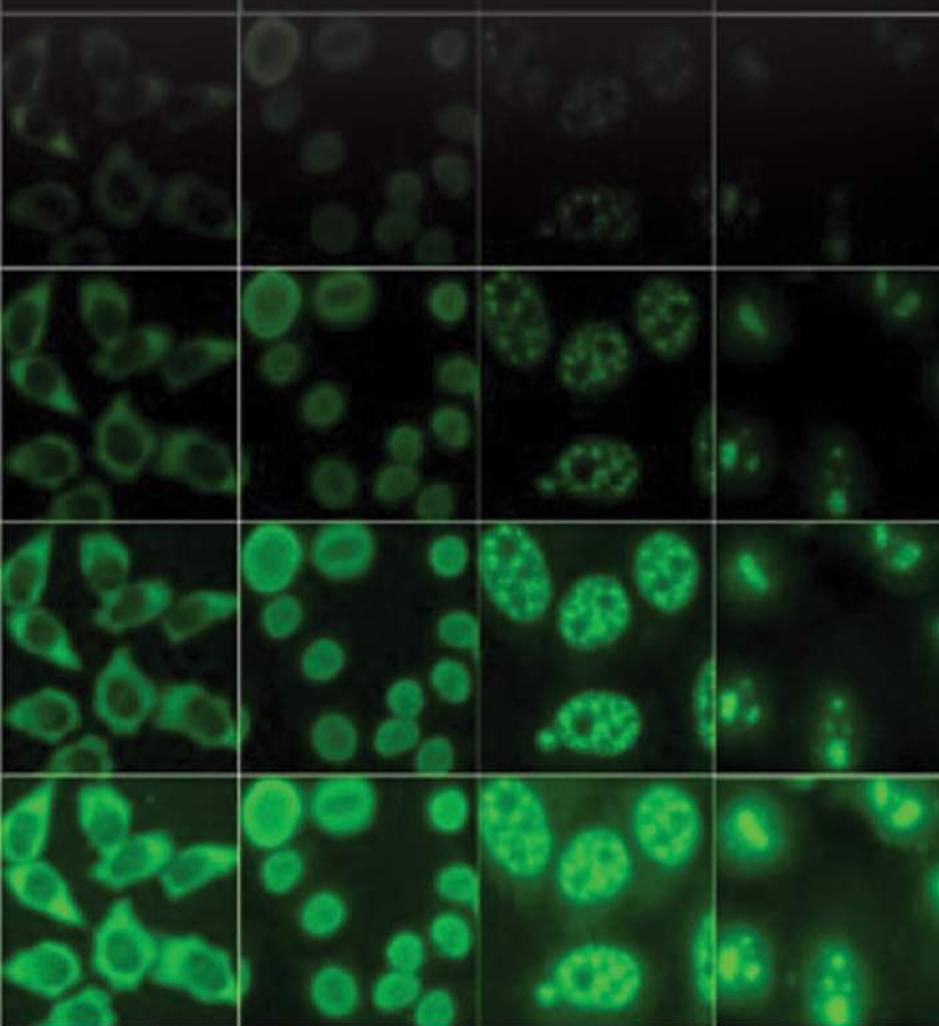


# آزمایش ANA

استانداردسازی و به روز رسانی  
آزمایشی با قدمت شصت ساله



# آزمایشگاه اریترون

نواوری برای سلامتی، نواوری برای زندگی

ژنتیک پزشکی، پاتولوژی، سیتوپاتولوژی، تشخیص پزشکی

اصفهان، خیابان شیخ صدوق شمالی،

خیابان شیخ مفید غربی

۰۲۱-۰۳۰۰۰۷۰۰۰

[www.erythron-lab.com](http://www.erythron-lab.com)



ART OF **DIAGNOSIS**

## هر تشخیص

خبرنامه تخصصی آزمایشگاه اریترون

مرکز آموزش های تخصصی اریترون

اردیبهشت ماه ۱۳۹۷ / شماره هشتم

توصیه کالج روماتولوژیست های امریکا (ACR)

Immuno fluorescence ANA test should remain the gold standard for ANA testing

## آزمایش ANA

### آزمایشی با قدمت شصت ساله

### استانداردسازی روش، پاسخ‌ها، گزارش و پروتکل‌های پیگیری

#### آنٹی‌بادی‌های ضد هسته‌ای چیست؟

آنٹی‌بادی‌های ضد هسته‌ای مستقیماً علیه آنتی‌ژن‌ها و ترکیبات هسته سلول‌های یوکاریوت ساخته می‌شوند. ANAs در بسیاری از بیماری‌های خود اینمنی نظیر PBC<sup>9</sup>, DM<sup>8</sup>, PM<sup>7</sup>, SSC<sup>6</sup>, SjS<sup>5</sup>, MCTD<sup>4</sup>, SARD<sup>3</sup>, SLE<sup>2</sup> و TBC<sup>9</sup> تولید می‌شوند.

#### طبقه‌بندی انواع ANA

در نشست ICAP<sup>10</sup>، انواع ANA بر اساس الگوی فلورسنتی که ایجاد می‌کنند به سه دسته کلی به نام‌های هسته‌ای، سیتوپلاسمی و میتوزی طبقه‌بندی شدند. هر دسته به ۵ گروه و زیر‌گروه‌های الگویی دیگری تقسیم می‌شود و هر الگو دارای یک کد (از AC-1 تا AC-28) است.



<https://www.anapatterns.org>

#### روش‌های استاندارد و به روز رسانی و تشخیص ANA

ایمونوفلورسنس غیر مستقیمه<sup>12</sup> روی سلول‌های HEp-2<sup>13</sup> به عنوان استاندارد طلایی تشخیص ANA شناخته می‌شود و انواع مختلف ANA، بسته به محل آنتی‌بادی در سلول و ویژگی‌های آنتی‌ژن، الگوهای رنگ آمیزی متفاوتی ایجاد می‌کنند.

یکی از جایگزین‌های سلول HEp-20-10، سلول HEp-2 باشد که سلول‌های در حال تقسیم و در نتیجه ساختارهای میتوزی بیشتری داشته، لذا جهت ارزیابی آنتی‌بادی علیه ساختارهای میتوزی بسیار مناسب هستند.

#### IIFT: روش استاندارد و قابل اعتماد

این تست با استفاده از آنتی‌ژن فیکس شده در یک سطح ثابت انجام می‌شود. در صورت حضور ANA، کمپلکس آنتی‌ژن-آنٹی‌بادی تشکیل می‌شود و سپس<sup>14</sup> AHG که با رنگ فلورسنس کوژنژوگه شده به کمپلکس اضافه می‌شود. در روش IIFT با استفاده از ترکیبات رنگ فلورسنس (فلوئورسین) می‌توان پس از تشکیل کمپلکس آنتی‌ژن-آنٹی‌بادی شدت رنگ و الگوی فلورسنس را با میکروسکوپ فلورسنس ارزیابی نمود.

1- ANA: Anti-nuclear antibody

2- SLE: Systemic Lupus Erythematosus

3- SARD: systemic autoimmune rheumatic diseases

4- MCTD: Mixed connective tissue disease

5- SjS: Sjogren's syndrome

6- SSC: Systemic sclerosis

7- PM: Polymyositis

8- DM: Dermatomyositis

9- PBC: Primary Biliary Cholangitis

10- ICAP: International consensus of ANA pattern

11- AC: Anti-cell

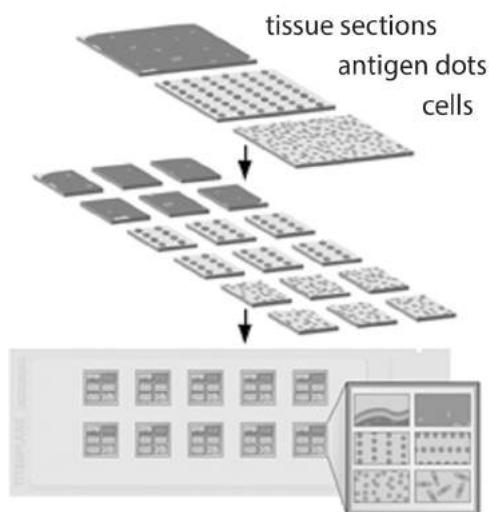
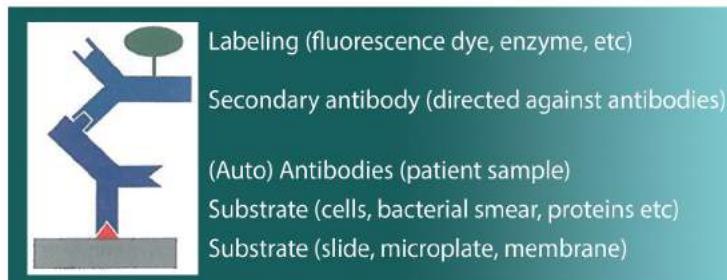
12- Indirect Immunofluorescence test (IIFT)

13- HEp-2: Human epithelial cell type 2

14- AHG: Anti human globulin

## Antibody Diagnostics

### Principle of the different techniques



### BIOCHIP Mosaics

آنتی ژن های فیکس شده روی اسلاید (سوپسترا) می تواند به اشكال مختلف باشد که اساس شکل گیری تکنولوژی های متفاوت است. یک نمونه از جدیدترین این تکنولوژی ها، تکنیک BIOCHIP Mosaics است. در این روش ترکیبی از برش های بافتی، سلول های نوترکیب، آنتی ژن های خالص و رده سلولی درادغام با تکنیک پیشرفتہ بیوچیپ به کار گرفته می شوند. این روش جهت تشخیص همزمان ۶ تا ۸ نوع اتوآنتی بادی به طور همزمان روی یک اسلاید بکار می رود.

### تکنیک ایمونوبلاتینگ:

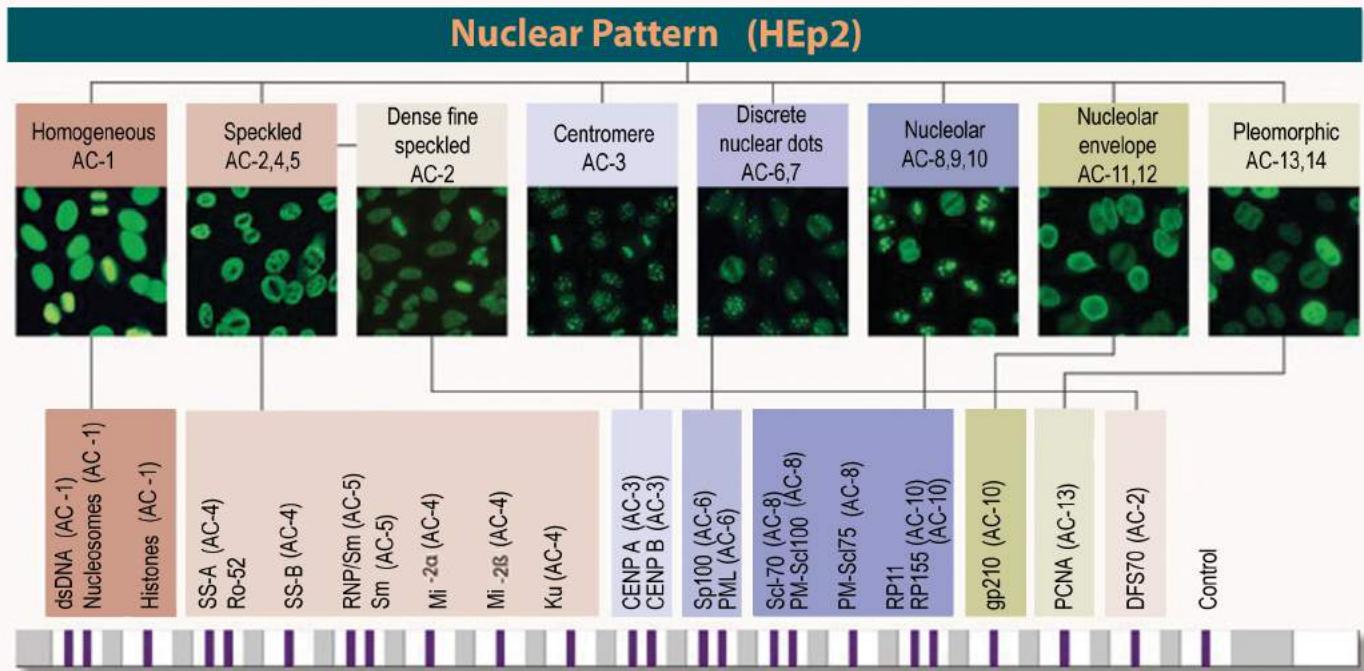
نتایج مثبت به دست آمده از غربالگری IIFT، همیشه باید با سایر تست های اختصاصی مورد تایید قرار گیرند. یک روش ایده آل برای تایید نتایج IIFT، استفاده از ایمونوبلات مرکب<sup>۱</sup> است.

### Immunoblotting

در این روش، آنتی ژن های صدرصد خالص شده ای که در بیماری های اتوایمیون، آنتی بادی بر علیه آن ها ساخته می شود روی صفحه میکروسلولی ویژه ای تثبیت می شود.

این آنتی ژن ها با عنوان پروفایل های تشخیص بیماری های اتوایمیون، عفونی، آبرزی و ... تعریف می شوند و برای هر دسته از اختلالات یا بیماری های خاص می توان به صورت نیمه کمی و کمی همزمان با دقیق و صحت، 100% آنتی بادی های مربوط را شناسایی نمود.

برای مثال Profile ANA 23 حاوی 23 آنتی ژن مختلف بوده و امکان تایید و افتراق اکثر انواع ANA در بیماری های خود اینمنی سیستمیک را فراهم می سازد.



### ANA Profile 23

### حساسیت و ویژگی انواع ANA برای بیماری های مختلف بافت همبند

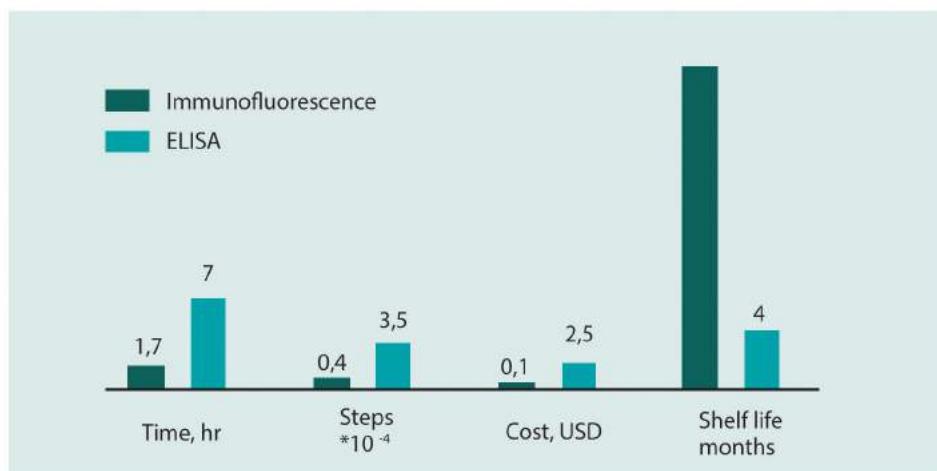
اوانتی بادی	حساسیت %	بیماری مرتبط	ویژگی %
ANA			
	SLE	93	57
	SJS	48	52
	SSC	85	54
	PM/DM	61	63
	syndrome	64	41

### Specific ANA

Anti-dsDNA	SLE	57	97
Anti-Sm	SLE	30-25	High
Anti-SS-A/Ro	سندروم لوبوس نوزادی، SjS، لوبوس پوستی تحت حاد	70-8	87
Anti-SS-B/La	سندروم لوبوس نوزادی، سندروم شوگرن، لوبوس پوستی تحت حاد	40-16	94
RNP-Anti-U3	SSC	12	96
Anticentromere	Limited cutaneous SS	65	99.9
Scl-70	SSC	20	1003
Jo-1	PM	30	95

## مقایسه روش های آزمایشگاهی ELISA-ANA و IF-ANA

طی مطالعه ای در سال 2017 مقایسه بین دو روش الیزا و ایمونوفلورسنس در بیماران مبتلا به SLE که به صورت تصادفی گزینش شده بودند انجام گرفت. محدودیت ها و مزایای هر دو روش الیزا و ایمونوفلورسنس مورد ارزیابی قرار گرفت. در نمودار زیر به ترتیب از چپ به راست زمان، تعداد مراحل هر تست، هزینه و نیمه عمر آنتی ژن برای هر دو روش نمایش داده شده است. نتایج حاکی از برتری روش ایمونوفلورسنس نسبت به روش الیزا در تمامی موارد بوده است.



### ELISA

دو نوع ELISA برای آزمایش ANA وجود دارد.

#### Generic Assay ANA

که تنها غلظت ANA را به صورت عددی و با واحد IU/mL تعیین می کند. معايب اين روش عبارت است از:

- ويژگي پايان

- حساسيت بسيار پايان

- نتایج منفي کاذب فراوان

- عدم امكان گزارش الکوي ANA و آنتي ژن هدف

#### Antigen Specific Assay (ENA-ELISA<sup>1</sup>)

در اين روش آنتي ژن هاي اختصاصي بيماري هاي اتوآيميون متفاوت مانند آنتي ژن هاي PM-1, jo-1, Scl-70, SS-B/La, SS-A/Ro, RNP, Sm پروفاييل هاي ELISA حاوي ترکيبي از يازده آنتي ژن متفاوت نيز برای تاييد نتایج IIFT, مناسب هستند. با رترین صفت اين روش ويژگي بالاي انواع ENA برای بيماري ها است.

هر چند در سال های اخیر روش های اصلاح شده ELISA معرفی شده است ولی مطالعات نشان می دهد که علاوه بر مشکلاتی که پیشتر اشاره شد، نتایج غیرقابل پیش بینی مثبت و منفی کاذب کما کان مهم ترین ضعف ارزیابی ANA با روش Generic ELISA محسوب می شود.

- آزمایش ELISA در بسیاری موارد، قادر به شناسایی آنتی بادی های ضد SS-A/Ro نمی باشد.
- آزمایش ELISA اغلب در مواردی که تیترANA در محدوده متوسط رو به بالا است ارزشمند می باشد و در عبار پایین ANA، اغلب منفی گزارش می شود(منفی کاذب).

## سوالات متداول

### چرا بیماری های خودایمن از نظر تشخیصی چالش برانگیز هستند؟

علت این امر در موارد زیر نهفته است:

- بیماران مبتلا در ابتدا علائم غیر اختصاصی نظیر خستگی، درد مفاصل و عضلات، تب و تغییر وزن نشان می دهند.
  - علائم اغلب تخفیف می یابند.
  - بیماران معمولاً به بیش از یک بیماری خودایمنی مبتلا هستند.
- طبق بررسی های به عمل آمده توسط انجمن بیماری های خودایمنی، بین ۵ - ۴۶ سال زمان و ۵ پزشک جهت تشخیص صحیح یک بیماری خود ایمن نیاز است.

### نحوه گزارش تست غربالگری در بیمار مشکوک به بیماری خودایمن چگونه است؟

در اکثر موارد یک تست ANA مثبت دلیل بر حضور بیماری خودایمن بوده و گویای تیتر و الگوی بیان آنتی ژن است. تیتر پایین (ANA ۱/۱۰۰ تا ۱/۱۰) با شواهد پیش بالینی و یا فقدان حضور بیماری همراه است. تیتر بالای ۱/۱۰۰ با حضور قطعی بیماری خودایمن همراه است. در این موارد الگوی رنگ آمیزی به تشخیص نوع بیماری کمک می کند. هرچند ارزیابی آنتی بادی اختصاصی در این مورد توصیه می شود.

باید توجه داشت تیترهای ارائه شده در نمونه گزارش روبرو مختص این آزمایشگاه می باشد.

### آیا امکان منفی شدن تست غربالگری در حالی که تست های اختصاصی مثبت باشد وجود دارد؟

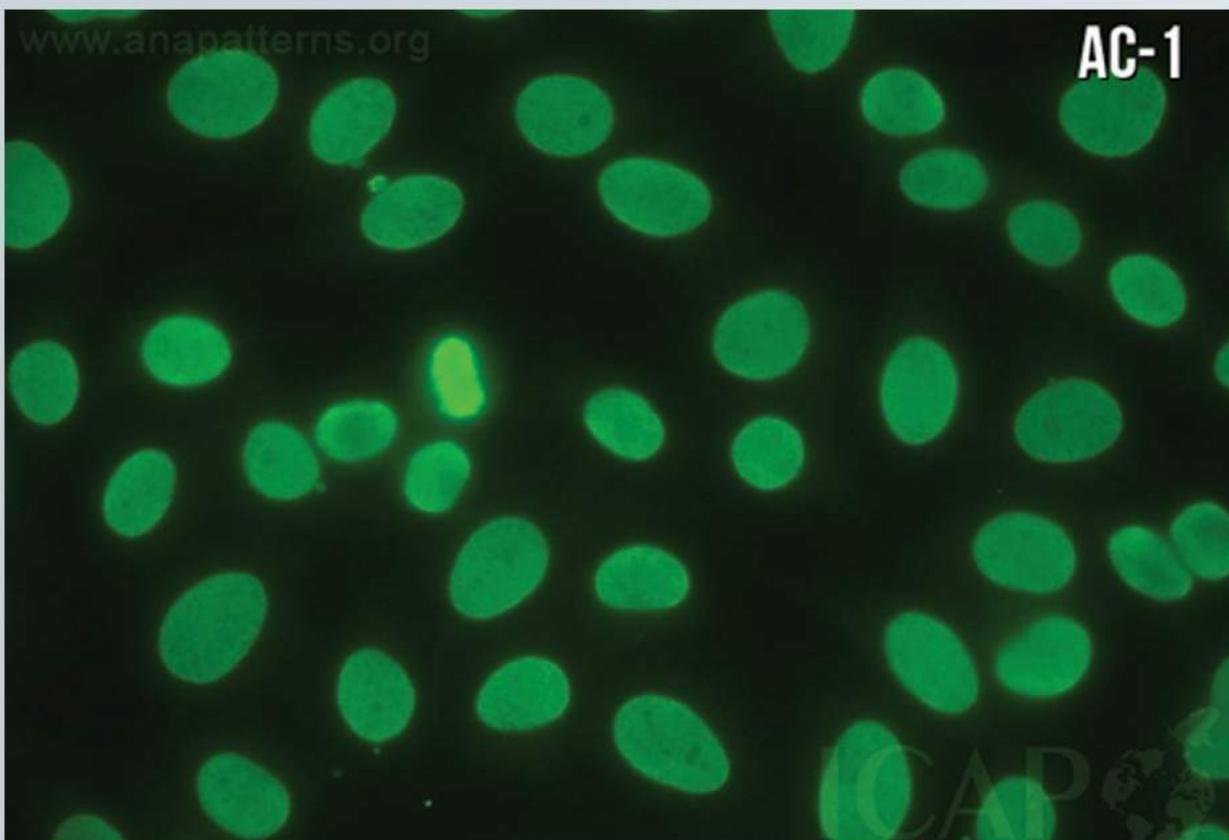
در اکثر موارد در صورت منفی شدن تست غربالگری، تست اختصاصی نیز منفی خواهد شد. البته موارد استثناء در این زمینه نیز وجود دارند. برای مثال تست غربالگری منفی و تست اختصاصی مثبت علیه سانترومها یکی از این موارد بوده است. علت این امر طی مطالعات انجام شده در آزمایشگاه رفرانس اروپا، وجود واکنش متقاطع گزارش شده است.



Patient ID:  
Patient Name:

Age:  
Date:

AC-1  
ANA pattern is Nuclear homogeneous



Titre of antibody: **Strong positive (+++) 1:3200 ;**

Synonym: Diffuse

Antigen Association: dsDNA, nucleosomes, histones

Disease Association: SLE, drug-induced lupus, juvenile idiopathic arthritis

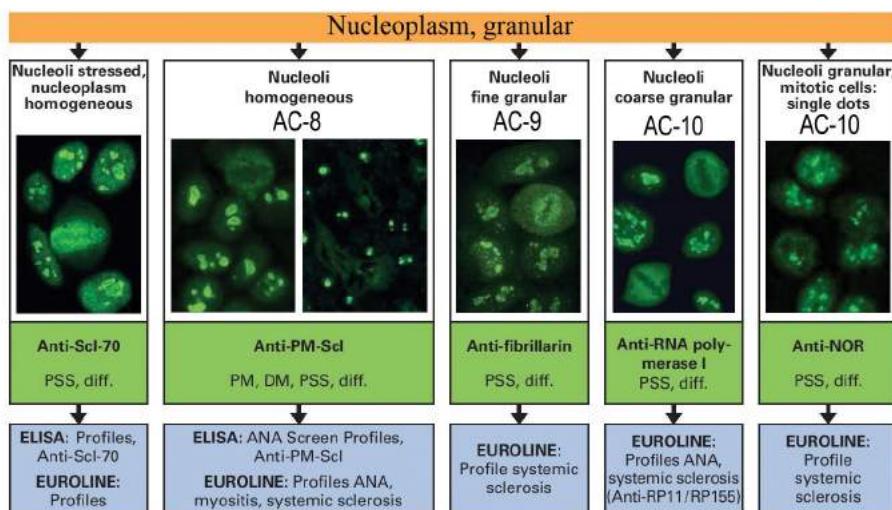
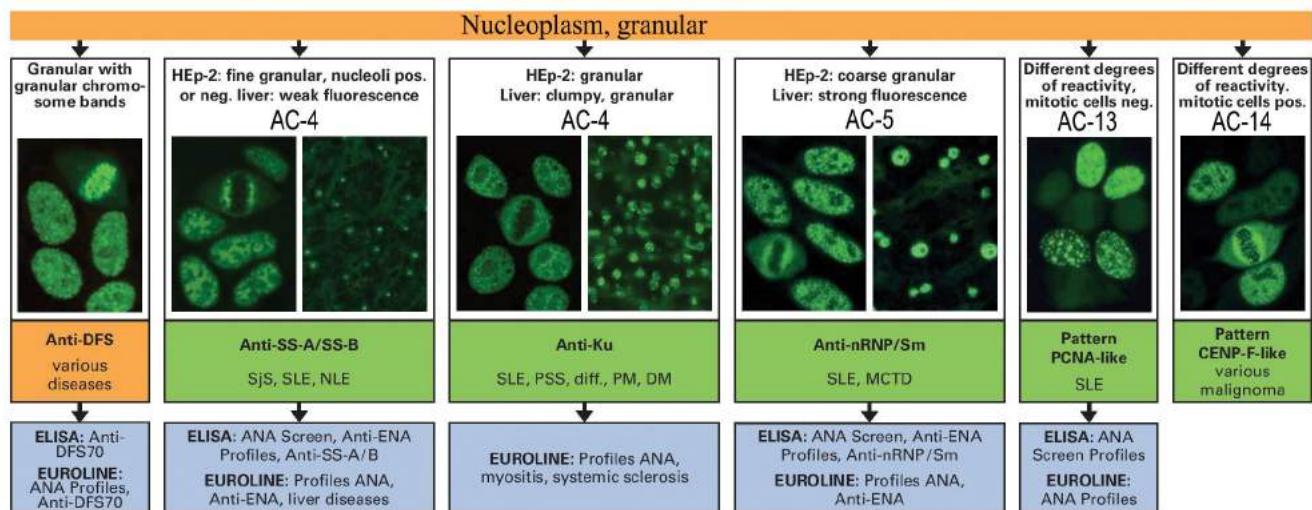
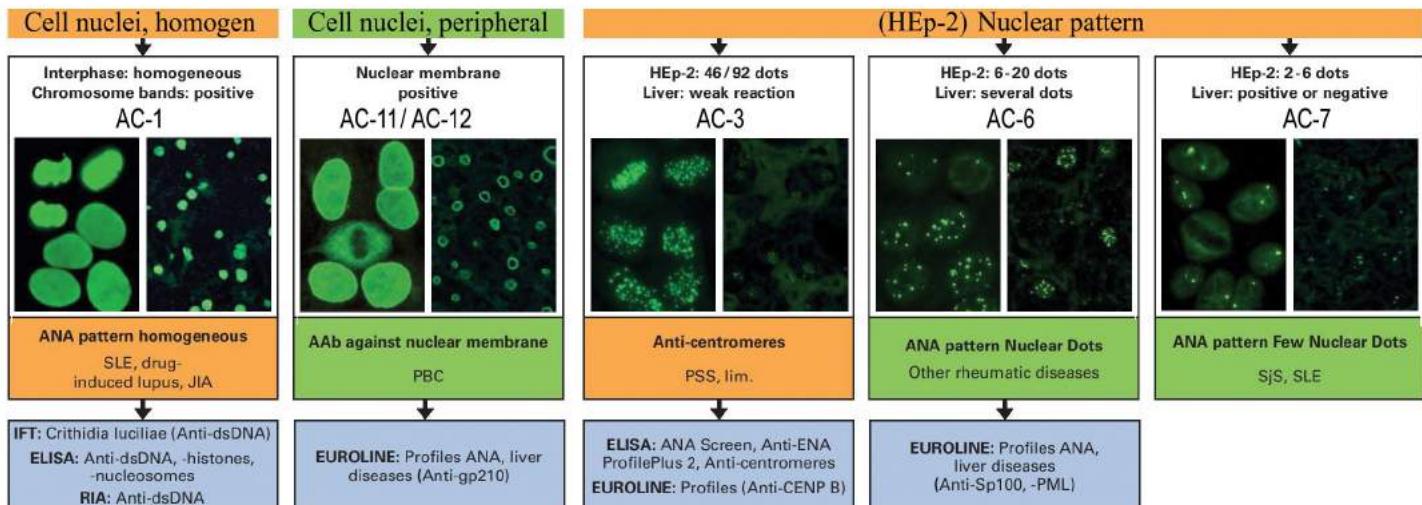
For detection the target antigen, related autoimmune disease and further effective follow up please order ANA **LINE BLOT**; New ANA confirmatory test

Evaluation of autoantibodies: (+)trace, + weak positive, ++ positive, +++ strong positive, +++++ very strong positive

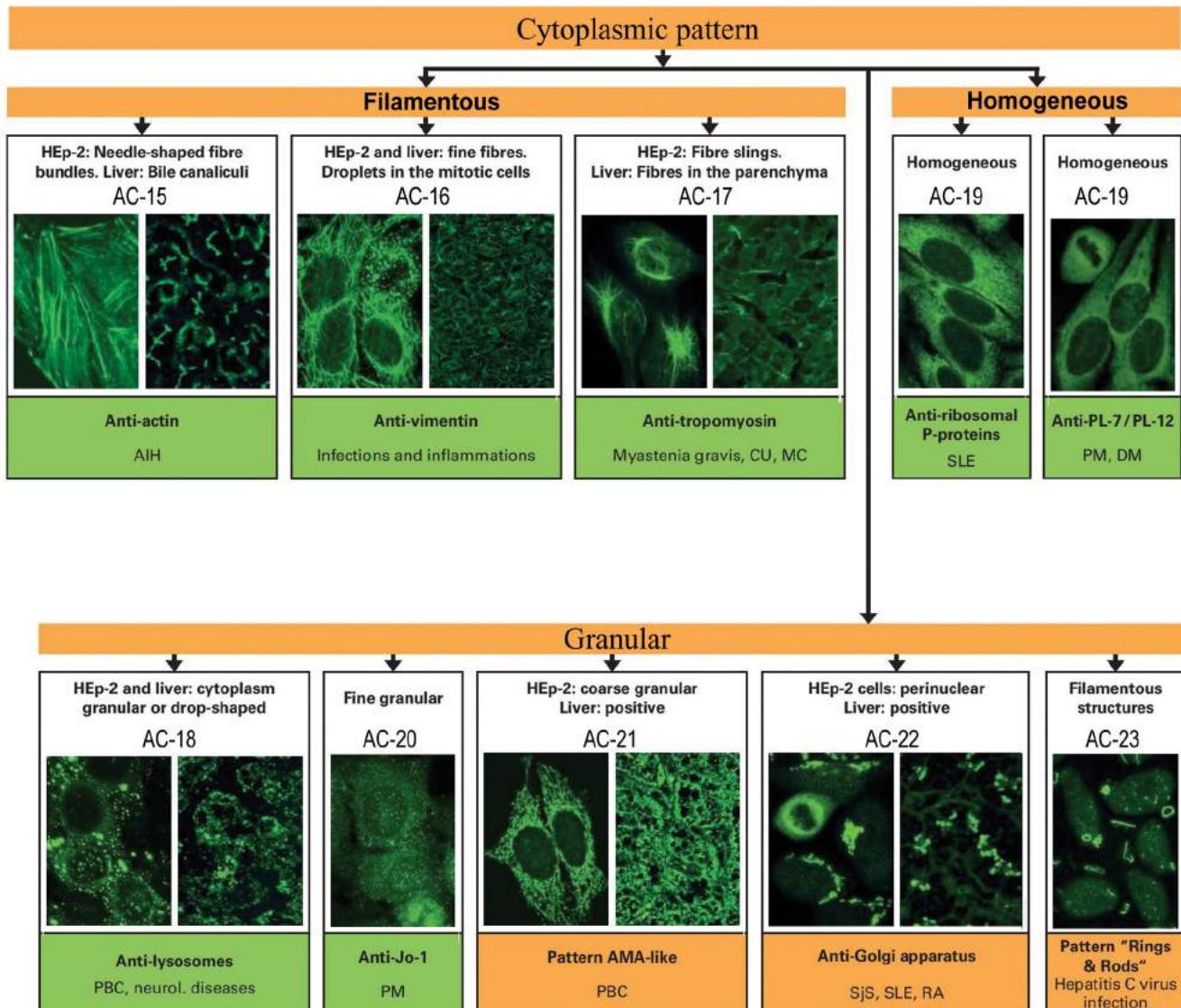
نمونه کزارش شده از تست ANA در آزمایشگاه اریترون

## الگوهای فلورسنس

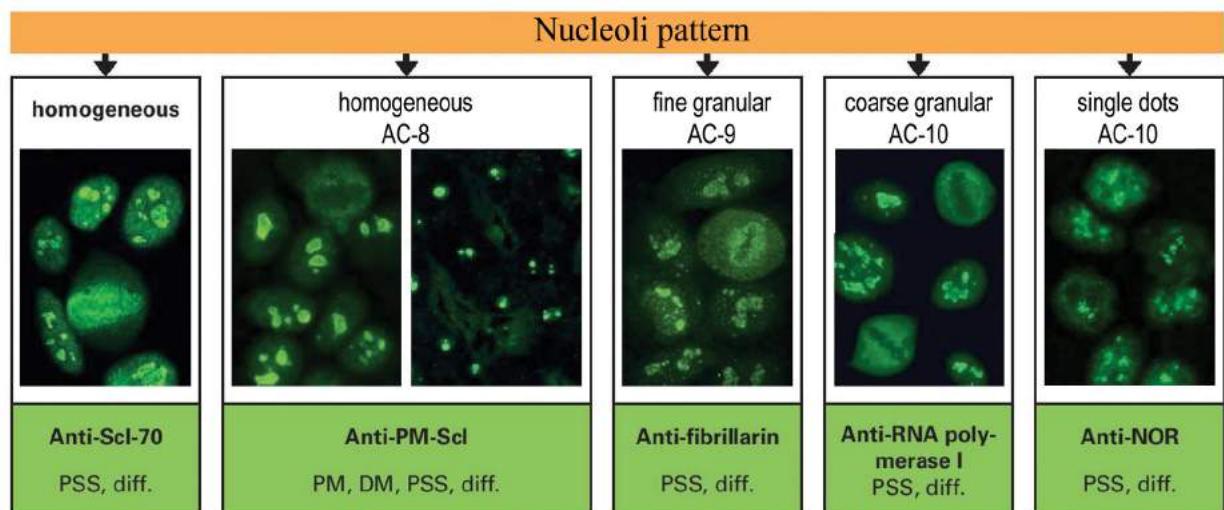
### I. الگوهای هسته‌ای: (هموژنوس، سنتروم، نوکلئولار با شدت رنگ متراکم، ملایم و خشن)



## II. الگوهای سیتوپلاسمیک: شبه میتوکندری، گلزی با شدت رنگ متراکم و ...



## III. الگوهای میتوزی



روش IIFT با استفاده از سلول های HEp-2 به عنوان روش استاندارد برای تشخیص ANAs همراه با تعدادی مزايا و معایب در نظر گرفته شده است. چالش های اصلی مربوط به روش IIFT عبارتند از: سختی کار، دخالت فردی در تعیین تیتر، تشخیص الکو و کمبود نیروی کار در آزمایشگاه ها. بنابراین، در بعضی از آزمایشگاه ها روش IIFT برای تعیین ANA با روش های پر بازده و با دخالت فردی کمتر همچون الایزا و ایمونوبلات جایگزین گردیده است.

برخلاف چالش های شناخته شده مرتبط با آزمایش ANA به روش IIFT، اصلی ترین نقطه قوت این روش مطرح شدن آن به عنوان یک ابزار غربالگری برای تنویر الکو های رنک آمیزی شده و آگاهی از ارتباط این الکوهای با آنتی بادی های خاص و بیماری های بالینی است. تلاش های قابل توجهی برای کاهش سختی کار و عدم دخالت فرد در تفسیر الکوهای ANA از طریق پیشرفت و تایید دستگاه هایی برای حمل و شستشوی اسلایدها و نرم افزارهایی برای تشخیص تصاویر انجام گرفته است. اتوماسیون هر دو قسمت تست ANA (مراحل انجام تست و بررسی دیجیتالی الکوها) بطور قابل توجهی چالش های آزمایش ANA به روش IIFT را به حداقل رسانده است.

تعدادی از سیستم های اتوماتیک بررسی نتایج آزمایش ANA به روش IIFT در حال حاضر در دسترس هستند که اساس عملکرد آن ها در انجام مراحل تست با یکدیگر کمی متفاوت است. این سیستم ها در مواردی نظیر استفاده از رنگ های متصل به DAPI<sup>2</sup>, PI<sup>1</sup> ( یا هیچ کدام), سلول های زمینه بکار گرفته شده (2-HEp-20-HEp-20)، بازده (تعداد نمونه در ساعت)، تعداد الکوهایی قابل شناسایی، پیش بینی تیتر، اتوماسیون تمامی مراحل از ابتدا تا انتهای و سایر خصوصیات نرم افزاری با هم تفاوت دارند.

1- propidium iodide

-2-phenylindole -6,'4diamidino

نام سیستم	تعداد نمونه/ساعت	کاملاً اتوماتیک	تعداد الگوهای قابل تشخیص a	رنگ هسته‌ای b
Aklides	60-48	خیر	c <sub>6</sub>	DAPI
EUROPattern	90	بله	c <sub>7</sub>	PI
Helios	150	بله	c <sub>7</sub>	فاقد رنگ
Image Navigator	90	بله	مثبت/منفی	فاقد رنگ
NOVA View	60-48	بله	c <sub>5</sub>	DAPI
Zenit G-Sight	48-14	خیر	c <sub>5</sub>	فاقد رنگ
Cytospot	96	بله	مثبت/منفی	فاقد رنگ

a. دستگاه Aklides: الگوهای سیتوپلاسمیک، هموژنوس، گرانولار، هسته‌ای، سانترومری و چندین الگوی نقاط هسته‌ای

b. دستگاه Helios: الگوهای سانترومری، سیتوپلاسمی، هموژنوس، غشای هسته‌ای، نقاط هسته‌ای، هسته‌ای و گرانولار

c. دستگاه EUROPattern: هموژنوس، گرانولار، هستکی، سانترومری، نقاط هسته‌ای، غشای هسته، سانترومری

d. دستگاه NOVA View: هموژنوس، گرانولار، سانترومری، هستکی، نقاط هسته‌ای و سانترومری

e. دستگاه Zenit G-Sight: هموژنوس، هستکی، گرانولار، سانترومری و میتوکندریایی

f. رنگ‌های DAPI یا PI

g. قابلیت پیش‌بینی تیتر

در یک مطالعه عملکرد ۶ دستگاه اتوماتیک موجود در تشخیص ANA به روش IIFT با یکدیگر مورد مقایسه قرار گرفت. عملکرد دستگاه‌های مختلف در حیطه تشخیص الگوهای معمول در حدود ۵۹٪ تا ۷۹٪ بود در حالی که صحت تشخیص دستگاه‌های فوق در تفسیر نمونه‌هایی با بیش از یک الگو، چالش بزرگی محسوب نیشد.

امروزه برای خوانش گرهای اتوماتیک ANA به روش IIFT، نتایج نهایی توسط کاربر گزارش می‌شود.

بنابراین، همزمان که خوانش گرهای اتوماتیک نتایج قابل قبول مثبت و منفی را نشان می‌دهند، تفاسیر ANA و ارتباطات بالینی آن کماکان توسط فرد انجام می‌گیرد.

## References

- Y.Kumar, A.Bhatia and R.W.Minz. Antinuclear antibodies and their detection methods in diagnosis of connective tissue diseases: a journey revisited. Diagn Pathol. 2009;4:1.
- I.Domljanovic, A.Carstens, A.Okholm, J.Kjems, C.T.Nielsen, Niels H. H. Heegaard, and K.Astakhova . Complexes of DNA with fluorescent dyes are effective reagents for detection of autoimmune antibodies. Sci Rep. 2017;7.
- R.J.T Smeenk. Anti nuclear antibodies: cause of disease or caused by disease. Rheumatology .2000;6:1.
- A.E.Tebo. Recent Approaches To Optimize Laboratory Assessment of Antinuclear Antibodies Clin vaccine Immunol .2017;24:120.

## بازنگری

در سال 2008 در آمریکا بدلیل بروز نتایج منفی کاذب رو به افزایش، کارگروهی بنام کارگروه ANA جهت بررسی علل این رویداد تشکیل شد. مطالعات این کارگروه نشان داد نتایج منفی کاذب عمدها در استفاده از آنتی ژن های خالص بروز می کند. به این ترتیب می توان نتیجه گرفت بهتر است از سلول 2 HEp در تست ANA استفاده شود. به علاوه ذکر مواردی نظیر تیتر ANA، محدوده نرمال، الگوی ANA، روش سنجش ANA، آنتی ژن هدف و بیماری های مرتبط در گزارش ANA ضروری است.

## راهکار دو مرحله ای برای جلوگیری از بروز نتایج منفی کاذب

I. استفاده از IIFT-ANA جهت غربالگری

II. استفاده از روش های تاییدی نظیر ENA-ELISA یا Multiplex Immunoblotting

به این ترتیب می توان نتیجه گرفت که استاندارد طلایین برای بررسی ANA کماکان استفاده از روش IIFT است. اما از آن جایی که روش IIFT یک روش غربالگری محسوب می شود، لذا بهتر است جهت تایید ANA از روش های تاییدی نظیر ENA-ELISA و یا ANA profile<sup>23</sup> استفاده کرد.

به کوشش

مرکز آموزش های تخصصی آزمایشگاه اریترون



ART OF **DIAGNOSIS**

## هنر تشخیص

خبرنامه تخصصی آزمایشگاه اریترون  
مرکز آموزش های تخصصی اریترون  
اردیبهشت ماه ۱۳۹۷ / شماره هشتم

به کوشش :

دکتر محمد رضا عزیزی، دکترای علوم آزمایشگاهی

دکتر محمد وحید، دکترای علوم آزمایشگاهی

دکتر شیرین کوهپایه، دکترای ایمونولوژی پزشکی

دکتر محمد کاظمی، دکترای پزشکی مولکولی

دکتر ملک رئیسی فر، متخصص آسیب شناسی پاتولوژی

دکتر محمد سراجی، متخصص شیمی آنالیز کروماتوگرافی

دکتر الهام عبدالهی، دکترای ایمونولوژی پزشکی

دکتر ریحانه رهنما، دکترای ایمونولوژی پزشکی

**ERYTHRON**

CLINICAL LABORATORY

Innovation for Health, Innovation for Life

telegram.me/ErythronArtofDiagnosis

@erythron.lab

erythron-lab.com

med@erythron-lab.com