı marka kitle çalışmaya alınan 65 SLE tanısı almış serum örnekleri tekrar Orgentec® anti-dsDNA EIA kitiyle çalışıldı. Ayrıca Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Kan Merkezinden elde edilen sağlıklı kan donörlerinden elde edilen serum örnekleri de EIA ile çalışıldı. Orgentec® anti-dsDNA EIA testinin tanısal karar verme yeterliliği değerlendirilmesinde SLE tanısı almış hastalar, diffüz ve fokal otoimmun hastalık tanısı ile gelen hasta örnekleri, otoimmun bağ dokusu tanısı dışında farklı hastalıklar nedeniyle gelen hasta örnekleri ve sağlıklı kan donörlerinden elde edilen hasta örnekleri çalışmaya alındı. Çalışmaya alınan serum örneklerin hastalık gruplarına göre dağılımı; klinik olarak SLE tanısı almış 274 örnek, Sjögren, Skleroderma, Polimiyozit veya dermatomiyozit gibi difüz bağ dokusu hastalıkları tanıları gönderilen 183, romatoid artrit tanısı ile gönderilen 66, vaskülit tanısı ile gönderilen 8, dejeneratif osteoartropati nedeniyle gönderilen 8, diyabet ve diğer metabolik hastalıklar nedeniyle gönderilen 54, neoplazi tanısı ile gönderilen 25, otoimmün hastalıklar dışındaki diğer tanılar ile gönderilen 283 ve sağlıklı kan donörlerinden elde edilen 23 örnek olmak üzere toplam 924 örnek değerlendirilmiştir. Çalışmaya alınan hasta gruplarının dağılımına bakıldığında çalışmaya alınan toplam 924 örneğin %29.65'ini SLE tanısı alan hastalar diğerleri sırayla %19.81'ini Bağ dokusu hastalıkları, %7.14'ünü romatoid artirit, %0.87'sini vaskülit, %5.84'ünü metabolik, %0.87'sini artropatiler, %2.71'ini neoplazi, %31.71'ini diğer hastalık tanıları ve %2.49'ünü sağlıklı kan donörleri oluşturmaktadır (Şekil 9).



Şekil 9. Serum örneklerinin hastalık gruplarına göre dağılımı

4.2. Demografik Bulgular

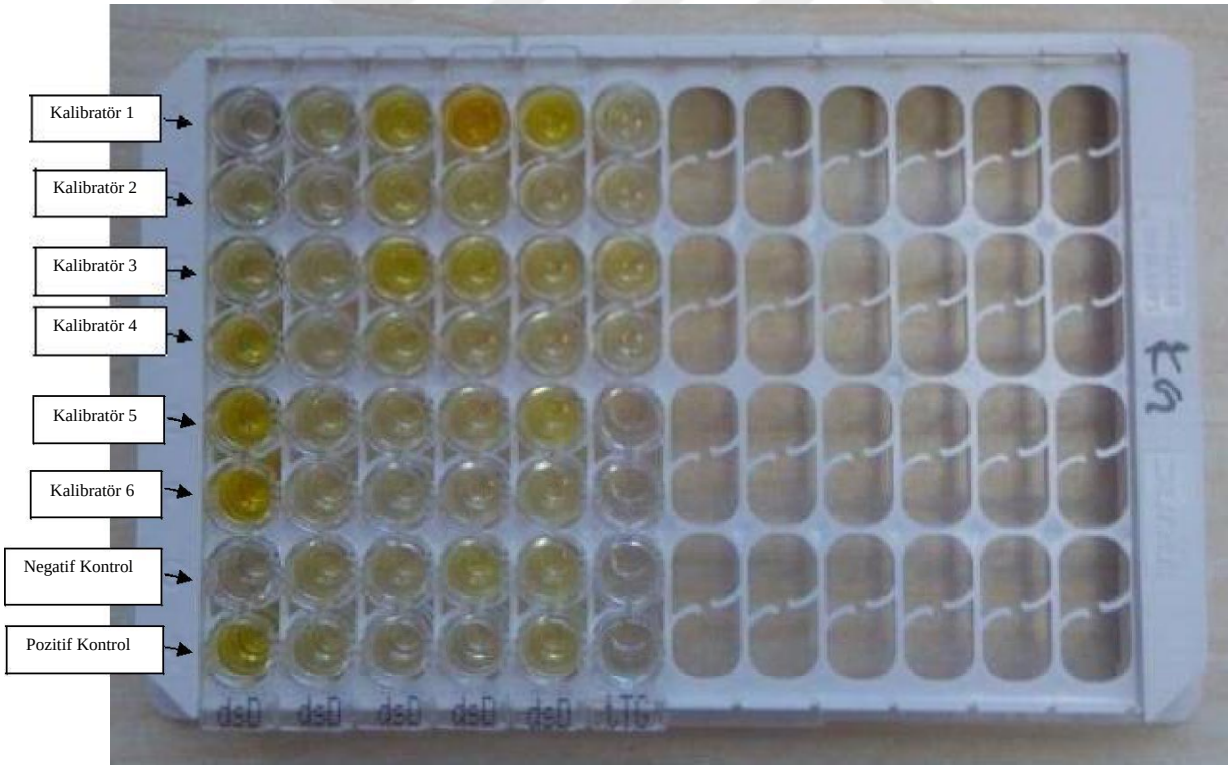
Çalışmaya alınan toplam 924 hastanın 718'ini (%77.70) kadın, 206'sını (%22.29) erkek hastalar oluşturmaktadır. Kadın hasta grubunun yaş ortalaması 39.0 (minimum:3; maksimum:88) iken erkek hasta grubunun yaş ortalaması 34.4 (minimum:2; maksimum:80) olarak belirlenmiştir. Yaş gruplarının hasta gruplarına göre dağılımı Tablo 9'da verilmektedir.

Tablo 9. Çalışmaya alınan örneklerin demografik verileri

	Kadın	%	Minimum yaş	Maksimum Yaş	Ortanca	Ortalama yaş	Erkek	%	Minimum yaş	Maksimum yaş	Ortanca	Ortalama yaş	Toplam
SLE	252	91.97	12	80	37	39	22	8.03	7	62	37	39	274
Bağ dokusu	165	90.16	19	82	46	45	18	9.84	11	73	45	45	183
Romatoid artrit	59	89.39	3	76	41	42	7	10.61	11	72	35	26	66
Vaskülit	5	62.50	8	51	30	30	3	37.5	8	16	12	12	8
Metabolik	44	81.48	17	88	40	44	10	18.52	11	69	46	44	54
Artropatiler	7	87.50	3	85	29	33	1	12.5	11	11	11	11	8
Neoplazi	20	80.00	17	72	45	43	5	20.00	14	69	63	52	25
Diğer	163	57.60	1	88	40	42	120	42.40	2	80	39	41	283
Sağlıklı kan donörü	3	13.04	25	38	36	33	20	86.96	19	57	43	40	23

4.3. Orgentec® Anti-dsDNA EIA Sonuçları

Aralık 2014- Eylül 2015 döneminde SLE, otoimmun bağ dokusu, bu hastalıkların dışında farklı klinik tanılar ile Merkez Laboratuvarı İmmünoloji birimine anti-ds DNA çalışılması istemiyle gönderilen örneklerin EIA sonuçları geriye dönük olarak incelendi. Orgentec® anti-dsDNA EIA testinin tanısal karar verme yeterliliği değerlendirilmesinde bu dönem içerisinde çalışılan EIA sonuçları kayıt edildi ve hasta gruplarına göre sınıflandırıldı. Aynı dönem içerisinde farklı bir firmanın kitiyle çalışılan SLE tanısı almış anti-dsDNA EIA sonuçları pozitif olan 66 serum örneğiOrgentec® anti-dsDNA EIA kiti üretici firmanın önerileri doğrultusunda tekrar çalışıldı. Ayrıca Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Kan Merkezinden elde edilen 23 sağlıklı kan donörü örnekleri de çalışmaya dahil edilerek toplam 88 hasta örneği çalışıldı. Orgentec® anti-ds DNA IgG testinin bir örneği Şekil 10'da gösterilmektedir.



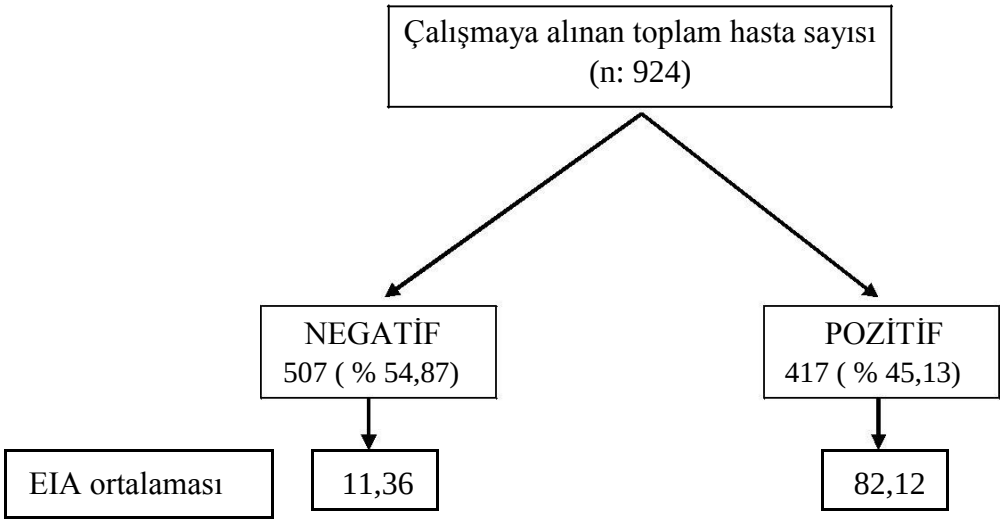
Şekil 10. Orgentec® Anti-ds DNA IgG testi örneği

Orgentec® anti-dsDNA EIAkiti içerisinde 0, 12.5, 25, 50, 100 ve 200 IU/mL konsantrasyonlarında ds DNA içeren 6 kalibratör ile standart bir eğri belirlenmekte ve her bir serum örneğinin test sonrası elde edilen optik değeri bu standart eğriyle karşılaştırılarak anti-ds DNA değeri IU/mL cinsinden belirlenmiştir. Üretici firmanın her bir kit için belirlediği geçerlilik kriterlerine uygunluk elde edildikten sonra testin kabul ettiği sınır değer 20 IU/mL olarak önerilmektedir. Buna göre <20 IU/mL altındaki değerler negatif, >20 IU/mL üzerindeki değerler ise pozitif olarak değerlendirildi. Çalışmaya alınan dönem içerisinde farklı bir üretici firmanın kitiyle çalışılan SLE tanısı almış anti-dsDNA EIA sonuçları pozitif olan 66 serum örneği Orgentec® anti-dsDNA EIA kiti ile tekrar çalışıldığında 64 örnek pozitif bulunurken iki örnek negatif (10.36 IU/mL, 17.32 IU/mL) olarak belirlenmiştir. Ayrıca çalışmaya alınan 23 sağlıklı kan donörlerinden elde edilen serum örneklerinden 22'si negatif iken bir tanesi sınıra yakın pozitif (22.14 IU/mL) olarak belirlenmiştir. Orgentec® anti-dsDNA EIA kiti ile Aralık 2014-Eylül 2015 döneminde anti-ds DNA istemi yapılmış ve çalışılmış 836 EIA sonucu ve tekrar çalışmaya alınan 88 EIA sonucu dahil olmak üzere toplam 924 EIA sonucu SPSS versiyon 15.00 veri tabanında değerlendirildi. SLE tanısı alan 274 örneğin anti-ds DNA değeri ortalama 105.85 IU/mL (6.80-969.79 ±SE 8.54), sırasıyla diffüz bağ dokusu tanısı alan 183 hasta grubunun ortalaması 18.57 IU/mL (3.77-172.00 ±SE 1.28), romatoid artrit tanısı alan 66 hasta grubun ortalaması 18.46 (2.03-76.19 ±SE 1.69), vaskülit tanısı alan 8 hasta grubun ortalaması 23.92 (12.30-41.80 ±SE 14.67), metabolik hastalıklar tanısı alan 54 hasta grubun ortalaması 20.08 (5.94-85.30 ±SE 2.22), artropati tanısı alan 8 hasta grubun ortalaması 21.73 (5.94-85.30 ±SE 3.91), neoplazi tanısı alan 25 hasta grubun ortalaması 15.74 (2.52-48.37 ±SE 2.49), diğer farklı tanılar ile gelen 283 hasta grubunun ortalaması 16.73 (1.58-245.76 ±SE 1.27) ve 23 sağlıklı grubun ortalaması 10.00 (4.91-22.14 ±SE 0.82) olarak belirlendi. Hastalık gruplarına göre elde edilen EIA değerlerinin ortalamalarının dağılımı Tablo 10'da gösterilmiştir.

Tablo 10. Hastalık gruplarına göre elde edilen EIA değerlerinin dağılımı

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
SLE	274	105,85818	141,474570	8,546791	89,03218	122,68417	6,800	969,790
Bag dokusu	183	18,57650	17,359804	1,283274	16,04450	21,10851	3,770	172,000
Artrit	66	18,46076	13,784007	1,696694	15,07223	21,84929	2,030	76,190
Vaskulit	8	23,92000	13,227740	4,676712	12,86133	34,97867	12,300	41,800
Metabolik	54	20,08833	16,336823	2,223160	15,62924	24,54743	5,940	85,300
Kemik	8	21,73500	11,078174	3,916726	12,47341	30,99659	7,630	39,910
Neoplazi	25	15,74840	12,463155	2,492631	10,60386	20,89294	2,520	48,370
Diger	283	16,73278	21,458758	1,275591	14,22189	19,24367	1,580	245,760
Saglikli	23	10,00826	3,956565	,825001	8,29731	11,71921	4,910	22,140
Total	924	43,75794	88,236552	2,902769	38,06115	49,45473	1,580	969,790

Orgentec® anti-dsDNA EIA kitin referans sınır değeri olan 20 IU/mL dikkate alındığında bu değerin altında negatif bulunan 507 örneğin (% 54.87) EIA ortalamaları 11.36 IU/mL (1.58-19.83 ± SE 0.17), ≥ 20 IU/mL üzerinde bulunan pozitif 417 örneğin (% 45.13) EIA ortalamaları 82.12 IU/mL (20-969.79 ± SE 5.81) olarak belirlendi.



Hastalık gruplarına göre SLE tanısı alan 274 örneğin 254'ü (%93,04) anti-ds DNA EIA test sonucu pozitif bulunurken 20'si (%7,33) negatif olarak belirlenmiştir. Diğer grupta bulunanlar sırasıyla diffüz bağ dokusu tanısı alan 183 hastanın 46'sı (%25,14) pozitif, 137'si

(%74,86) negatif, romatoid artrit tanısı alan 66 hastanın 21'i (%31,34) pozitif, 45'i (%67,16) negatif, vaskülit ve artropati tanısı alan gruptaki sekizer hastanın %50'si pozitif, metabolik hastalıklar tanısı alan 54 hastanın 20'si (%37,14) pozitif, 34'ü (%62,96) negatif, neoplazi tanısı alan 25 hastanın 6'sı (%24,00) pozitif, 19'u (%76,00) negatif, diğer farklı tanılar ile gelen 283 hastanın 61'i (%21,55) pozitif, 222'si (%78,45) negatif ve son olarak 23 sağlıklı kan donörü hastanın sadece bir tanesi (%4,35) pozitif, 22'si (%95,65) negatif olarak belirlenmiştir. Çalışmaya alınan hastalık gruplarına göre EIA sonuçlarının dağılımı Tablo 11'de gösterilmiştir.

Tablo 11: Çalışmaya alınan hastalık gruplarına göre EIA sonuçlarının dağılımı

	SAYI	POZİTİF	GRUP %	EIA SONUÇLARININ ORTALAMASI	NEGATİF	GRUP %	EIA SONUÇLARININ ORTALAMASI
SLE	274	254	92,71	113,04	20	7,29	14,57
BAĞ DOKUSU	183	46	25,13	36,1	137	74,87	12,69
ROMATOİD ARTRİT	66	21	31,82	33,61	45	68,18	11,39
VASKÜLİT	8	4	50	35,36	4	50	12,47
METABOLİK	54	20	37,04	34,94	34	62,96	11,34
ARTROPATİ	8	4	50	30,19	4	50	13,27
NEOPLAZİ	25	6	24	34,77	19	76	9,73
DİĞER	283	61	21,56	34,91	222	78,44	10,83
SAĞLIKLI	23	1	4,35	22,14	22	95,65	9,45
TOPLAM	**924**	**417**	**45,13**		**507**		**54,87**

SLE tanılı toplam 274 hastanın IU/mL cinsinden Anti-ds DNA EIA test değerlerin dağılımına bakıldığında 20 hasta örneğinin (% 7.30) sınır değer 20 IU/mL'in altında negatif olarak değerlendirildiği gözlenmiştir. Anti-ds DNA EIA sonuç dağılımları ve yüzdeleri Tablo 10'da gösterilmiştir. Pozitif olarak elde edilen değerlerin en düşük 20.07 IU/mL ile en yüksek 970.79 IU/mL arasında dağılım göstermektedir. Bu dağılıma bakıldığında en çok elde edilen değerlerin % 43.79 oranında kümülatif olarak 20 ile 49.99 IU/mL arasındaki grup içerisinde dağıldığı belirlenmiştir (Tablo 12).

Tablo 12. Test sonucu pozitif bulunan gruptaki anti ds DNA EIA değerlerinin dağılımları

	IU/mL	Sayı	Yüzde
1	<20	20	7.30
2	20 – 29,99	53	19.34
3	30 – 39,99	38	13.87
4	40 – 49,99	29	10.58
5	50 – 59,99	17	6.20
6	60 – 69,99	15	5.47
7	70 – 79,99	13	4.74
8	80 – 89,99	3	1.09
9	90 – 99,99	7	2.55
10	100 – 119,99	13	4.74
11	120 – 139,99	6	2.19
12	140 – 159,99	8	2.92
13	160 – 179,99	3	1.09
14	180 – 199,99	1	0.36
15	200 – 249,99	17	6.20
16	250 – 299,99	11	4.01
17	≥ 300	20	7.30
Toplam		274	100

SLE tanısı alan test sonuçları negatif çıkan 20 hastanın EIA sonuçlarının dağılımına bakıldığında 10 test örneğinin (% 50) EIA değerleri 15 ile 19,99 IU/mL arasında yer aldığı belirlendi (Tablo 13). Bunun da yarısının yani 5 hastanın değerlerinin ticari firmanın önerdiği kesim noktası olan 20 sınırına yakın olduğu 19-19,99 IU/mL değerleri arasında tespit edilmiştir.

Tablo 13. Test sonucu negatif bulunan gruptaki anti ds DNA EIA değerlerinin dağılımları

	IU/mL	Sayı	Yüzde
1	1-4,99	0	-
2	5 – 9,99	3	15
3	10 – 1499	7	35
4	15 – 19,99	10	50
Toplam		20	100

4.4. Gruplar arasında farklılığın istatistiksel analizi

Çalışmaya alınan grupların EIA sonuçlarının ortalama değerleri arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığı tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirildi. ANOVA normal dağılımlı bir seride üç ve daha fazla bağımsız ortalama arasındaki farkın hesaplanmasında kullanılır. ANOVA tek başına üç veya daha fazla grubun aritmetik ortalamalarını kümülatif olarak karşılaştırır ve bu karşılaştırmalardan en az birisi anlamlı olduğunda ANOVA sonucu da anlamlı bulunur. Öncelikli olarak gruplardaki varyansların dağılımının homojen olup olmadığı değerlendirildi.

Test of Homogeneity of Variances

EIAsonuc

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
17,278	5	402	,000

Elde edilen sonuçta leven:17,27, p:<0,01'den küçük elde edilmesiyle varyansların dağılımının homojen olmadığı gözlendi. Bunun üzerine Tek yönlü ANOVA tablosunda tamamlayıcı testler kullanıldı bunun için spss prorgramındaki ANOVA işlem penceresinden posthoc tamamlayıcı işlemler menüsünden varyansların homojen bulunmaması nedeniyle Tamhane's T2 tekniği ile işlemi seçilerek işlem sonlandırıldı. İşlem sonrası gruplar arasındaki ortalamaların grup içerisinde anlamlı bir farklılık olup olmadığı belirlendi. H_0: Ortalamalar arasında fark yoktur. H_1: En az iki ortalama arasında anlamlı bir farklılık vardır, hipotezleri oluşturuldu. Test sonrası elde edilen gruplar arasında farklılıklar tablo 14'te gösterilmektedir. Buna göre SLE tanısı alan gruptaki hastaların EIA ortalamaları diğer gruplarla karşılaştırıldığında istatiksel olarak anlamlılık olduğu belirlendi ve H_1 hipotezi doğrulandı (p:<0,01). SLE dışındaki grupların kendi içerisinde karşılaştımaları sonucunda ise elde edilen EIA sonuçlarının ortalamaları arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. (p:>0,05)

Tablo 14. Tek yönlü ANOVA testi

ANOVA

ElAsonuc

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	582725,689	5	116545,138	8,714	,000
Within Groups	5376541,889	402	13374,482		
Total	5959267,578	407			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: ElAsonuc

Tamhane

(I) grup	(J) grup	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
SLE	bag	76,94205*	9,92397	,000	47,6512	106,2329
	RA	79,43523*	9,65381	,000	50,9137	107,9567
	metabolik	78,10068*	9,98918	,000	48,5496	107,6518
	neoplazi	78,26951*	9,96181	,000	48,4921	108,0469
	diger	78,13290*	9,75249	,000	49,3552	106,9106
bag	SLE	-76,94205*	9,92397	,000	-106,2329	-47,6512
	RA	2,49318	5,21841	1,000	-13,3930	18,3794
	metabolik	1,15863	5,81545	1,000	-16,6899	19,0072
	neoplazi	1,32746	5,76831	1,000	-18,2156	20,8706
	diger	1,19085	5,39877	1,000	-15,0093	17,3910
RA	SLE	-79,43523*	9,65381	,000	-107,9567	-50,9137
	bag	-2,49318	5,21841	1,000	-18,3794	13,3930
	metabolik	-1,33455	5,34137	1,000	-18,0604	15,3913
	neoplazi	-1,16571	5,29001	1,000	-20,3066	17,9752
	diger	-1,30233	4,88442	1,000	-16,1497	13,5450
metabolik	SLE	-78,10068*	9,98918	,000	-107,6518	-48,5496
	bag	-1,15863	5,81545	1,000	-19,0072	16,6899
	RA	1,33455	5,34137	1,000	-15,3913	18,0604
	neoplazi	,16883	5,87979	1,000	-19,9899	20,3276
	diger	,03222	5,51772	1,000	-16,9519	17,0163
neoplazi	SLE	-78,26951*	9,96181	,000	-108,0469	-48,4921
	bag	-1,32746	5,76831	1,000	-20,8706	18,2156
	RA	1,16571	5,29001	1,000	-17,9752	20,3066
	metabolik	-,16883	5,87979	1,000	-20,3276	19,9899
	diger	-,13661	5,46802	1,000	-19,1833	18,9101
diger	SLE	-78,13290*	9,75249	,000	-106,9106	-49,3552
	bag	-1,19085	5,39877	1,000	-17,3910	15,0093
	RA	1,30233	4,88442	1,000	-13,5450	16,1497
	metabolik	-,03222	5,51772	1,000	-17,0163	16,9519
	neoplazi	,13661	5,46802	1,000	-18,9101	19,1833

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

4.5. Orgentec® Anti-dsDNA EIA Testinde Eşik Değerin Belirlenmesi

Anti-ds DNA testinin en iyi eşik değerinin saptanması için istatistiksel spss programı kullanılarak (SPSS Version 21.0 for Windows).ROC analizi uygulandı. Çalışmaya alınan tüm gruplara ilişkin EIA test sonuçları IU/mL cinsinden değerleri Tablo 15'te gösterilmektedir.

Tablo 15. Çalışmaya alınan tüm gruplara ilişkin EIA test sonuçları

IU/mL değeri	Duyarlılık	1 – özgüllük
,58000	1,000	1,000
1,78000	1,000	,998
2,00500	1,000	,997
2,27500	1,000	,995
2,83000	1,000	,994
3,18500	1,000	,992
3,35000	1,000	,991
3,50500	1,000	,989
3,65500	1,000	,988
3,84000	1,000	,986
4,20500	1,000	,985
4,64000	1,000	,983
4,79500	1,000	,982
4,85500	1,000	,980
4,90500	1,000	,978
5,03000	1,000	,977
5,16000	1,000	,975
5,20000	1,000	,974
5,24000	1,000	,972
5,26500	1,000	,971
5,29500	1,000	,969
5,32000	1,000	,968
5,33500	1,000	,966
5,42000	1,000	,965
5,52500	1,000	,963
5,66500	1,000	,962
5,81000	1,000	,960
5,87000	1,000	,958
5,92000	1,000	,957
5,96000	1,000	,952
6,04000	1,000	,951
6,18000	1,000	,949
6,29000	1,000	,948
6,35500	1,000	,946
6,40500	1,000	,945
6,43000	1,000	,943
6,48500	1,000	,942
6,54500	1,000	,940
6,60500	1,000	,938
6,67500	1,000	,937
6,71000	1,000	,935
6,73000	1,000	,934
6,76000	1,000	,932
6,79000	1,000	,931
6,81500	,996	,931
6,85500	,996	,929
6,90500	,996	,928
6,93500	,996	,926
6,95000	,996	,925
6,97000	,996	,923
6,99500	,996	,922
7,02000	,996	,920
7,04500	,996	,918
7,09000	,996	,917
7,13000	,996	,915
7,14500	,996	,914
7,17500	,996	,911
7,21000	,993	,911
7,23000	,993	,909
7,24500	,993	,908
7,26000	,993	,906
7,29500	,993	,905
7,33500	,993	,903
7,37500	,993	,902
7,41000	,993	,900
7,48000	,993	,898
7,54500	,993	,897
7,56500	,993	,895
7,58500	,993	,894
7,59500	,993	,891
7,61500	,993	,889
7,64000	,993	,888
7,67500	,993	,886
7,70500	,993	,885
7,72000	,993	,883
7,73500	,993	,882
7,76000	,993	,880
7,78500	,993	,878
7,80500	,993	,877
7,84000	,993	,875
7,90000	,993	,874
7,94500	,993	,872

7,97000	,993	,871	9,09000	,989	,772
8,00000	,993	,869	9,10500	,989	,771
8,01500	,993	,863	9,12000	,989	,769
8,02500	,993	,862	9,15000	,989	,768
8,04000	,989	,862	9,18500	,989	,766
8,05500	,989	,860	9,20500	,989	,763
8,09000	,989	,858	9,24500	,989	,762
8,12500	,989	,855	9,29000	,989	,760
8,16500	,989	,854	9,31500	,989	,758
8,21000	,989	,852	9,33500	,989	,755
8,22500	,989	,849	9,35000	,989	,754
8,27000	,989	,848	9,37500	,989	,752
8,32000	,989	,846	9,39500	,989	,751
8,34000	,989	,845	9,41000	,989	,749
8,36000	,989	,843	9,42500	,989	,748
8,40000	,989	,842	9,43500	,989	,746
8,43500	,989	,835	9,45500	,989	,745
8,44500	,989	,834	9,47500	,989	,743
8,47000	,989	,832	9,48500	,989	,742
8,50500	,989	,831	9,49500	,989	,740
8,52500	,989	,829	9,52000	,989	,737
8,54000	,989	,828	9,55000	,989	,735
8,56000	,989	,826	9,56500	,989	,734
8,58500	,989	,825	9,57500	,989	,732
8,61000	,989	,823	9,58500	,989	,729
8,63500	,989	,822	9,60500	,989	,728
8,65500	,989	,817	9,63000	,989	,726
8,67000	,989	,815	9,64500	,989	,725
8,69500	,989	,814	9,65500	,989	,723
8,72500	,989	,811	9,67500	,989	,720
8,78500	,989	,809	9,69500	,989	,718
8,83500	,989	,808	9,71000	,989	,717
8,85000	,989	,806	9,73500	,989	,714
8,86500	,989	,802	9,76500	,989	,711
8,89000	,989	,798	9,78500	,989	,708
8,91500	,989	,797	9,81000	,989	,706
8,93000	,989	,795	9,83500	,989	,705
8,95000	,989	,794	9,85500	,989	,700
8,96500	,989	,791	9,88000	,989	,698
8,97500	,989	,789	9,89500	,989	,695
8,98500	,989	,788	9,91500	,989	,694
9,00500	,989	,786	9,94000	,989	,691
9,02500	,989	,782	9,97000	,989	,689
9,03500	,989	,780	10,00000	,989	,688
9,04500	,989	,778	10,01500	,989	,686
9,05500	,989	,777	10,02500	,989	,685
9,07000	,989	,775	10,03500	,985	,685

10,04500	,985	,682
10,05500	,985	,680
10,07000	,985	,677
10,09500	,985	,675
10,13000	,985	,672
10,17000	,985	,671
10,20000	,985	,669
10,21500	,985	,666
10,24500	,985	,665
10,28500	,985	,663
10,31500	,985	,660
10,33500	,985	,657
10,35000	,985	,655
10,38000	,982	,654
10,42500	,982	,652
10,46000	,982	,651
10,48000	,982	,649
10,51000	,982	,648
10,53500	,982	,646
10,55500	,982	,643
10,57500	,982	,642
10,62500	,982	,640
10,68000	,982	,638
10,72000	,982	,634
10,75500	,982	,632
10,78000	,982	,629
10,80500	,978	,629
10,82000	,978	,628
10,84000	,978	,626
10,85500	,978	,625
10,86500	,978	,623
10,87500	,978	,622
10,88500	,978	,620
10,89500	,978	,618
10,91500	,978	,615
10,95500	,978	,614
10,99500	,978	,609
11,01500	,978	,608
11,03500	,978	,606
11,05500	,978	,605
11,06500	,978	,603
11,08000	,978	,602
11,10000	,978	,600
11,12000	,978	,598
11,15000	,978	,597
11,18000	,978	,595
11,19500	,978	,594
11,22500	,978	,592
11,26000	,978	,589
11,29000	,978	,588
11,32000	,978	,585
11,34500	,978	,583
11,36500	,978	,580
11,37500	,978	,578
11,38500	,978	,577
11,40500	,978	,575
11,42500	,978	,572
11,44000	,978	,569
11,46500	,978	,568
11,49500	,978	,566
11,53000	,978	,565
11,55500	,978	,563
11,57000	,978	,560
11,58500	,978	,558
11,60500	,978	,555
11,63000	,978	,552
11,65000	,978	,551
11,66500	,978	,549
11,67500	,978	,548
11,69500	,978	,546
11,72500	,978	,545
11,74500	,978	,543
11,77000	,978	,540
11,79500	,978	,538
11,85500	,978	,537
11,91500	,978	,535
11,92500	,978	,534
11,96000	,978	,532
11,99500	,978	,531
12,00500	,978	,529
12,01500	,978	,528
12,03500	,978	,525
12,05500	,978	,523
12,08000	,978	,522
12,12500	,978	,520
12,15500	,978	,518
12,16500	,978	,517
12,17500	,978	,515
12,19500	,978	,514
12,22500	,978	,512
12,26000	,978	,511
12,29000	,978	,508
12,31500	,978	,505
12,35000	,978	,502

12,37500	,978	,500
12,38500	,978	,498
12,41000	,978	,497
12,43500	,978	,495
12,45500	,978	,492
12,48000	,978	,491
12,50000	,974	,491
12,53000	,974	,489
12,56500	,974	,488
12,58500	,974	,486
12,59500	,974	,483
12,62000	,974	,482
12,66000	,974	,480
12,68500	,974	,477
12,73500	,974	,475
12,82000	,971	,475
12,89000	,971	,474
12,97000	,971	,472
13,03000	,971	,471
13,04500	,971	,469
13,06500	,971	,468
13,09500	,971	,465
13,11500	,971	,463
13,13000	,971	,462
13,16000	,971	,460
13,19000	,971	,457
13,23500	,971	,455
13,28500	,971	,454
13,30500	,971	,452
13,31500	,971	,449
13,37500	,971	,448
13,46000	,971	,446
13,57000	,971	,443
13,66000	,971	,442
13,69000	,971	,438
13,73000	,971	,437
13,75500	,971	,435
13,76500	,971	,434
13,81500	,971	,431
13,88500	,971	,429
13,91500	,971	,428
13,92500	,971	,426
13,95000	,967	,426
13,98500	,967	,425
14,04500	,967	,423
14,10500	,964	,423
14,12500	,964	,422
14,20000	,964	,420
14,28000	,964	,418
14,32500	,964	,417
14,39500	,964	,415
14,43500	,964	,414
14,45000	,964	,412
14,47000	,964	,411
14,50500	,964	,408
14,55000	,964	,403
14,59000	,964	,400
14,64000	,964	,398
14,81500	,964	,397
14,97000	,964	,395
14,98500	,964	,394
14,99500	,964	,392
15,02000	,964	,391
15,07500	,964	,386
15,14500	,964	,385
15,23500	,964	,383
15,29500	,964	,382
15,40000	,964	,380
15,54000	,964	,378
15,60000	,964	,377
15,65500	,964	,375
15,69500	,964	,374
15,70500	,964	,372
15,74500	,964	,371
15,81000	,964	,369
15,86000	,960	,369
15,97500	,960	,368
16,08500	,960	,365
16,10500	,960	,363
16,12500	,960	,362
16,15000	,960	,360
16,22000	,960	,358
16,36000	,960	,357
16,44500	,960	,355
16,45500	,960	,354
16,48000	,960	,352
16,54500	,960	,351
16,66000	,960	,349
16,73500	,960	,348
16,77000	,960	,346
16,83500	,960	,345
16,88500	,960	,343
16,91000	,960	,342
16,94000	,960	,340

16,99000	,960	,337
17,06000	,960	,335
17,11000	,960	,334
17,13500	,960	,331
17,16500	,960	,329
17,23000	,956	,328
17,30000	,956	,326
17,42500	,953	,326
17,59500	,953	,325
17,67000	,953	,323
17,68500	,953	,322
17,72000	,953	,320
17,78000	,953	,318
17,84000	,953	,317
17,90500	,949	,315
17,96000	,949	,314
17,99000	,949	,312
18,03000	,949	,311
18,08500	,949	,309
18,13000	,949	,306
18,17000	,949	,305
18,23000	,949	,303
18,32000	,949	,302
18,38000	,949	,300
18,43500	,949	,298
18,48500	,949	,297
18,52500	,945	,295
18,58000	,945	,294
18,61000	,945	,292
18,64500	,945	,291
18,67500	,945	,289
18,68500	,945	,288
18,69500	,945	,286
18,74500	,945	,285
18,79500	,945	,283
18,80500	,945	,280
18,90500	,945	,278
19,05000	,945	,275
19,12500	,945	,274
19,15500	,945	,272
19,19000	,945	,271
19,27000	,942	,271
19,33000	,942	,269
19,40500	,942	,268
19,51000	,942	,266
19,57500	,942	,265
19,64000	,938	,265
19,70000	,938	,263
19,73500	,938	,262
19,77500	,934	,262
19,81500	,931	,260
19,91500	,927	,260
20,07000	,916	,255
20,17000	,916	,254
20,20500	,912	,254
20,22000	,912	,252
20,35500	,909	,252
20,49000	,909	,251
20,50500	,909	,248
20,52500	,905	,246
20,56000	,905	,245
20,59500	,905	,243
20,62000	,905	,242
20,63500	,901	,242
20,65500	,901	,240
20,68500	,901	,238
20,74000	,901	,237
20,80000	,898	,237
20,86500	,894	,237
20,92000	,891	,237
20,94500	,891	,235
20,98000	,891	,234
21,00500	,887	,232
21,10500	,887	,231
21,24000	,887	,229
21,32000	,887	,228
21,37500	,887	,226
21,39500	,883	,226
21,40500	,883	,225
21,46000	,883	,223
21,54500	,883	,222
21,58500	,883	,218
21,64000	,883	,217
21,69500	,883	,214
21,82500	,880	,214
21,95500	,880	,212
21,98000	,872	,212
22,06000	,869	,212
22,13000	,869	,211
22,29000	,869	,209
22,46500	,865	,209
22,49500	,865	,208
22,54000	,861	,208
22,59000	,858	,208

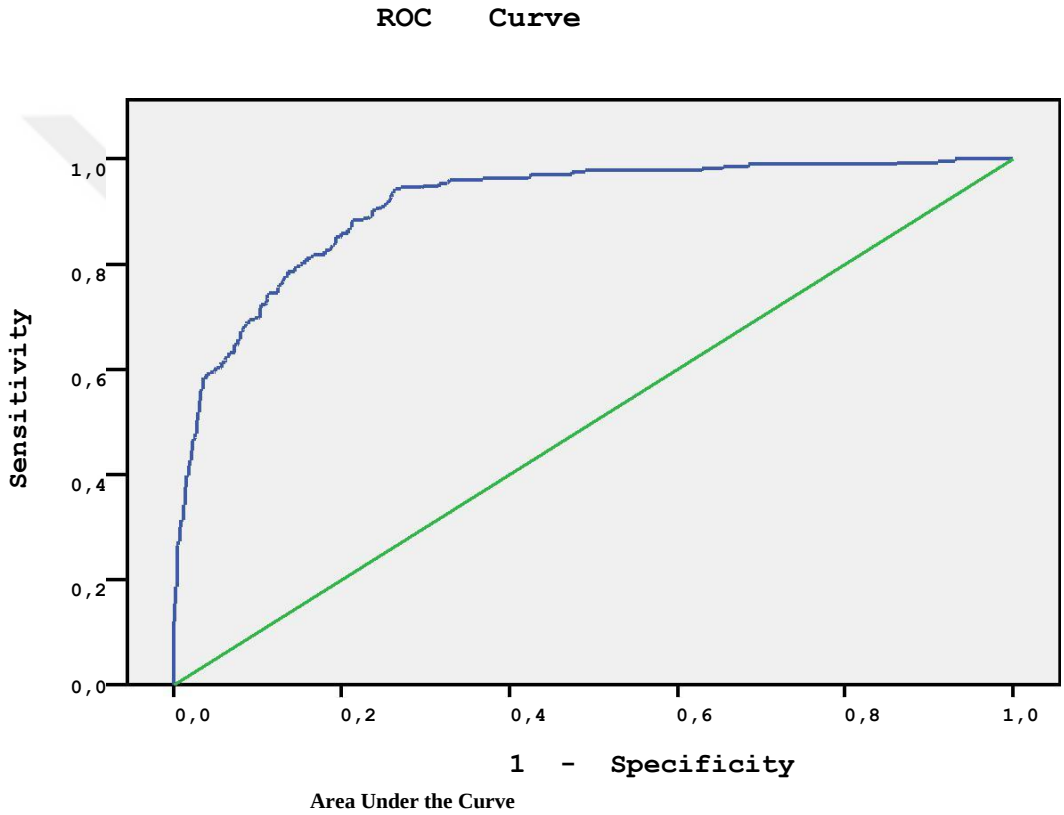
22,67000	,858	,205
22,77500	,858	,203
22,82000	,858	,202
22,99500	,858	,200
23,18500	,854	,200
23,23000	,850	,200
23,26500	,850	,198
23,29000	,850	,197
23,48500	,850	,195
23,67500	,850	,194
23,71500	,847	,194
23,79500	,839	,194
23,84500	,839	,192
23,85500	,836	,192
23,90000	,836	,191
23,97000	,836	,189
24,00500	,832	,188
24,04500	,825	,186
24,13000	,825	,185
24,18500	,825	,183
24,20500	,825	,180
24,24500	,821	,180
24,33500	,818	,180
24,42000	,818	,175
24,49500	,818	,174
24,55500	,818	,172
24,59000	,818	,169
24,69500	,818	,166
24,80000	,814	,166
24,85500	,814	,165
24,94000	,814	,163
25,02000	,810	,163
25,07000	,810	,162
25,12500	,810	,160
25,18000	,810	,158
25,23500	,807	,158
25,29000	,803	,158
25,32500	,803	,157
25,35500	,803	,155
25,50000	,803	,154
25,63000	,799	,154
25,65500	,799	,152
25,68000	,799	,151
25,69500	,796	,151
25,72000	,796	,149
25,90000	,796	,148
26,09500	,796	,146
26,15000	,792	,146
26,18000	,792	,145
26,33500	,788	,145
26,52000	,785	,145
26,58500	,785	,143
26,69500	,785	,142
26,90000	,785	,138
27,06500	,785	,137
27,13500	,781	,137
27,17000	,777	,137
27,26500	,777	,134
27,41000	,774	,134
27,49000	,774	,132
27,61000	,770	,132
27,78500	,770	,131
27,92500	,766	,131
27,99500	,763	,129
28,01500	,763	,128
28,11500	,759	,128
28,30000	,759	,126
28,44000	,755	,126
28,70500	,755	,125
28,96500	,752	,125
29,02000	,745	,125
29,10500	,745	,123
29,19000	,745	,120
29,40500	,745	,118
29,61000	,745	,117
29,63000	,745	,115
29,67000	,745	,114
29,70500	,741	,114
29,75500	,741	,112
29,90000	,734	,112
30,04500	,730	,111
30,14500	,726	,111
30,23000	,723	,109
30,29000	,723	,108
30,38500	,723	,106
30,45500	,723	,105
30,52500	,719	,105
30,60000	,715	,105
30,72000	,715	,103
30,90000	,712	,103
30,99000	,708	,103
31,04000	,704	,103
31,11500	,701	,103
31,17000	,697	,103

31,30000	,697	,102	37,92000	,609	,057
31,49500	,697	,100	38,16500	,606	,057
31,57800	,697	,098	38,44000	,602	,057
31,58800	,697	,097	38,49000	,602	,055
31,69000	,693	,097	38,59500	,602	,054
31,86500	,693	,095	38,75500	,602	,052
32,06500	,693	,094	38,82500	,602	,051
32,21000	,693	,092	38,91500	,599	,049
32,34500	,693	,091	39,19000	,595	,049
32,48000	,690	,091	39,64500	,595	,048
32,51000	,690	,089	40,25500	,595	,046
32,52500	,690	,088	40,75000	,595	,045
32,55500	,686	,088	40,91500	,595	,043
32,60500	,686	,086	41,02500	,591	,043
32,64500	,682	,086	41,21000	,591	,042
32,68000	,682	,085	41,35000	,591	,040
32,70500	,679	,085	41,44500	,588	,040
32,71500	,679	,083	41,64500	,584	,040
32,86000	,675	,083	41,82000	,584	,038
33,04000	,672	,082	41,92000	,584	,037
33,08500	,672	,080	42,03000	,584	,035
33,15500	,668	,080	42,06500	,580	,035
33,36000	,661	,080	42,36000	,577	,035
33,55000	,657	,080	42,80500	,573	,035
33,60500	,657	,078	43,12000	,569	,035
33,68500	,657	,077	43,29500	,566	,035
33,79500	,653	,077	43,32500	,562	,035
33,91500	,646	,077	43,35500	,562	,034
34,00500	,646	,075	43,43000	,558	,032
34,12000	,646	,074	43,75500	,555	,032
34,28000	,646	,072	44,18500	,551	,032
34,66500	,642	,072	44,42500	,547	,032
35,00500	,635	,072	44,55500	,544	,032
35,03000	,631	,072	44,68000	,540	,032
35,07500	,631	,069	44,79000	,540	,031
35,14500	,631	,068	45,01500	,536	,031
35,29500	,631	,066	45,63500	,533	,031
35,46500	,624	,066	46,36000	,529	,031
35,54000	,624	,065	46,71000	,522	,031
35,61000	,624	,063	46,81000	,518	,031
35,93500	,620	,063	47,04000	,518	,029
36,21000	,620	,062	47,43500	,515	,029
36,36500	,617	,062	47,86500	,511	,029
36,64500	,613	,062	48,17500	,507	,029
36,94000	,613	,060	48,31500	,504	,029
37,45000	,613	,058	48,41000	,504	,028
37,85500	,613	,057	48,83000	,500	,028

49,38500	,496	,028
49,69500	,493	,028
49,96000	,485	,028
50,17500	,482	,028
50,39500	,478	,028
50,71500	,478	,026
50,91000	,474	,026
51,01000	,471	,026
51,62000	,467	,025
52,70000	,464	,025
53,61500	,464	,023
54,85500	,460	,023
55,87000	,453	,023
56,20000	,445	,023
57,05000	,445	,022
57,85000	,438	,022
58,26500	,434	,022
58,74500	,427	,022
59,65500	,427	,020
60,82500	,423	,020
61,70500	,420	,020
62,39000	,416	,020
63,11000	,416	,018
63,61500	,412	,018
63,87500	,409	,018
64,11500	,405	,018
64,21000	,401	,018
64,29000	,398	,018
65,17500	,398	,017
66,37000	,398	,015
67,28000	,394	,015
67,94000	,391	,015
68,07500	,387	,015
68,31000	,383	,015
68,54500	,380	,015
68,73000	,376	,015
69,26500	,376	,014
70,16500	,372	,014
71,44000	,369	,014
72,81500	,365	,014
73,42500	,361	,014
73,71500	,358	,014
74,03000	,354	,014
74,18500	,350	,014
74,64500	,347	,014
75,58500	,343	,014
76,68500	,343	,012
78,15000	,336	,012
79,17500	,332	,012
80,35000	,325	,012
82,10500	,321	,012
83,86000	,318	,012
85,14000	,314	,012
85,33500	,314	,011
87,82500	,314	,009
90,66500	,310	,009
91,87000	,307	,009
92,75000	,303	,009
93,31000	,299	,009
95,08500	,299	,008
96,68000	,296	,008
97,25500	,292	,008
99,25500	,288	,008
102,85500	,285	,008
106,62500	,281	,008
109,99000	,274	,008
112,97000	,274	,006
114,62500	,270	,006
115,05500	,266	,006
115,86000	,263	,005
116,44500	,259	,005
117,14000	,255	,005
118,01500	,252	,005
118,61500	,248	,005
119,86500	,241	,005
120,95000	,237	,005
122,89500	,234	,005
125,79000	,230	,005
127,49500	,226	,005
130,25500	,223	,005
137,21500	,219	,005
142,01000	,215	,005
143,58000	,212	,005
146,76000	,208	,005
148,81500	,204	,005
151,62000	,201	,005
154,34000	,197	,005
155,52500	,193	,005
162,33500	,190	,005
170,15500	,186	,005
173,05000	,186	,003
174,30000	,182	,003
180,37500	,179	,003
194,59500	,175	,003

204,24000	,172	,003
210,06500	,164	,003
215,38500	,161	,003
217,18000	,157	,003
218,54500	,153	,003
219,27500	,153	,002
220,66000	,150	,002
223,73500	,146	,002
226,19000	,142	,002
231,98500	,139	,002
238,78000	,135	,002
240,78500	,131	,002
243,54000	,128	,002
245,69500	,124	,002
245,73000	,120	,002
246,21000	,120	,000
246,88000	,117	,000
249,57000	,113	,000
252,74500	,109	,000
254,18500	,106	,000
255,87000	,102	,000
259,39000	,099	,000
262,38000	,095	,000
266,30500	,091	,000
272,47500	,088	,000
280,51000	,084	,000
288,56500	,080	,000
291,28000	,077	,000
295,97500	,073	,000
310,29500	,069	,000
327,39000	,066	,000
337,56500	,062	,000
340,64000	,058	,000
342,01500	,055	,000
346,23500	,051	,000
352,51000	,047	,000
360,50000	,044	,000
387,66500	,040	,000
440,86500	,036	,000
471,83500	,033	,000
496,72500	,029	,000
561,91000	,026	,000
632,28500	,018	,000
683,16500	,015	,000
714,04500	,011	,000
819,46000	,007	,000
942,31000	,004	,000
970,79000	,000	,000

Ayrıca kullanılan tanı testinin performansını değerelendirmek amacıyla farklı kesim değerlerinde testin duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer (PPD), negatif prediktif değer (NPD), pozitif test sonucu olasılık oranı "*positive likelihood ratio*" (PLHR) ve negatif test sonucu olasılık oranı "*negative likelihood ratio*" (NLHR) değerleri belirlendi. ROC analizi sonrası çizilen grafide eğrinin altında kalan alan 0,911 olarak bulundu ve bu değer "bir"e yakın bir değer olduğu için %95 güven aralığı içerisinde yöntemin tanısal yeterliliği anlamlı bulundu (p:<0,001). Şekil 11'de ROC analizi sonucu elde edilen eğri ve altındaki alan gösterilmiştir.



Area Under the Curve

Test Result Variable(s): elisa

Area	Std. Error[a]	Asymptotic Sig.[b]	Asymptotic 95% ConfidenceInterval	
			Lower Bound	Upper Bound
.911	.010	.000	.891	.932

The test result variable(s): elisa has at least one tie between the positive actual state group and the negative actual state group. Statistics may be biased.
a Under the nonparametric assumption
b Null hypothesis: true area = 0.5

Şekil 11. ROC Analizi

ROC analizi sonuçlarına göre en iyi kesim noktasına karar vermek için farklı kesim noktalarının duyarlılık ve 1-özgüllük değerleri karşılaştırıldı (Tablo 16).

Tablo 16. EIA Kesim noktalarının karşılaştırılması

EIA Kesim Değeri	**Duyarlılık %**	**Özgüllük %**
5	100	2,3
10	98,9	32
15	96	61
20	91,6	74,5
25	81	83,7
30	73	88,9
35	63,5	92,8
40	59,5	95,4
45	53,6	96,9
50	48,2	97,2

Testin kesim noktası üretici firmanın önerileri doğrultusunda ≥20 IU/mL olarak kabul edildiğinde testin duyarlılığı % 91,60, özgüllüğünün %74.50 olduğu görüldü. Karşılaştırma sonrası 20 ile 30 arası değerleri arasının uygun kesim noktaları olacağı kabul edildi. Daha sonra ≥24 IU/mL, ≥25 IU/mL ve ≥30 IU/mL tanısal kesim noktaları ayrı ayrı incelendiğinde duyarlılığın sırasıyla % 83.57, % 81.38 ve % 73.35 özgüllüklerin ise % 81.07, % 83.69 ve % 88.76 olduğu gözlendi. Dörtlü tablolar oluşturularak belirlenen kesim değerlerine göre duyarlılık, özgüllük, PPD (pozitif prediktif değer), NPD (negatif prediktif değer), PLHR (pozitif olabilirlik oranı) ve NLHR (negatif olabilirlik oranı) değerleri hesaplandı.

Kesim noktası ≥20	Hastalık VAR	Hastalık YOK	TOPLAM
Test sonucu POZİTİF	254	163	417
Test sonucu NEGATİF	20	487	507
TOPLAM	274	650	924

Duyarlılık : Gerçek pozitif/Gerçek pozitif+Yalancı negatif

Duyarlılık: 254/254+20=92,70

Özgüllük: Gerçek negatifler/Gerçek negatifler+Yalancı pozitifler

Özgüllük: 487/487+163=74,92

(+) **PPD:** Gerçek pozitifler/Gerçek pozitifler+yalancı pozitifler

(+) PPD: 254/254+163=60,91

(-) PPD: Gerçek negatifler/Gerçek negatifler+Yalancı negatifler

(-) PPD: 487/487+20=96,05

(+) **LHR:** duyarlılık/1-özgüllük

(+) LHR: 0,927/1-0,749 =3,69

(+) **LHR:** 1-duyarlılık/özgüllük

(+) LHR: 1-0,927 /0,749=0,09 olarak belirlendi.

Benzer şekilde diğer kesim noktaları dikkate alındığında her bir kesim noktası için dörtlü tablolar oluşturuldu.

Kesim noktası ≥ 24	Hastalık VAR	Hastalık YOK	TOPLAM
Test sonucu POZİTİF	229	121	350
Test sonucu NEGATİF	45	529	574
TOPLAM	274	650	924

Kesim noktası ≥ 25	Hastalık VAR	Hastalık YOK	TOPLAM
Test sonucu POZİTİF	223	104	327
Test sonucu NEGATİF	51	546	597
TOPLAM	274	650	924

Kesim noktası ≥ 30	Hastalık VAR	Hastalık YOK	TOPLAM
Test sonucu POZİTİF	201	73	274
Test sonucu NEGATİF	73	577	650
TOPLAM	274	650	924

Dörtlü tablolar sonucunda farklı kesim noktaları dikkate alındığında belirlenen duyarlılık, özgüllük, PPD, NPD, PLHR ve NLHR değerleri Tablo 17'de verilmiştir.

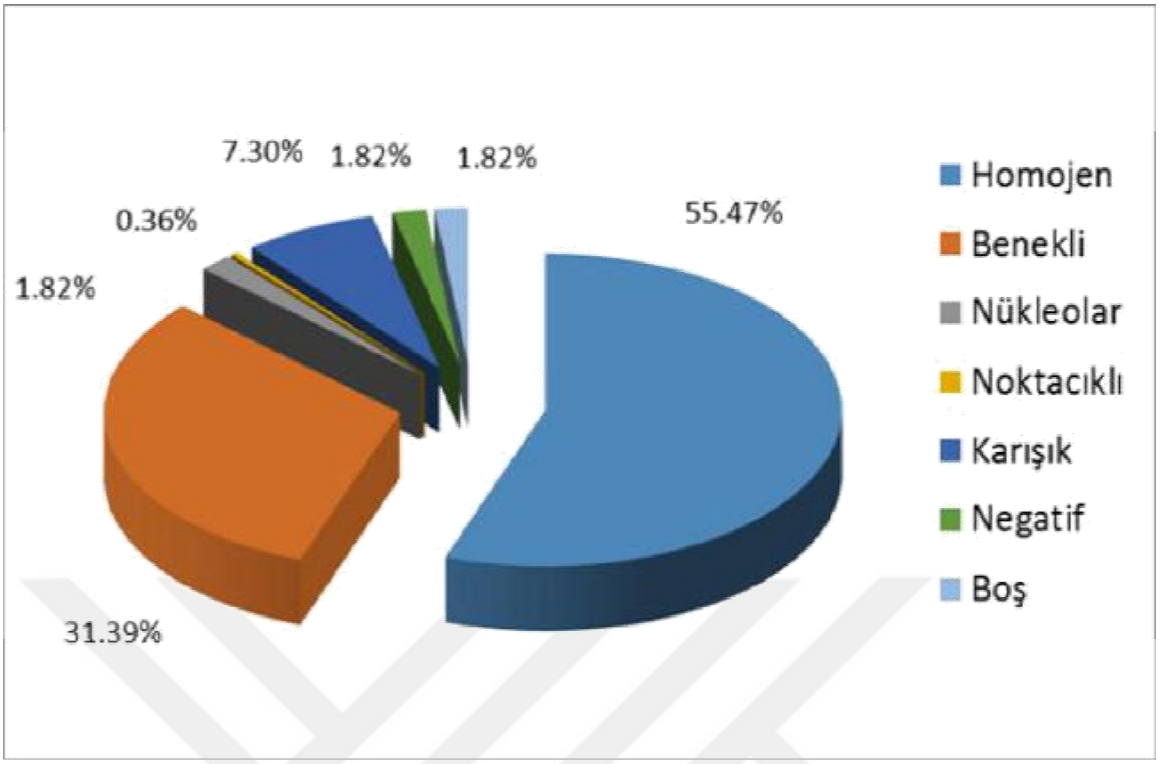
Tablo 17. Farklı kesim noktalarına göre duyarlılık, özgüllük, PPD, NPD, PLHR ve NLHR değerleri

	DUYARLILIK	**ÖZGÜLLÜK**	**PPD**	**NPD**	**PLHR**	**NLHR**
≥ 20	% 92,70	% 74,92	% 60,91	% 96,05	3,69	0,09
≥ 24	% 83,57	% 81,38	% 65,42	% 92,16	4,46	0,20
≥ 25	% 81,38	% 84,00	% 68,19	% 91,45	5,08	0,22
≥ 30	% 73,35	% 88,76	% 73,35	% 88,76	6,63	0,29

PPD: pozitif prediktif değer, NPD: negatif prediktif değer, PLHR: (pozitif olabilirlik oranı), NLHR: (negatif olabilirlik oranı)

4.6. Anti-dsDNA EIA Sonuçları ile ANA ve ENA Profilleri Arasındaki İlişki

SLE tanısı alan hasta grubu ANA patern tipleri açısından değerlendirildiğinde 152 örnekte (% 55,47) homojen patern gözlenmiştir. Bunu sırasıyla 86 örnekte (% 31,39) benekli patern, 20 örnekte (% 7,30) birden fazla paternin birlikte görüldüğü karışık patern, 5 örnekte (% 1,82) nükleolar ve bir örnekte (% 0,36) nükleolar noktacıklı patern gözlenmiştir. Çalışmaya alınan hasta grubundan 5 tanesinde (% 1,82) ANA değerlendirilmemiş iken 5 örneğin (% 1,82) ANA'sı negatif olarak belirlenmiştir. SLE hasta grubunda ANA patern dağılımı Şekil 12'de gösterilmektedir.



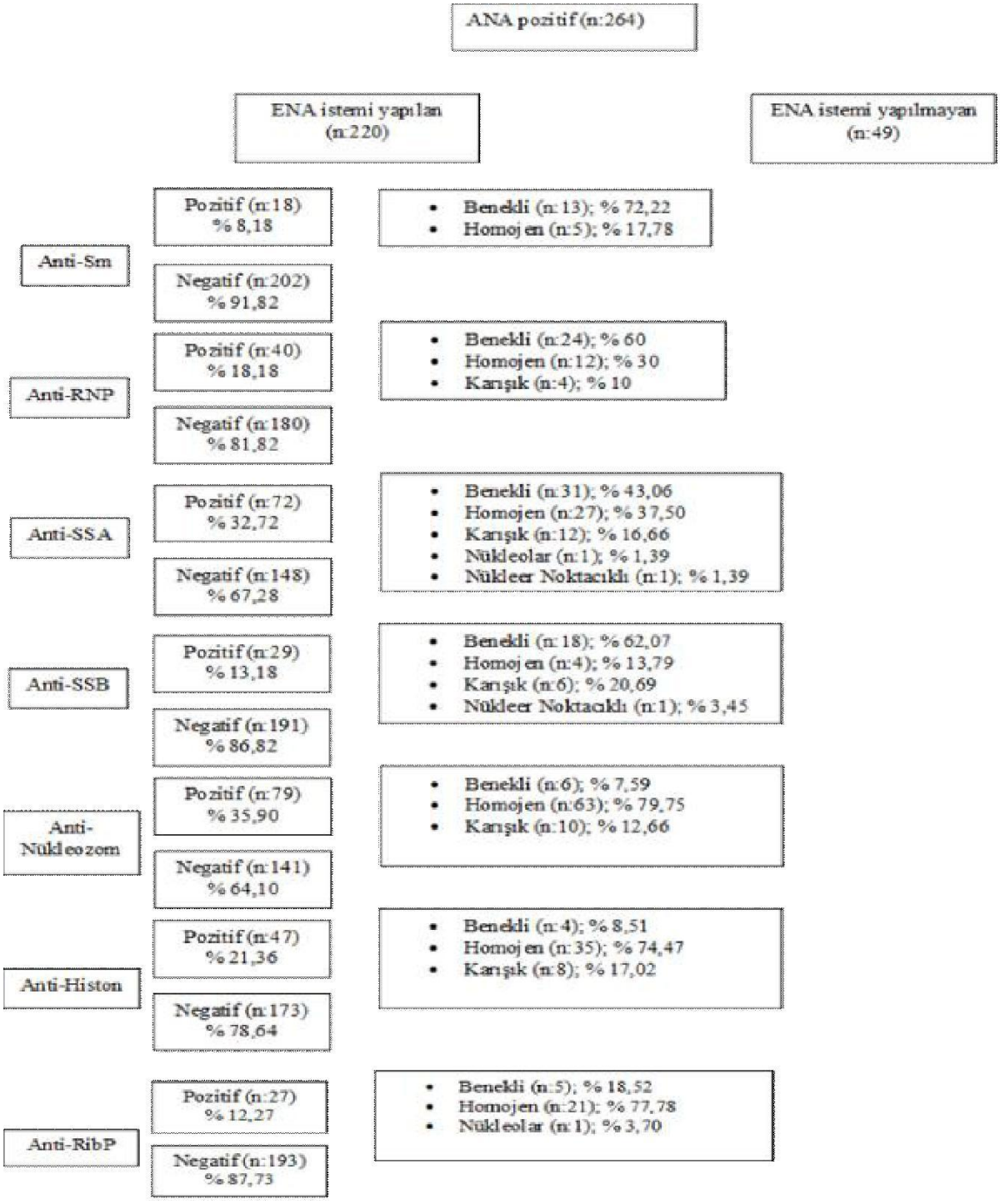
Şekil 12. SLE tanısı almış hasta grubunda ANA patern dağılımı

ANA pozitif bulunan 264 hasta örneğinde ANA değerlendirmesinde belirlenen paternlere özgül hedef antijenin belirlenmesi açısından ENA profilleri geriye dönük olarak incelendi. ENA panelinde yer alan farklı antijenlere karşı antikor yanıtları tabloda özetlenmiştir (Grafik 1). ANA pozitif 264 hastanın 49'ünde (%18,57) ENA paneli istenmemiştir. 220 örnekten (%83,33) ENA paneli istemi yapılmıştır. ENA istemi yapılan örneklerden 59'unda (%26,82) herhangi bir antijene özgü yanıt saptanmazken 161 örnekte (%73,18) en az bir antijene özgü antikor yanıtı bulunmuştur. Pozitif bulunan ENA paneli sonuçları incelendiğinde, Anti-Sm pozitifliği 18 örnekte (%8,18) saptanırken belirlenen ANA paternlerine göre bu pozitifliklerin dağılımı, 5'inde (%3.28) homojen ve 13'ünde (%15.11) benekli patern olarak saptanmıştır.

ENA panelinde yer alan RNP açısından değerlendirildiğinde, RNA pozitif bulunan 40 örneğin (%18,18) 12'sinde homojen, 24'ünde benekli patern ile birlikte RNA pozitifliği saptanmıştır.

ENA panelinde yer alan SSA tipi açısından değerlendirildiğinde, 72 pozitif örnekten 27'sinde homojen, 31'inde benekli, 12'sinde karışık patern ve birer örnekte nükleolar ve nikleer noktacıklı paternlerle birlikte pozitiflik gözlenmiştir. SSB tipi açısından

değerlendirildiğinde, 29 örnekte SSB pozitifliği saptanmış, bunun 4'ünde homojen, 18'inde benekli, 6'sında karışık ve 1'inde noktacıklı ve patern gözlenmiştir



Şekil 13. SLE grubu hastalarda ANA pozitif bulunan örneklerin ENA panelinde yer alan özgül antijenlerle bağlantısı

SLE tanısı alan hasta grubu ENA profili olan Nükleozom tipi açısından değerlendirildiğinde 79 örnekte nükleozom pozitifliği bulunmuştur. Bunların paternlere göre dağılımı ise 63'ünde homojen, 6'sında benekli ve 10'unda karışık paternlerde pozitiflik gözlenmiştir. Histon açısından değerlendirildiğinde, 47 pozitif örnekten 35'inde homojen, 4'ünde benekli ve 8'inde karışık paternle birlikte histon pozitifliği gözlenmiştir. Ribozomal P proteini açısından değerlendirildiğinde, 27 pozitif örnekten 21'inde homojen, 5'inde benekli ve 1'inde nükleolar paternle birlikteRibozomal P protein pozitifliği belirlenmiştir.

4.7. Anti-dsDNA EIA Sonuçları ile dsDNA IIF (*Crithidia luciliae, CLIFT*) Testi Arasındaki İlişki

SLE tanısı alan 274 hasta örneğinden CLIFT istemleri geriye dönük olarak tarandığında 132 örneğe (%48,17) CLIFT testi istenmemiştir. İstem yapılan 142 hasta örneğinden (%51,83) 72'si negatif, 70 tanesi pozitif olarak raporlandığı belirlendi. CLIFT test sonuçlarının SLE hasta grubundaki dağılımı Tablo 18'de gösterilmiştir.

Tablo 18. SLE tanılı grupta EIA sonuçları ile CLIFT sonuçları arasındaki ilişki

	EIA sonucu Negatif grup (n:20)		EIA sonucu Pozitif grup (n:254)	
	Sayı	%	Sayı	%
Pozitif	3	15	67	26,38
Negatif	8	40	64	25,20
Test istemi yapılmayan	9	45	123	48,42

CLIFT değerlendirmesi sonrası CLIFT sonucunun floresan şiddeti ile EIA sonuçları arasındaki ilişki incelendi. Sınıflandırmada testin üretici firmanın önerileri doğrultusunda raporlanma kriterleri dikkate alınarak dört kategori oluşturuldu. Birinci grup (+) 1/10 ile 1/32 titre arasında ışınım veren grup, sırasıyla (++) 1/32 ile 1/100 titre arasında, (+++) 1/100 ile 1/320 arasında ve son olarak 1/320 ile 1/1000 titre arasında ışınım veren grup olmak üzere semi-kantitatif değerlendirilen gruplar olışturuldu. Bu grupların EIA sonuçları arasındaki ilişki incelendi, buna ilişkin veriler Tablo 19'da gösterilmektedir.

Tablo 19. SLE tanısı alan hasta grubunda EIA sonuçları pozitif çıkan hasta örneklerinde CLIFT sonuçları arasındaki ilişki

	Sayı	**%**	**EIA ortalama**	**Ortanca**
1 (+) **1/10-1/32 titre**	28	41,79	94,45	52,14
2 (+) **1/32-1/100 titre**	18	26,86	163,89	105,75
3 (+) **1/100-1/320 titre**	19	28,36	154,78	148,38
4 (+) **1/320-1/1000 titre**	2	2,99	320,33	320,33

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sistemik Lupus Eritematozus birçok organı tutan otoimmun sistemik bağ dokusu hastalığıdır. Hastalık akut, alevlenme veya durgunluk gibi farklı klinik evrelerde kadınlarda çok daha sık olmakla birlikte her yaş döneminde görülebilir. SLE'li hastalarda en sık olarak nükleik aside karşı ve nükleik asitle ilintili protein yapılara karşı olmak üzere dolaşımda birçok otoantikor varlığı gösterilmiştir (107, 108). Bu otoantikorlar arasında dsDNA'ya karşı ortaya çıkan otoantikor yanıtı SLE'nin klinik gelişimiyle doğrudan ilişkilidir. Benzer klinik bulgularla seyreden diğer bağ dokusu hastalıklarından ayrımlanmasında anti-dsDNA antikor varlığının tanısal değeri olduğu düşünülmektedir. (2, 36, 109-111).

Anti-dsDNA düzeyinde artış anti nükleer antikor (ANA) pozitifliği ile birlikte SLE sınıflandırma kriterleri arasında belirtilmiş olmasına rağmen bu testin tanısal performansı konusunda tam bir birliktelik sağlanamamıştır. Anti-ds DNA, SLE şüpheli hastalarda ANA pozitifliğinin saptandığı her durumda istenmektedir. Anti ds-DNA antikorların, yüksek titreleri SLE için özgül olup seçilen yönteme göre SLE'li hastalarda görülme oranı %25-85 arasında değişmektedir. Buna karşın daha düşük oranda diğer bağ dokusu hastalığı olan bireylerde ve sağlıklı bireylerde de pozitif bulunabilirler (28). Daha düşük değerlerde görülen bu pozitifliğin bir nedeni olarak düşük aviditeli antikorların varlığı gösterilmiştir. Otoantikor yanıtı sadece dsDNA'ya karşı değil aynı zamanda ssDNA'ya da karşı IgM ve IgG sınıfında yanıt şeklinde görülebilmektedir. SLE patogenezinde sürekli antijenik uyarıya bağımlı artmış B hücre yanıtının bir sonucu olarak yüksek aviditeli antikor yanıtlarının görülmesi beklenen bir sonuçtur. Bu yüzden seçilecek test yöntemi yanlış pozitiflik oluşturabilecek ssDNA'yı ve düşük aviditeli antikorları saptamayan ve tekrarlanabilirliği iyi güvenilir bir test yöntemi olmalıdır.

Anti-ds DNA testi hastalığın tanısı ve hastalığın seyrinin takip edilmesi için en sık kullanılan test yöntemidir. Yüksek antikor düzeyi hastalığın aktivitesi ile yakından ilişkilidir (3). Bu yüzden anti-dsDNA antikor sadece hastalığın tanısında değil aynı zamanda hastalığın takibinde de oldukça önem taşır (2). Günümüzde anti-dsDNA, antikor düzeyini belirlemede Farr radioimmunassay, *Crithidia luciliae* immünfloresan test (CLIFT) ve enzim immunassay test yöntemleri (EIA) kullanılmaktadır. Günümüzde hastalık aktivitesi ile daha iyi korele sonuçlar verdiği bilinen test yöntemi Farr radioimmunassay yöntemi olarak gösterilmiştir (112). Ancak bu yöntem radyoaktif madde içermesi, zaman alıcı ve teknik zorlukları nedeniyle birçok laboratuvarda kullanılmamaktadır. Crithidia IIF (CLIFT) kinetoblast içerisinde yer alan doğal yapıdaki sirküler dsDNA'ya karşı

oluşan antikorları saptayantekrarlanabilirliği iyi ve teknik olarak yapılması kolay bir tanı yöntemidir. Özgüllüğünün yüksek olmasına rağmen duyarlılığı oldukça düşük bir yöntemdir. Ayrıca değerlendirmesi göreceli olarak sübjektif bir yöntem olup hastalığın dönemleriyle uyumlu olmadığı için tedavi takibinde kullanılamaz. Kantitatif değer vermesi açısından günümüzde anti-ds DNA tespitinde en sık kullanılan yöntem EIA yöntemidir. Burada saflaştırılmış, rekombinant veya sentetik kaynaklı DNA plastik mikro plak yüzeyine kaplanarak antikor varlığı araştırılmaktadır. Ticari olarak farklı antijenik içerikleri bulunan tanı kitleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Testler arasında farklılıklar gözlenmektedir. Bu farklılıkların bir nedeni kullanılan antijenin kaynağı ile ilişki olduğu gibi antijen kaplama işlemi sırasındaki işlemlerden de kaynaklanabilmektedir (35, 113, 114). Örneğin plaklara dsDNA eklenmeden önce plakların L-lizin ile ön işleme alınması nonspesifik bağlanmaları arttırdığı ve testin duyarlılığı üzerinde doğrudan etkili olduğu gösterilmiştir (35). Farr radyoimmunassay ve CLIFT gibi her iki yöntemde EIA ile karşılaştırıldığında duyarlılıklarının daha düşük olduğu genel olarak kabul edilmektedir. EIA temelli testlerin tarama amaçlı olarak kullanılması önerilmektedir (4, 5). Otoimmun bağ hastalıklarının tanısal yaklaşımında ANA pozitifliği önemlidir. Duyarlılığı düşük olmakla birlikte özgüllüğü yüksek bir tanı yöntemi olan ANA' da test sonucu pozitif bulunduğunda anti-ds DNA ve ekstrakte edilmiş nükleer antijen paneli (ENA) istenmelidir. Anti-ds DNA EIA yöntemiyle pozitif olarak belirlendiğinde bu sonucun Farr radyoimmunoassay veya CLIFT ile doğrulanması önerilmektedir (4). EIA gibi daha duyarlı bir test kullanmanın avantaj ve dezavantajları söz konusudur. Hastalığın erken dönemlerinde ortaya çıkabilecek antikor değişikliklerini yakalamak mümkün iken diğer taraftan yalancı pozitif sonuçlar tanısal yaklaşımda sorun oluşturabilir.

Anti-dsDNA IgG tespitinde kullanılan ticari kitler incelendiklerinde karar sınır değerlerinin (cut-off) birbirlerinden farklı oldukları görülmektedir (6, 7). Tanısal testlerin kullanımında ortaya çıkan hatalı kullanımlar ve laboratuvarlar arasında ortaya çıkan uyumsuzluklar otoantikor testlerin standardize edilmesi gerekliliğini ortaya koymuştur. Bu amaçla, Uluslararası Otoimmünite Standardizasyon Komitesi (The International Union of Immunologic Societies/WorldHealth Organization/Arthritis Foundation/Centers for Disease Control and Prevention (IUIS/WHO/AF/CDC) Committee) ANA, ds DNA ve ENA testlerinin standardizasyonu için üç farklı kategoriyi içeren bazı öneriler yayınlamışlardır. Anti-ds DNA test için ortaya koyulan önerilerden birisi de her laboratuvarın ROC analizi ile kendi referans

cut-off değerini belirlemesidir. Bu araştırmada SLE tanısı ve tedavi takibinde kullanılan EIA temelli anti-dsDNA test kitinin SLE tanısında kullanılacak optimal cut-off değerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Dokuz Eylül Üniversitesi Merkez Laboratuvarı İmmunoloji birimine Aralık 2014- Eylül 2015 tarihleri arasında başvuran anti-dsDNA EIA istemi yapılan klinik olarak SLE tanısı almış 274 hasta, diğer otoimmun hastalık tanıları ile gönderilen 627 hasta ve 23 sağlıklı kan donörleri olmak üzere toplam 924 serum örneğinin sonuçları karşılaştırıldı. İncelenen örneklerin %77.70'ini kadınlar %22.29'unu erkekler oluşturmaktaydı. Her iki grubun yaş ortalamaları birbirine yakın olduğu belirlendi. SLE tanısı almış hasta grubunun %91.97'si kadınlar, %8.03'ünü erkekler oluşturmaktaydı ve her iki cinsiyetin yaş ortalamaları 39 olarak belirlendi. Kadınlarda yaş aralığı minimum 12 ile maksimum 80 arasında değişirken, erkeklerde bu aralık minimum 7 ile maksimum 62 arasında dağılmaktadır. SLE görülme sıklığının kadınlarda daha sık görülmesi beklenen bir durumdur. SLE her yaş grubunda ortaya çıkabilse de en sık 13-40 yaşlarında görülür. Hastaların çoğu kadın olup kadın/erkek oranı 9/1'dir (110). Hastalığın görülme sıklığı ülkede ülkeye farklılık gösterse dahi prevalans 100.000 kişide 4 -250 arasında değişmektedir. Demografik verilerde de kadın/erkek oranı yaklaşık 9/1 oranında belirlenmiştir. Çalışmada karşılaştırılması yapılan gruplar içerisinde sağlıklı kan donörleri ve diğer hastalıklar nedeniyle başvuran grup dışında kadın hasta sayısının erkeklere oranla daha yüksek olduğu görülmektedir. Sağlıklı kan bağışçılarına ait serum örnekleri Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Kan Merkezinden temin edilmiştir. Kan merkezine bağış yapma yaşı minimum 18 maksimum 60 olması ve başvuran bireylerin %95'ini erkekler oluşturması nedeniyle bu grupta SLE tanısı alan grubu birebir yansıtacak cins ve yaş grubu oluşturulamadı. Asya populasyonundan oluşan kan bağışçılarında yapılan bir çalışmada ANA pozitifliği % 8.5 olarak belirlenirken hiçbir örnekte anti-ds DNA pozitifliği belirlenmemiştir (115). Bizim çalışmamızda ise sadece bir örnekte düşük düzeyde sınır değere yakın pozitiflik bulunmuştur bu örnek CLIFT testi ile doğrulanamamıştır.

Aralık 2014- Eylül 2015 döneminde anti-ds DNA istemi yapılmış toplam 924 serum örneği Orgentec® anti-dsDNA EIA kiti ile test edildiğinde % 45.13'ünde üretici firmanın belirlediği tanısal eşik değerin üzerinde (≥ 20 IU/mL) pozitiflik tespit edilmiştir. SLE tanısı alan 274 örneğin 254'ü (% 93.04) anti-ds DNA EIA test sonucu pozitif bulunurken 20'si (%7.33) negatif olarak belirlenmiştir. Bu grupta elde edilen EIA sonuçlarının ortalaması

113.04 IU/mL olarak tespit edilmiş olup diğer gruplarda elde edilen EIA değerlerinin ortalamalarıyla karşılaştırıldığında istatiksel olarak belirgin bir farklılık gözlenmektedir.

Pozitif olarak elde edilen değerlerin en düşük 20.07 IU/mL ile en yüksek 970.79 IU/mL arasında dağılım göstermektedir. Bu dağılıma bakıldığında en çok elde edilen değerlerin % 43.79 oranında kümülatif olarak 20 ile 49.99 IU/mL arasındaki grup içerisinde dağıldığı belirlenmiştir. Anti-ds DNA değeriyle hastalığın dönemleri arasında bir ilişki olup olmadığı araştırılmış ve genel bir kanı olarak hastalığın aktif ve alevlenme dönemlerinde daha yüksek değerleri ile uyumlu olduğu belirtilmiştir.

Barr ve arkadaşlarının SLE hastalık aktivitesi ile anti ds DNA arasındaki ilişki incelendiğinde ani yüksek EIA değerinde yükselişin hastalığın alevlenme döneminin bir belirleyicisi olabileceği öne sürülmüştür (116). Martin J. arkadaşları kronik aktif, alevlenme ve gerilemeyle seyreden ve sessiz seyirli olmak üzere üç farklı klinik durum ile anti-ds DNA ilişkisi incelendiğinde yüksek anti-ds DNA titrelerinin hastalığın aktif dönemiyle ilişkili olduğu belirlenmiştir (109) . Anti-ds DNA antikor düzeyi ile hastalık aktivitesi arasında doğrusal bir ilişki olduğunu belirten çalışmalar olduğu kadar klinik durum ile EIA düzeyi arasında bir ilişki olmadığını belirten yayınlar da mevcuttur (117).

Hussain ve arkadaşları Lupus 2002'de yayınladıkları makalede EIA değerleriyle hastalık aktivitesi arasında doğrusal bir ilişki olmadığını EIA değerinin niceliğinden çok takip edilen hastalarda ani EIA değerlerinin hastalığın aktifleşmesi ile ilişkili olabileceğini ve yüksek EIA değerlerin hastalığın gelişimini gösterebilecek bir belirteç olarak kullanılabileceğini öne sürdüler (100). Çalışmamızda hastalığın klinik evresi ile ilişki araştırılmamıştır. Çalışmadaki amacımız anti-ds DNA düzeyi ile hastalığın evresi arasında bir ilişki belirlemekten çok serolojik olarak pozitif bulunan örneklerdeki EIA değerlerinin klinik olarak karışabileceği diğer hastalık grupları arasında bir fark olup olmadığının incelenmesi ve tanısal karar verme eşiğinin değiştirilmesiyle testin özgüllüğünün arttırılmasıdır. Buna göre SLE tanısı alan gruptaki hastaların EIA ortalamaları diğer gruplarla karşılaştırıldığında istatiksel olarak anlamlılık olduğu belirlendi ($p:<0,01$). SLE dışındaki grupların kendi içerisinde karşılaştırmaları sonucunda ise elde edilen EIA sonuçlarının ortalamaları arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p: >0,05$). SLE tanısı alan gruptaki EIA değerleri incelendiğinde test sonucu negatif çıkan 20 örneğin %50'sinde ve pozitif test sonucu çıkan 274 örneğin %26,64'ünde bulunan değerler sınır değere yakın olarak belirlenmiştir.

2002 tarihinde yayınlanan otoimmun romatizmal hastalıkların tanı ve izlenmesinde otoantikor testlerin kullanımına ilişkin rehberde de belirtildiği gibi ANA pozitif bulunan hastalarda anti-dsDNA sonucu pozitif bulunduğunda bunun farklı bir test ile doğrulanması önerilmektedir. Bu amaçla IEA test istemi yapılan hastaların ANA sonuçlarıyla birlikte CLIFT test sonuçları karşılaştırıldı. Buradaki amaç EIA sonuçlarıyla CLIFT sonuçlarının bir ilişkisinin olup olmadığı ve CLIFT yönteminin özgüllüğü yüksek olması nedeniyle bir doğrulama testi olarak kullanılıp kullanılmayacağını belirlemekti. SLE tanısı alan hasta grubu ANA pozitifliği incelendiğine 5 örnekten ANA test isteminin yapılmadığı belirlendi. Bu gruptan 5 örnek (%1.82) negatif olarak belirlenirken geriye kalan 264 örnekte ANA pozitifliği belirlenmiştir. ANA patern tipleri açısından değerlendirildiğinde % 55.47 ile homojen patern belirlenirken bunu % 31.39 ile benekli patern takip etmiştir. Anti-dsDNA pozitifliği dikkate alındığında nükleik asit veya beraberindeki protein yapılara karşı otoantikor yanıtının oluşması nedeniyle genellikle homojen tipte ANA paterni beklenir. Bizde de en sık tespit edilen patern homojen patern olmuştur. Homojen patern görüldüğü durumlarda ENA profili ile tarandığında histon ve nükleozoma karşı özgül antikor yanıtının olması beklenir. Yine aynı şekilde benekli paternin görüldüğü durumda ENA panelinde Sm, RNP, SSA veya SSB'ye karşı antikor yanıtlarının görülmesi beklenir. ENA paneli ile ANA patern ilişkisi incelendiğinde 49 örnek için ENA paneli istemi yapılmamış iken ENA istemi yapılan 220 hasta örneğinde en az bir özgül antijene karşı otoantikor yanıtı saptanmıştır. Homojen patern gösteren örneklerde nükleozom pozitifliği %79.75, histon pozitifliği %74.47 olarak belirlenmiştir. İkinci sıklıkla gözlenen benekli patern belirlenen serum örneklerinde sırasıyla Anti-Sm pozitifliği %72.22, Anti-RNP pozitifliği %60, Anti-SSA %43.06 ve Anti-SSB pozitifliği %62.07 olarak belirlenmiştir. Buda ANA sonuçlarıyla ENA paneli sonuçlarının uyumlu olduğunu göstermektedir. Anti-ds DNA EIA sonuçlarıyla CLIFT sonuçları karşılaştırıldığında EIA sonucu değerlendirilen 274 hasta örneğinden 132 örnek için CLIFT test istemi yapılmamıştır. CLIFT test istemi yapılan toplam 142 serum örneğinden toplam 67 örnek sonucu (%47.18) birbirleriyle uyumsuz bulunmuştur. Sonuçları uyumsuz örneklerde 3 serum örneğinde sonuçlar CLIFT pozitif EIA negatif iken 64 serum örneğinde sonuçlar CLIFT negatif EIA pozitif olarak belirlenmiştir. EIA test sonuçlarıyla karşılaştırıldığında CLIFT testinin duyarlılığı %51.14 seçiciliği ise %72.72 olarak belirlenmiştir. CLIFT test duyarlılığının EIA test duyarlılığına göre düşük olduğu birçok çalışmada ortaya konulmuştur (3, 112, 113). CLIFT test sonucu floresan şiddetine göre 1(+)'den 4(+)'e kadar yarı kantitatif

olarak değerlendirilebilir. CLIFT pozitiflik şiddeti ile EIA değeri arasında bir korelasyon olup olmadığı bakıldığında EIA yüksek değerlerinin orta ve yüksek değerler aldığı serum örneklerinde CLIFT sonuçlarının da pozitif olarak belirlendiği görülmektedir. Yüksek EIA değerleri ile CLIFT pozitifliği arasında bir uyumluluk söz konusudur ancak CLIFT pozitiflik şiddeti ile EIA değerleri arasında doğrusal bir korelasyon da yoktur. CLIFT testini duyarlılığının düşük olması dikkate alındığında eğer bu hastalar CLIFT ile test edilselerdi SLE tanılı hastaların yarısı negatif sonuç alacaktı. Diğer taraftan CLIFT testi EIA pozitif çıkan örnekleri doğrulamak için kullanılsaydı yine hastaların yaklaşık yarısı doğrulanamayacaktı. Her iki senaryoda düşünüldüğünde ilk durumda gerçekte hasta olanların bir kısmı tanı alamayacaktı. İkinci senaryonun geçerli olduğu durumda ise gerçekte hasta olanlar sağlıklı olarak değerlendirilebilecekti. İki farklı test sonucunun uyumsuz olduğu durum daha çok sınır değerlere yakın örneklerde gözlenmektedir. Bunun olası nedeni CLIFT testinde native antijen kullanılırken EIA testinde rekombinant antijen kullanılmasıdır. CLIFT sonuçlarının tedaviye yanıt ile körele sonuç vermediği de düşünüldüğünde CLIFT testinin tarama amaçlı kullanılmaması klinik bulguları SLE uyumlu hasta gruplarında yüksek EIA sonuçlarının doğrulanması amacıyla kullanılabileceği kanısına varıldı.

SLE gibi bağ dokusu hastalıkların tanısında kullanılacak olan bir testten beklenen tanısal değerinin yüksek diğer bir değişle hasta olan ile olmayanı ayırt edebilme yeteneği, tedavi takibinde kullanılabilmesi ve alevlenme dönemlerini önceden öngörebilme özelliklerini taşımasıdır. Klinisyen laboratuvardan özgüllüğü yüksek, pozitif olabilirlik (+ LHR) oranı yüksek ve negatif olabilirlik (- LHR) oranı düşük niteliklere sahip bir test yöntemi ister. Böylece klinik olarak şüpheli hastaları diğerlerinden ayırt edebilmeyi hedefler. Ticari olarak farklı üretim tekniklerine, farklı hedef antijenlere ve farklı duyarlılık özelliklerine sahip tanısal bir testin bu özellikleri sağlayabilmesi için testin tanısal sınır değerinin laboratuvar tarafından tekrar belirlenmesi gerekir. Bu gereklilik Uluslararası Otoimmünite Standardizasyon Komitesi tarafından da vurgulanmaktadır ve her laboratuvarın ROC analizi ile kendi referans tanısal eşik değerini belirlemesi gerektiğini önermektedir. Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı İmmünoloji Biriminde anti-ds DNA EIA testi 2011 yılında kullanıma geçilmiştir. Testin kullanıma geçtiği dönemden sonra 2013 yılında farklı bir firmanın anti-dsDNA IgG kiti kullanılmaya başlanmıştır. Bir önceki test kitinin tanısal eşik değeri 100 U/mL iken son kullanılan kitin tanısal eşik değeri 20 IU/mL olarak farklılık göstermektedir. Bu değerinin düşük bir değer olması pozitif test sonuçlarının

sayısında bir artışa yol açmıştır. Bu araştırma ile Anti-ds DNA testinin tanı karar eşiğinde daha etkin yeni bir değerin belirlenmesi ile klinisyenlerin karar vermelerinde daha etkin rol oynayarak gereksiz test istem ve tedavi kayıplarını önlemesi hedeflenmiştir. Bu amaçla SLE tanısı alan hastalar, diğer bağ dokusu hastalıkları tanısı alan hastalar, doğrudan bağ dokusu tanısı almayan ancak benzer yakınmalar ile kliniğe başvuran farklı klinik tanıları olan hastalar ve sağlıklı kan donörlerinden olmak üzere toplam 924 hasta serum örneğine ait Anti-ds DNA EIA değerleri (IU/mL) istatiksel olarak ROC analizi ile değerlendirildi. Tıbbi testlerin performanslarının değerlendirilmesinde en önemli ve en sık kullanılan teknik ROC eğrisi yöntemidir. ROC eğrisi tanı testlerinin güvenirliği ve genel doğruluğu açısından standart yöntem haline gelmiştir. ROC eğrisi analizi kullanılarak normal sağlıklı olgular ile hastalıklı olguların ayırt edilmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır (98, 99). ROC analizi sonrası eğrinin altında kalan alan 0,911 olarak bulundu ve bu değer "bir"e yakın bir değer olduğu için %95 güven aralığı içerisinde yöntemin tanısal yeterliliği anlamlı bulundu (p:<0,001). Üretici firmanın tanısal eşik değeri dahil olmak üzere en ideal duyarlılık ve seçiciliğe ait farklı kesim noktaları duyarlılık, seçicilik pozitif ve negatif prediktif değer, pozitif ve negatif olabilirlik oranları gibi tanısal bir testin değerlendirilmesinde kullanılan belirteçler birbirleriyle karşılaştırıldı. Buna göre en yüksek duyarlılık değeri % 92.70 ile üretici firmanın önerdiği eşik değer olan ≥ 20 IU/mL değerinde bulunurken bu değer dikkate alındığında testin seçiciliği % 74,92 olarak belirlenmiştir. Literatür incelendiğine EIA tabanlı testlerin farklı duyarlılıkları ve seçicilik değerlerine sahip olduğu görülmektedir.

Haugbro ve arkadaşları ANA'sı pozitif 158 hastada SLE klinik dönemleri ile ss DNA EIA, spesifik ds DNA EIA, EliA ve CLIFT yöntemleri arasındaki ilişkiyi incelediklerinde Anti-ds DNA antikorlarının en sık olarak EIA yöntemiyle tespit edilmesine rağmen bu sonuçların Anti-ds DNA pozitifliğinin %30 oranında diğer hastalık gruplarında da saptanması nedeniyle SLE için özgül olmadığını ileri sürmüşlerdir. Bu çalışmada Anti-ds DNA EIA testinin duyarlılığını %79, seçiciliğini %73 ve pozitif prediktif değeri %50 olarak, CLIFT için ise sırasıyla %41, %99 ve %94 olarak belirlemişlerdir (57). Martin ve arkadaşları 2011 yılında yaptıkları çalışmada iki farklı anti-dsDNA kitinin (Fidis^{TM}, Farrzyme^{TM}) hastalığın aktif ve aktif olmayan dönemlerini ayırt etmedeki performanslarını karşılaştırmışlar. Çalışma sonunda üretici firmanın önerdiği eşik değerleri kullanıldığında hastalığın dönemlerini ayırt etmede etkisinin zayıf olduğunu eşik değerin yükseltilmesinin ise bunun tam tersi belirgin bir yarar sağladığını bildirmişlerdir (109). Ramjai Wichainun ve arkadaşlarının 2012 yılında

yayınladıkları yayında 100'er hasta sayısına sahip üç farklı grupta (SLE tanılı, farklı klinik tanılı hasta grubu ve sağlıklı) ANA ve anti-ds DNA testlerinin performanslarını karşılaştırdıklarında sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubunda anti-ds DNA testin seçiciliğini %100 bulurken, farklı klinik tanı almış grupta %97 olarak belirlenmiştir. SLE tanısı alan grupta ise anti-ds DNA testin duyarlılığını %37 olarak belirlemişlerdir (118). Kavanaugh A.F ve arkadaşlarının Amerikan romatoloji ve immünolojik test rehberleri komitesi ile birlikte 2000 yılında yayınladıkları bildiride SLE, sağlıklı ve diğer hastalık gruplarında anti-ds DNA antikor varlığını EIA ve CLIFT test yöntemleriyle karşılaştıran sonuçları derlediklerinde SLE'li hasta grubunda EIA yöntemin tüm çalışmalardan elde edilen ağırlıklı duyarlılığını %57.30, seçiciliğini ise %97.4 olarak bildirmişlerdir. Ağırlıklı pozitif prediktif değerinde EIA test yöntemi için oldukça yüksek bir değer olan 10 ve üzeri olarak belirtmişlerdir. Sonuç olarak EIA testinin duyarlılığının yüksek ve pozitif prediktif değerinin yüksek olması nedeniyle testin pozitif dediği değerlerin hastalığın tanısını desteklediğini öne sürmüşlerdir (3).

Çalışmada farklı eşik değerleri üretici firmanın önerdiği eşik değeri ile karşılaştırıldığında tanısal performans açısından en iyi eşik değerin 30 IU/mL olduğuna karar verildi. Bu değer sınır değer seçildiğinde testin duyarlılığı %92.70 'den %73.35'e düşerken seçiciliği ise %74.92'den %88.76'a yükselmektedir. Bir testin duyarlılığını ve seçiciliğini birleştirerek kullanılan bir performans ölçütü olan olabilirlik oranı prevalans değerinden etkilenmediği için performans ölçütleri arasında daha iyi bir öngörü sağlar. Eşik değer 20 IU/mL seçildiğinde 3.69 olan pozitif olabilirlik oranı 6.63 değerine yükselmekte yine 0.09 olan negatif olabilirlik oranı e ş ik değer 30 IU/mL seçildiğinde 0.29 olarak belirlenmektedir. Bu değerler yorumlandığında eşik değerin yükseltilmesi sonucu test sonrası pozitif bulananların diğer bir değişle gerçek hasta olanların gerçekte hastalığı olmayanlara göre yaklaşık 6.6 kat daha fazla olduğunu göstermektedir. İdeal bir testte pozitif olabilirlik oranının olabildiğince yüksek negatif olabilirlik oranının ise olabildiğince düşük olması istenir. Olabilirlik oranlarına bakıldığında e ş ik değer 30 IU/mL seçildiğinde testin kestirim gücünün üretici firmanın önerdiği e ş ik değere göre daha iyi olduğu görülmektedir. Eşik değer 20 IU/mL seçildiğinde, test sonucu pozitif çıkan ama aslında hasta olmayan yalancı pozitif hasta sayısı 163 iken eşik değer 30 IU/mL seçildiğinde bu sayı 73 olarak bulunacaktı buda 90 hastanın yanlış tanı almasını önleyecekti. Böylece bu 90 hasta ya gereksiz ek test veya tedavi uygulanmasından kaçınılmış olunacaktı. Ancak diğer bir taraftan 20 IU/mL eşik değerin duyarlılığının daha

yüksek olması nedeniyle gerçekte hasta olma olasılığı olan ama test sonucunun negatif çıktığı yalancı negatif sayısı 30 IU/mL eşik değere göre daha düşük bulunacaktı. Diğer bir değişle eşik değerin 30 IU/mL seçildiği durumda hasta olan 53 örneğe test sonucu negatif verilecekti. Bu nedenle test sonuçlarının mutlaka hastanın klinik durumuyla birlikte değerlendirilmesi uygun olacaktır. Klinik olarak SLE tanı kriterlerine uymayan ve bağ dokusu hastalığı dışındaki grup hastalar için daha yüksek bir eşik değerin seçilmesi yalancı pozitiflik oranını azaltacaktır.

SLE ile birlikte farklı hastalıklarda ve sağlıklı bireylerde anti-ds DNA EIA test yöntemi sonuçlarının klinik sürece katkısı incelendiğinde sağlıklı bireylerde testin pozitif bulunma oranı oldukça düşük olduğu için bu grupta testin sağlıklı olanları ayırt etme gücü oldukça yüksek olduğu görülmektedir ancak gerek diğer bağ dokusu hastalık tanısı alanlarda gerekse diğer klinik tanılı hastalarda da anti-ds DNA pozitifliği görülmektedir. Çalışmaya alınan toplam 924 hastada anti-ds DNA EIA pozitif örnek oranı % 45,13'dür. Bu grupta %60,91'i SLE tanısı alanlar iken diğer farklı klinik tanı alanlarda pozitiflik oranı %39,09 gibi azımsanmayacak çoğunlukta olması anti-ds DNA testinin SLE için özgül bir test olmadığını düşündürmektedir. Bu verilerle SLE tanı kriterleri arasında yer alan anti-ds DNA testinin tanısal önemi tekrar sorgulanması gerektiği kanısındayız.

Sonuç olarak laboratuvarlar kullanılan test yöntemi ve performansı konusunda klinisyeni mutlaka bilgilendirmeli ve Anti-ds DNA EIA testi için tanısal performansı arttırmak için kendi eşik değerlerini belirleyerek bunu klinisyenlerle paylaşmalıdır. Klinisyen açısından ise test istemleri hastanın klinik olarak SLE şüphesi olduğu durumda istenmelidir ve test sonuçları bunlar göz önünde bulundurularak değerlendirilmelidir. Hastalığın kliniğine göre farklı tanısal eşik değerlerin kullanılabilmesi klinik ile işbirliği içerisinde belirlenmesi gereksiz test istemlerini ve gereksiz tanı ve tedavi uygulanmasını azaltarak sağlık harcamalarının düşürülmesinde katkı sağlayacaktır.

6. KAYNAKLAR

1) Yu C, Gershwin ME, Chang C. Diagnostic criteria for systemic lupus erythematosus: A critical review. J Autoimmun 2014; (48-49): 10-13.

2) Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1997; 40: 1725.

3) Kavanaugh AF, Solomon DH, and the American College of Rheumatology ad hoc committee on immunologic testing guidelines. Guidelines for immunologic laboratory testing in the rheumatic diseases: anti-DNA antibody tests. Arthritis Rheum 2002; 47: 546–555.

4) Tozzoli R, Bizzaro N, Tonutti E, Villalta D et al. Guidelines for the laboratory use of autoantibody tests in the diagnosis and monitoring of autoimmunerheumatic diseases. Am J Clin Pathol 2002; 117: 316–324.

5) Tampoia M, Fontana A, Di Serio F, Maggiolini P et al. Application of a diagnostic algorithm in autoantibody testing: assessment of clinical effectiveness and economic efficiency. Clin Chim Acta 2003; 333: 181–183.

6) Chiaro TR, Davis KW, Wilson A, Suh-Lailam B et al. Significant differences in the analytic concordance between anti-dsDNA IgG antibodyassays for the diagnosis of systemic lupus erythematosus—Implications forinter-laboratory testing. Clinica Chimica Acta 2011; 412; 1076–1080.

7) Launay D, Schmidt J, Lepers S, Mirault T et al. Comparison of the Farrradioimmunoassay, 3 commercial enzyme immunoassays and *Crithidia luciliae* immunofluorescence test for diagnosis and activity assessment ofsystemic lupus erythematosus. Clinica Chimica Acta 2010; 411: 959–964.

8) Agmon-Levin N, Damoiseaux J, Kallenberg C, Sack U et al. International recommendations for the assessmentof autoantibodies to cellular antigens referred to asanti-nuclear antibodies. Ann Rheum Dis 2014; 73: 17–23.

9) Edworthy SM. Clinical manifestations of Systemic lupus erythematosus. In: Harris Jr ED, Budd RC, Firestein GS, Genovese MC, Sergent JS, Ruddy S, Sledge CB, editors. Kelly's Textbook of Rheumatology. 7th ed. 2005.p. 1201-1223.

10) O'Neill S, Cervera R. Systemic lupus erythematosus. Best Pract Res Clin Rheumatol 2010; 24(6): 841-855.

11) Salehi-Abari I. 2015 ACR/SLICC Revised Criteria for Diagnosis of Systemic Lupus Erythematosus. Autoimmun Dis Ther Approaches 2015; 2(1): 114.

12) Danchenko N, Satia JA, Anthony MS: Epidemiology of systemic lupus erythematosus: A comparison of world wide disease burden. Lupus 2006; 15: 308-318.

13) Öksel F. Sistemik Lupus Eritematoz. Doğanavşargil E, Gumuşdiş G, Editörler. Klinik Romatoloji El Kitabı. İzmir: İzmir Guven Kitabevi, 2003: 237-265.

14) Konice M. Sistemik Lupus Eritematozus. Karaaslan Y (Yayın Koordinatoru). Klinik Romatoloji. Ankara: MedicoGraphics, 1996: 113-131.

15) Mok CC, Lau CS. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. J Clin Pathol 2003;56:481–490.

16) Smith-Bouvier DL, Divekar AA, Sasidhar M, Du S, Tiwari- Woodruff SK, King JK, Arnold AP, Singh RR, Voskuhl RR: A role for sex chromosome complement in the female bias in autoimmune disease. J Exp Med 2008; 205: 1099-1108.

17) Mortensen ES, Rekvig OP: Nephritogenic potential of anti-DNA antibodies against necrotic nucleosomes. J Am Soc Nephrol 2009; 20(4): 696-704.

18) Lisnevskaia L, Murphy G, Isenberg D. Systemic lupus erythematosus. Lancet 2014; 384(9957): 1878-1888.

19) D'Cruz DP, Khamashta MA, Hughes GR. Systemic lupus erythematosus. Lancet 2007; 369(9561): 587-596.

https://en.wikipedia.org/wiki/Systemic_lupus_erythematosus - cite_ref-pmid19262576_40-0Kanta H,

20) Mohan C. Three checkpoints in lupus development: central tolerance in adaptive immunity, peripheral amplification by innate immunity and end-organ inflammation. Genes Immun 2009; 10(5): 390-396.

21) Lahita RG, Bradlow HL, Kunkel HG, et al. Alterations of estrogen metabolism in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1979;22:1195–8.

22) Mok CC, Lau CS. Profile of sex hormones in male patients with systemic lupus erythematosus. Lupus 2000;9:252–7.

23) Rider V, Jones S, Evans M, et al. Estrogen increases CD40 ligand expression in T cells from women with systemic lupus erythematosus. J Rheumatol 2001;28:2644–9.

24) Reich A, Marcinow K, Bialynicki-Birula R. The lupus band test in systemic lupus erythematosus patients. Ther Clin Risk Manag 2011; 7: 27–32.

25) Rahman A, Isenberg DA. Systemic lupus erythematosus. N Engl J Med 2008; 358(9): 929-939.

26) Buyon JP, Clancy RM. Maternal autoantibodies and congenital heart block: mediators, markers and therapeutic approach. Semin Arthritis Rheum 2003; 33(3): 140-154.

27) Kumar Y, Bhatia A, Minz RW. Antinuclear antibodies and their detection methods in diagnosis of connective tissue diseases: a journey revisited. Diagn Pathol 2009; 4: 1.

28) Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, Solomon DH et al. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. American College of Pathologists. Arch Pathol Lab Med 2000; 124: 71-81.

29) Tozzoli R, Bizzaro N, Tonutti E, Villalta D et al. Guidelines for the laboratory use of autoantibody tests in the diagnosis and monitoring of autoimmune rheumatic diseases. Am J Clin Pathol 2002; 117(2): 316-324.

30) Kasitanon N, Louthrenoo W, Sukitawut W, Vichainun R. Causes of death and prognostic factors in Thai patients with systemic lupus erythematosus. Asian Pac J Allergy Immunol 2002; 20: 85-91.

31) 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. J Clin Rheumatol 2009; 15: 325-329.

32) Nilsson BO, Skogh T, Ernerudh J, Johansson B et al. Antinuclear antibodies in the oldest-old women and men. J Autoimmun 2006; 27(4): 281-288.

33) Tan EM, Feltkamp TE, Smolen JS, Butcher B et al. Range of antinuclear antibodies in "healthy" individuals. Arthritis Rheum 1997; 40(9): 1601-1611.

34) Mariz HA, Sato EI, Barbosa SH, Rodrigues 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.

35) Isenberg DA, Manson JJ, Ehrenstein MR, Rahman A. Fifty years of anti-ds DNA antibodies: are we approaching journey's end? Rheumatol 2007; 46(7): 1052-1056.

36) Hahn BH. Antibodies to DNA. N Engl J Med 1998; 338: 1359.

37) Pavlovic M, Kats A, Cavallo M, Chen R et al. Pathogenic and Epiphenomenal Anti-DNA antibodies in SLE. Autoimmun Dis 2010; 462841.

38) Nossent JC, Huysen V, Smeenk RJ, Swaak AJ. Low avidity antibodies to dsDNA as a diagnostic tool. Ann Rheum Dis 1989; 48: 748.

39) Mortensen ES, Fenton KA, Rekvig OP. Lupus nephritis: the central role of nucleosomes revealed. Am J Pathol 2008; 172(2): 275–283.

40) Rouquette AM, Desgruelles C. Detection of antibodies to dsDNA: an overview of laboratory assays. Lupus 2006; 15: 403–407.

41) Su KY, Pisetsky DS. The role of extracellular DNA in autoimmunity in SLE. Scand J Immunol 2009; 70(3): 175-183.

42) Dieker JW, van der Vlag J, Berden JH. Deranged removal of apoptotic cells: its role in the genesis of lupus. Nephrol Dial Transplant 2004; 19(2): 282-285.

43) Cooper MD, Herrin BR. How did our complex immune system evolve? Nat Rev Immunol 2011; 10(1): 2–3.

44) Racanelli V, Prete M, Musaraj G, Dammacco F et al. Autoantibodies to intracellular antigens: generation and pathogenetic role. Autoimmun Rev 2011; 10(8): 503–508.

45) Ehrenstein MR, Katz DR, Griffiths MH, Papadaki L et al. Human IgG anti-DNA antibodies deposit in kidneys and induce proteinuria in SCID mice. Kidney Int 1995; 48(3): 705-711.

46) Forger F, Matthias T, Oppermann M, Becker H et al. Clinical significance of anti-dsDNA antibody isotypes: IgG/IgM ratio of anti-dsDNA antibodies as a prognostic marker for lupus nephritis. Lupus 2004; 13(1): 36–44.

47) Baudino L, Azeredo da Silveira S, Nakata M, Izui S. Molecular and cellular basis for pathogenicity of autoantibodies: lessons from murine monoclonal autoantibodies. Semin Immun 2006; 28(2): 175-184.

48) Hylkema MN, van Bruggen MC, ten Hove T, de Jong J et al. Histone-containing immune complexes are to a large extent responsible for anti-dsDNA reactivity in the Farr assay of active SLE patients. J Autoimmun 2000; 14(2): 159-168.

49) http://eol.org/pages/2915490/names

50) Jenkins DW. Pathogens, parasites and predators of medically important arthropods. Annotated list and bibliography. Bull World Health Organ 1964; 30(Suppl): 1-150.

51) Donelson JE, Gardner MJ, El-Sayed NM. More surprises from kinetoplastida. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96(6): 2579.

52) Aarden LA, de Groot ER, Feltkamp TE. Immunology of DNA. III. Crithidia luciliae, a simple substrate for the determination of anti-dsDNA with the immunofluorescence technique. Ann N Y Acad Sci 1975; 254: 505.

53) Smeenk R, van der Lelij G, Aarden L. Avidity of antibodies to dsDNA: comparison of IFT on Crithidia luciliae, Farr assay, and PEG assay. J Immunol 1982; 128: 73.

54) Crowe W, Kushner I, Clough JD, Vignos PJ Jr. Comparison of the Crithidia lucilia, millipore filter, Farr, and hemagglutination methods for detection of antibodies to DNA. Arthritis Rheum 1978; 21: 390.

55) Miller TE, Lahita RG, Zarro VJ, MacWilliam J et al. Clinical significance of anti-double-stranded DNA antibodies detected by a solid phase enzyme immunoassay. Arthritis Rheum 1981; 24: 602.

56) Aviña-Zubieta JA, Galindo-Rodriguez G, Kwan-Yeung L, Davis P et al. Clinical evaluation of various selected ELISA kits for the detection of anti-DNA antibodies. Lupus 1995; 4(5): 370.

57) Haugbro K, Nossent JC, Winkler T, Figenschau Y et al. Anti-dsDNA antibodies and disease classification in antinuclear antibody positive patients: the role of analytical diversity. Ann Rheum Dis 2004; 63(4): 386.

58) Binder SR. Autoantibody detection using multiplex technologies. Lupus 2006; 15: 412.

59) Kumar V, Krasny S, Beutner EH. Specificity of the Crithidia luciliae method for detecting anti-DNA antibodies. Effect of absorption for lipoproteins. Immunol Invest 1985; 14: 199.

60) Vlahakos DV, Foster MH, Adams S, Katz M et al. Anti-DNA antibodies form immune deposits at distinct glomerular and vascular sites. Kidney Int 1992; 41(6): 1690-1700.

61) D'Andrea DM, Coupaye-Gerard B, Kleyman TR, Foster MH et al. Lupus autoantibodies interact directly with distinct glomerular and vascular cell surface antigens. Kidney Int 1996; 49(5): 1214-1221.

62) Chubick A, Sontheimer RD, Gilliam JN, Ziff M. An appraisal of tests for native DNA antibodies in connective tissue diseases. Clinical usefulness of Crithidia luciliae assay. Ann Intern Med 1978; 89: 186.

63) Schur PH, Sandson J. Immunologic factors and clinical activity in systemic lupus erythematosus. N Engl J Med 1968; 278: 533.

64) Rothfield NF, Stollar BD. The relation of immunoglobulin class, pattern of anti-nuclear antibody, and complement-fixing antibodies to DNA in sera from patients with systemic lupus erythematosus. J Clin Invest 1967; 46: 1785.

65) Lloyd W, Schur PH. Immune complexes, complement, and anti-DNA in exacerbations of systemic lupus erythematosus (SLE). Medicine 1981; 60: 208.

66) Gladman DD, Urowitz MB, Keystone EC. Serologically active clinically quiescent systemic lupus erythematosus: a discordance between clinical and serologic features. Am J Med 1979; 66: 210.

67) Winfield JB, Brunner CM, Koffler D. Serologic studies in patients with systemic lupus erythematosus and central nervous system dysfunction. Arthritis Rheum 1978; 21: 289.

68) Ho A, Magder LS, Barr SG, Petri M. Decreases in anti-double-stranded DNA levels are associated with concurrent flares in patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 2001; 44: 2342.

69) Naparstek Y, Plotz PH. The role of autoantibodies in autoimmune disease. Annu Rev Immunol 1993; 11: 79–104.

70) Ravirajan CT, Rowse L, MacGowan JR, Isenberg DA. An analysis of clinical disease activity and nephritis-associated serum autoantibody profiles in patients with systemic lupus erythematosus: a cross-sectional study. Rheum 2001; 40(12): 1405–1412.

71) Isenberg DA, Garton M, Reichlin MW, Reichlin M. Long-term follow-up of autoantibody profiles in black female lupus patients and clinical comparison with Caucasian and Asian patients. Rheum 1997; 36(2): 229-233.

72) Okamura M, Kanayama Y, Amastu K, Negoro N et al. Significance of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies to double stranded and single stranded DNA in patients with lupus nephritis: correlation with severity of renal histology. Ann Rheum Dis 1993; 52(1): 14-20.

73) Vlahakos D, Foster MH, Ucci AA, Barrett KJ et al. Murine monoclonal anti- DNA antibodies penetrate cells, bind to nuclei, and induce glomerular proliferation and proteinuria in vivo. J Am Soc Nephrol 1992; 2(8): 1345-1354.

74) Zack DJ, Stempniak M, Wong AL, Taylor C et al. Mechanisms of cellular penetration and nuclear localization of an anti- double strand DNA autoantibody. J Immunol 1996; 157(5): 2082-2088.

75) Ruiz-Arguelles A, Perez-Romano B, Llorente L, Alarcon-Segovia D et al. Penetration of anti-DNA antibodies into immature live cells. J Autoimmun 1998; 11(5): 547-556.

76) Madaio MP, Yanase K. Cellular penetration and nuclear localization of anti-DNA antibodies: mechanisms, consequences, implications and applications. J Autoimmun 1998; 11(5): 535-538.

77) Song YC, Sun GH, Lee TP, Huang JC et al. Arginines in the CDR of antidsDNA autoantibodies facilitate cell internalization via electrostatic interactions. Eur J Immunol 2008; 38(11): 3178-3190.

78) Isenberg DA, Manson JJ, Ehrenstein MR, Rahman A. Fifty years of anti-ds DNA antibodies: are we approaching journey's end? Rheumatol 2007; 46(7): 1052-1056.

79) Renaudineau Y, Croquefer S, Jousse S, Renaudineau E et al. Association of α-actinin–binding anti–double-stranded DNA antibodies with lupus nephritis. Arthritis Rheum 2006; 54(8): 2523-2532.

80) Mason LJ, Ravirajan CT, Rahman A, Putterman C et al. Is α-actinin a target for pathogenic anti-DNA antibodies in lupus nephritis? Arthritis Rheum 2004; 50(3): 866-870.

81) Zhao Z, Weinstein E, Tuzova M, Davidson A et al. Cross-reactivity of human lupus anti-DNA antibodies with α-actinin and nephritogenic potential. Arthritis Rheum 2005; 52(2): 522-530.

82) Scherzer CR, Landwehrmeyer GB, Kerner JA, Counihan TJ et al. Expression of N-Methyl-D-Aspartate receptor subunit mRNAs in the human brain: Hippocampus and cortex. J Comp Neurol 1998; 390(1): 75–90.

83) The American College of Rheumatology nomenclature and case definitions for neuropsychiatric lupus syndromes. Arthr Rheum 1999;42(4):599-598.

84) LeDoux JE. Emotion circuits in the brain. Annu Rev Neurosci 2000; 23(1): 155-184.

85) Kowal C, DeGiorgio LA, Lee JY, Edgar MA et al. Human lupus autoantibodies against NMDA receptors mediate cognitive impairment. Proc Natl Acad Sci USA. 2006; 103(52): 19854–19859.

86) Diamond B, Huerta PT, Mina-Osorio P, Kowal C et al. Losing your nerves? Maybe it's the antibodies. Nat Rev Immunol 2009; 9(6): 449-456.

87) DeGiorgio LA. A subset of lupus anti-DNA antibodies cross-reacts with the NR2 glutamate receptor in systemic lupus erythematosus. Nat Med. 2001; 7: 1189-1193.

88) Koffler D, Schur PH, Kunkel HG. Immunological studies concerning the nephritis of systemic lupus erythematosus. J Exp Med 1967; 126(4): 607-624.

89) Bardana EJ, Harbeck RJ, Hoffman AA, Pirofsky B et al. The prognostic and therapeutic implications of DNA:anti-DNA immune complexes in systemic lupus erythematosus (SLE). Am J Med 1975; 59(4): 515-522.

90) Levinsky RJ, Cameron JS, Soothill JF. Serum immune complexes and disease activity in lupus nephritis. Lancet 1977; 309(8011): 564-567.

91) Rumore PM, Steinman CR. Endogenous circulating DNA in systemic lupus erythematosus. Occurrence as multimeric complexes bound to histone. J Clin Invest. 1990; 86(1): 69–74.

92) Amoura Z, Piette JC, Chabre H, Cacoub P et al. Circulating plasma levels of nucleosomes in patients with systemic lupus erythematosus. Correlation with serum antinucleosome antibody titers and absence of clear association with disease activity. Arthritis Rheum 1997; 40(12): 2217-2225.

93) Kramers C, Hylkema MN, van Bruggen MC, van de Lagemaat R et al. Anti-nucleosome antibodies complexed to nucleosomal antigens show anti-DNA reactivity and bind to rat glomerular basement membrane in vivo. J Clin Invest 1994; 94(2): 568-577.

94) Kalaaji M, Mortensen E, Jorgensen L, Olsen R et al. Nephritogenic lupus antibodies recognize glomerular basement membrane-associated chromatin fragments released from apoptotic intraglomerular cells. Am J Pathol 2006; 168(6): 1779-1792.

95) Barton GM, Kagan JC, Medzhitov R. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. Nat Immunol 2006; 7(1): 49–56.

96) Means TK, Latz E, Hayashi F, Murali MR et al. Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. J Clin Invest 2005; 115(2): 407–417.

97) Ronnblom L, Alm G. Systemic lupus erythematosus and the type I interferon system. Arthr Res Ther 2003; 5(2): 68–75.

98) Garcia-Romo GS, Caielli S, Vega B, Connolly J et al. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. Sci Transl Med 2011; 3(73): 73ra20.

99) Lande R, Ganguly D, Facchinetti V, Frasca L et al. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA–peptide complexes in systemic lupus erythematosus. Sci Transl Med 2011; 3(73): 73ra19.

100) Schiffer LE, Hussain N, Wang X, Huang W et al. Lowering anti-dsDNA antibodies-what's new? Lupus 2002; 11: 885-894.

101) http://www.mathworks.com/help/phased/examples/detector-performance-analysis-using-roc-curves.html?requestedDomain=www.mathworks.com&requestedDomain=www.mathworks.com

102) Altman DG, Bland JM. Diagnostic tests. 1: sensitivity and specificity. BMJ 1994; 308(6943): 1552

103) http://www.cebm.net/sppin-and-snnout/

104) Metz CE. Basic principles of ROC analysis. Semin Nucl Med 1978; 8(4): 283-298.

105) Zweig MH, Campbell G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. Clin Chem 1993; 39(4): 561-577.

106) Griner PF, Mayewski RJ, Mushlin AI, Greenland P. Selection and interpretation of diagnostic tests and prosedures. Principles and applications. Ann Intern Med; 1981: 94(4 Pt 2): 557-592.

107) Tan EM. Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. Adv Immunol 1989; 44: 93-152.

108) Yu L, Wang J, O'dell JR, Oates J et al. Anti-dsDNA antibody assay: high specificity and sensitivity with a filtration radioassay in comparison to low specificity with the standard ELISA. J Rheumatol 2007; 34(4): 734-739.

109) Martin J, Durant C, Rimbert M, Hemont C et al. Evaluation of two antibodies against double-stranded DNA assays in discriminating between active and non-active systemic lupus erytematosus: correlation between the cut-off and the specificity. Pathol Biol 2012; 60(6): 387-391.

110) Isenberg D. Anti-dsDNA antibodies: still a useful criterion for patients with systemic lupus erythematosus? Lupus 2004; 13(11): 881.885.

111) Saisoong S, Eiam-Ong S, Hanvivatvong O. Correlations between antinucleosome antibodies, C3, C4 and clinical activity in lupus patients. Clin Exp Rheumatol 2006; 24(1): 51-58.

112) Antico A, Platzgummer S, Bassetti D, Bizzaro N et al. Diagnosing systemic lupus erythematosus: new-generation immunoassays for measurement of anti-dsDNA antibodies are an effective alternative to the Farr technique and the Crithidia luciliae immunofluorescence test. Lupus 2010; 19(8): 906-912.

113) Biesen R, Dahnrich C, Rosemann A, Barkhudarova F et al. Anti-dsDNA-NcX ELISA: dsDNA-loaded nucleosomes improve diagnosis and monitoring of disease activity in systemic lupus erythematosus. Arthritis Res Ther 2011; 13(1):R26.

114) Venner AA, Ibanez D, Gladman DD, Urowitz MB et al. Comparison of three anti-dsDNA assays: performance and correlation with systemic lupus erythematosus disease activity. Clin Biochem 2013; 46(4-5): 317-320.

115) Azizah MR, Azila MN, Zulkifli MN, Norita TY. The prevalence of antinuclear, anti-dsDNA, anti-Sm and anti-RNP antibodies in a group of healthy blood donors. Asian Pac J Allergy Immunol 1996; 14(2): 125-128.

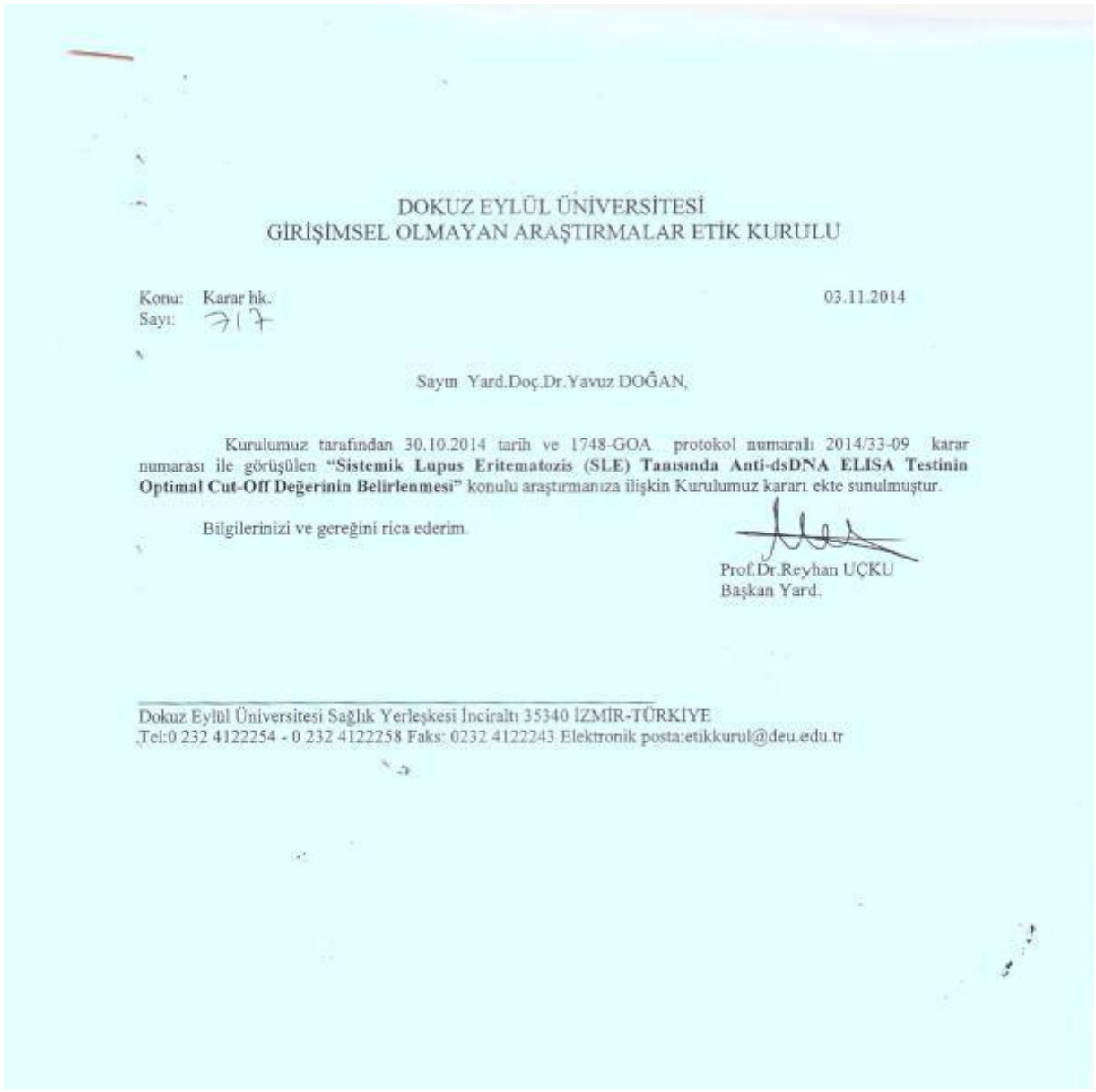
116) Barr SG, Zonana-Nacach A, Maqder LS, Petri M. Patterns of disease activity in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1999; 42(12): 2682-2688.

117) Ravirajan CT, Rowse L, MacGowan JR, Isenberg DA. An analysis of clinical disease activity and nephritis-associated serum autoantibody profiles in patients with systemic lupus erythematosus: a cross-sectional study. Rheumatology 2001; 40(12): 1405-1412.

118) Wichainun R, Kasitanon N, Wangkaew S, Hongsongkiat S et al. Sensitivity and specificity of ANA and anti-dsDNA in the diagnosis of systemic lupus erythematosus: a comparison using control sera obtained from healthy individuals and patients with multiple medical problems. Asian Pac J Allergy Immunol 2013; 31(4): 292-298.

7. EKLER

7.1. Etik Kurul Onayı



DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Konu: Karar hk.
Sayı: 717

03.11.2014

Sayın Yard.Doç.Dr.Yavuz DOĞAN,

Kurulumuz tarafından 30.10.2014 tarih ve 1748-GOA protokol numaralı 2014/33-09 karar numarası ile görüşülen **"Sistemik Lupus Eritematozis (SLE) Tanısında Anti-dsDNA ELISA Testinin Optimal Cut-Off Değerinin Belirlenmesi"** konulu araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof.Dr.Reyhan UÇKU
Başkan Yard.

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Yerleşkesi İnciraltı 35340 İZMİR-TÜRKİYE
Tel:0 232 4122254 - 0 232 4122258 Faks: 0232 4122243 Elektronik posta:etikkurul@deu.edu.tr

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
TELEFON	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
FAKS	0 232 412 22 43
E-POSTA	etikkurul@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	1748-GOA	
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐	AKADEMİK AMAÇLI ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Sistemik Lupus Eritematozis (SLE) Tanısında Anti-dsDNA ELISA Testinin Optimal Cut-Off Değerinin Belirlenmesi	
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU		
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Yard.Doç.Dr.Yavuz DOĞAN Tıbbi Mikrobiyoloji A.D	
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	-	
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	-	
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐

	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐ İngilizce ☒ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2014/33-09	Tarih: 30.10.2014
	Yard.Doç.Dr.Yavuz DOĞAN'ın sorumlusu olduğu **"Sistemik Lupus Eritematozis (SLE) Tanısında Anti-dsDNA ELISA Testinin Optimal Cut-Off Değerinin Belirlenmesi"** isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu

ETİK KURUL ÜYELERİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile İlişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E☐	H☒	
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E☐	H☒	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E☐	H☒	
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E☐	H☒	
Prof.Dr.Hüseyin BASKIN	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E☐	H☒	
Prof.Dr.Vesile ÖZTÜRK	Nöroloji	DEU Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı	Kadın	E☐	H☒	
Prof.Dr.Bilgin CÖMERT	İç Hastalıkları (Yoğun Bakım B.D)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E☐	H☒	
Prof.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E☐	H☒	
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E☐	H☒	
Prof.Dr.Nihal GELECEK	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E☐	H☒	
Prof.Dr.İşil TEKMEN	Histoloji ve Embriyoloji	DEU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E☐	H☒	
Doç.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E☐	H☒	
Doç.Dr.Şeyda Seren İNTEPELER	Hemşirelik Yönetimi	DEU Hemşirelik Fakültesi Hemşirelik Yönetimi A.D	Kadın	E☐	H☒	
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D	Erkek	E☐	H☒	
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.Ü Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E☐	H☒	

7.2. Özgeçmiş

ÖZGEÇMİŞ
ABDUH MURSHED

TC Kimlik No / Pasaport No:	99472284162
Doğum Yılı:	1985
Yazışma Adresi :	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Dekanlık Binası Kat 4 Inciraltı 35340 İzmir/Türkiye
Telefon :	0553 219 32 70
e-posta :	alkubati99@yahoo.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Yemen	Sanaa Üniversitesi	Tıp ve Sağlık Bilimleri Fakültesi	Tıbbi Laboratuvar	Lisans	2008

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Özel Dar Al Hayat Hastanesi	Yemen	Sanaa	Mikrobiyoloji, İmmünoloji, Hematoloji ve Biyokimya	Tıbbi Laboratuvar Teknisyeni	01/11/2009–01/10/2010
Genel Kan Bankası	Yemen	Sanaa		Tıbbi Laboratuvar Teknisyeni	15/01/2009–15/07/2009

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Sağlık Bilimleri