

# Otoimmün Büllöz Hastalıkların Tanısında ELISA

## ELISA for the Diagnosis of Autoimmune Bullous Disorders

Ayşe Akman Karakaş

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Deri ve Zührevi Hastalıklar Anabilim Dalı, Antalya, Türkiye

### Özet

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), enzime bağlı immünosorbent test olarak ifade edilmektedir. ELISA, otoimmün büllöz hastalıkların otoantijenlerinin saptanmasını sağlamaktadır. Böylece, bu hastalıkların immünoopatogenezinin anlaşılmasında yardımcı olmaktadır. Son yıllarda, tanı ve takipte kullanılmak üzere ticari test sistemleri geliştirilmiştir. Bu yazının amacı otoimmün büllöz hastalıklarda ELISA incelemesinin kullanımını gözden geçirmektir. (*Türkderm 2011; 45 Özel Sayı 1: 36-8*)

**Anahtar Kelimeler:** Otoimmün büllöz hastalıklar, ELISA, tanı, takip, immünoopatogenez

### Summary

ELISA has been phrased as Enzyme Linked Immunosorbent Assay. The ELISA provide to detect autoantigens in autoimmune bullous disorders. Therefore, it is assited understanding of the immunopathogenesis of these diseases. Recently, commercial test systems has been developed for the diagnosis and course. The aim of this paper is to review applying investigation of the ELISA for autoimmune bullous disorders. (*Turkderm 2011; 45 Suppl 1: 36-8*)

**Key Words:** Autoimmune bullous disorders, ELISA, diagnosis, course, immunopathogenesis

### Giriş

Otoimmün büllöz hastalıklarda tanı hastalardan alınan deri ve serum örneklerinde otoantikörlerin saptanmasına dayanmaktadır. Şimdiye kadar olan patogenezdeki ve tanıya yönelik gelişmelere rağmen tanıda altın standart, direkt immünofloresan test ile dokudaki otoantikörlerin saptanmasıdır. Dolaşan otoantikörlerin tipleri, indirekt immünofloresan test ile gösterilebilmektedir<sup>1</sup>. Bu otoantikörlerin tiplerinin yanısıra spesifik olarak hangi antijenik yapılara karşı geliştiği ise "immüno blot", ELISA veya "immüno presipitasyon" gibi rutin olarak uygulanması zor incelemeler ile saptanmaktadır<sup>2</sup>. Son yıllarda, tanı ve takipte kullanılmak üzere (örneğin desmoglein 1, desmoglein 3, BP180, NC 16A, epidermal transglutaminaz gibi) ELISA ticari test

sistemleri geliştirilmiştir. Böylece spesifik otoantikörlerin titrasyonunun hastalığın tanısı ve takibinde kullanımı gündeme gelmiştir<sup>3-6</sup>.

### ELISA Uygulaması

Klasik olarak ELISA sırasıyla; antijen-antikör kompleksinin oluşturulması, yıkama işlemi, enzim ile işaretli antikör eklenmesi, yıkama işlemi, enzimin etkilediği substratın eklenmesi ve enzim reaksiyonunu durdurma basamaklarından oluşmaktadır.

**Kullanılan malzeme:** Otoimmün büllöz hastalıkların tanısı için ticari olarak hazırlanmış kitlerin içerisinde; 1. "Assay diluent" (Serumu dilüe edici), 2. "Wash concentrate" (Konsantre yıkama solüsyonu, 3. "Calibrator 1" (Sağlıklı insan serumu), 4. "Calibrator 2" (Pozitif se-

**Yazışma Adresi/Address for Correspondence:** Dr. Ayşe Akman Karakaş, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Deri ve Zührevi Hastalıklar Anabilim Dalı, Antalya, Türkiye, Tel: +90 242 249 67 08 E-posta: aakman@akdeniz.edu.tr

*Türkderm-Deri Hastalıkları ve Frengi Arşivi Dergisi, Galenos Yayınevi tarafından basılmıştır.  
Turkderm-Archives of the Turkish Dermatology and Venerology, published by Galenos Publishing.*

rum), 5. "Conjugate diluent" (Konjugat dilüe edici), 6. "Conjugate reagent" (Enzim ile işaretli antikörler), 7. Substrat, 8. Durdurma solüsyonu, 9. Antijenle kaplı kuyucuklar (Ör: Desmoglein 3, vb.) yer almaktadır.

**Uygulama sırası:** 1. Kalibratör inkübasyonu, 2. Serum veya tükürük dilüsyonu<sup>7</sup>, 3. Hasta örneği inkübasyonu, 4. İnkübasyon için bekleme, 5. Yıkama, 6. Konjugat dilüsyonu, 7. Konjugat inkübasyonu, 8. İnkübasyon için bekleme, 9. Yıkama, 10. Substrat inkübasyonu, 11. Durdurma solüsyonu eklenmesi

**Sonuçların değerlendirilmesi:** Renk değişiminin fotometrik ölçümü ile elde edilen veriler aşağıdaki formülde uygun yerlere yerleştirilerek sonuçlar hesaplanır<sup>8,9</sup>.

$(A450 < \text{Örnek} > - A450 < \text{Kalibratör 1} >) \div (A450 < \text{Kalibratör 2} > - A450 < \text{Kalibratör 1} >) \times 100 = \dots U/ml$

### ELISA'nın Uygulandığı Alanlar

Genel bilgilerde bahsedildiği gibi otoimmün büllöz hastalıkların immünopatogenezinin araştırılması amacıyla (örneğin envoplakin, periplakin, kollajen VII, laminin 5, vb.) ELISA yapılmaktadır<sup>10-12</sup>. Böylece antijenik epitoplara spesifik otoantikörler ve bu antikörlerin alt tip ilişkisi sonucunda örneğin pemfigus vulgaris' de saptanan desmoglein 3 spesifik otoreaktif Th2 hücreleri veya IgE'nin bu yolağı hedef alan yeni tedavi uygulamalarının geliştirilmesinde yardımcıdır<sup>13</sup>. Ayrıca tanı, takip ve tedaviye alınan yanıtın değerlendirilmesinde araştırma amacıyla kullanılmaktadır. Tablo 1'de Schmidt ve Zillikens<sup>9</sup>, Rose<sup>6</sup> ve arkadaşları tarafından bildirilmiş olan ELISA testinde şimdiye kadar kullanılan antijenik yapılar, ticari firmalar ve kullanıldığı otoimmün büllöz hastalıklar özetlenmiştir.

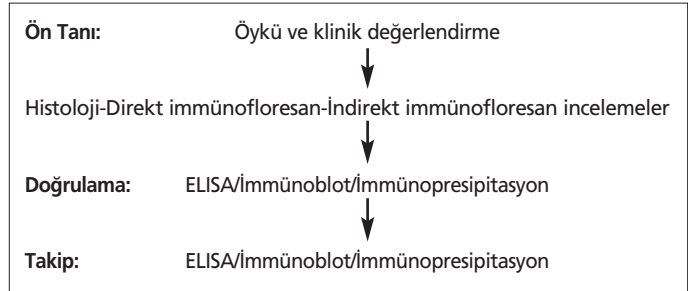
### Tanıdaki Yeri

Öykü ve klinik değerlendirmenin ardından direkt ve indirekt immüno Floresan inceleme ile yapılan tanısal değerlendirme, ELISA ile doğrulanabilir. Hastalığın seyri sırasında tanının değerlendirilmesi yapılabilir. Şekil 1'de Eming ve Hertl<sup>3</sup> tarafından önerilen tanısal yaklaşım özetlenmiştir.

ELISA uygulamasının tanıdaki sorunları: Kullanıma hazır ELISA kitlerinin hastalıkla ilişkili tüm antijenik epitoplara ve aktivite ile ilişkili otoantikör alt tiplerini içermediği unutulmamalıdır. Bunun yanı sıra yalancı pozitif sonuçların olabileceği bilinmelidir<sup>14</sup>.

### Takipteki Yeri

Hastalığın seyri sırasında ELISA isteminin klinik değerlendirmeye göre belirlenmesi önerilmektedir. Hastalığın aktif olduğu dönemde 4 haftada bir, stabil olduğu dönemde ise 4 ayda bir inceleme yapılabilir<sup>3</sup>. Özellikle pemfigus ve pemfigoid grubu



Şekil 1. Eming ve Hertl<sup>3</sup> tarafından önerilen tanısal yaklaşım

Tablo 1. Schmidt ve Zillikens<sup>9</sup>, Rose<sup>6</sup> ve arkadaşları tarafından bildirilmiş olan ELISA testinde şimdiye kadar kullanılan antijenik yapılar, ticari firmalar ve kullanıldığı otoimmün büllöz hastalıklar

Antijen	Hastalık	Ticari firma
Böcek hücrelerinden elde edilmiş Desmoglein 1'in <i>ectodomain</i> ' i	Pemfigus foliaceus	MBL
İnsan HEK 293 hücrelerinden elde edilmiş Desmoglein 1'in <i>ectodomain</i> 'i	Pemfigus foliaceus	Euroimmun
Böcek hücrelerinden elde edilmiş Desmoglein 3'ün <i>ectodomain</i> ' i	Pemfigus vulgaris	MBL
İnsan HEK 293 hücrelerinden elde edilmiş Desmoglein 3'ün <i>ectodomain</i> ' i	Pemfigus vulgaris	Euroimmun
BP180 NC16A	Büllöz pemfigoid	MBL
BP180 NC16A tetramer	Pemfigoid gestasyon Liken planus pemfigoides Müköz membran pemfigoidi Lineer IgA dermatozu	Euroimmun
BP230'un N- ve C-terminal parçaları	Büllöz pemfigoid	MBL
BP230' un C-terminal parçası	Büllöz pemfigoid	Euroimmun
Envoplakin' in N-terminal parçası	Paraneoplastik pemfigus	Euroimmun
Epidermal transglutaminaz ve doku transglutaminazı	Dermatitis herpetiformis	Immundiagnostik AG

için klinik aktivite ile ELISA sonuçları arasında pozitif bir korelasyon gösterilmiştir<sup>15,16</sup>. Ancak pemfigus hasta grubunda yaptığımız bir çalışmada, klinik aktivite ile uyumlu olsa da ELISA sonuçlarının prediktif değerinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır<sup>17</sup>. İndirekt immüno Floresan titrasyonları ile desmoglein 1 ve desmoglein 3'e karşı spesifik otoantikorların ELISA değerleri karşılaştırıldığında; indirekt immüno Floresanın titrelerinde artış olmasına karşın ELISA sonuçlarının belli bir değerden sonra aynı düzeyde kaldığı gözlenmiştir<sup>18</sup>. Bu nedenle, takipte ELISA kullanılacaksa gerçek indeks değeri için, sonuç >150 IU/ml ise dilüsyon yapılması önerilebilir<sup>19</sup>.

### Son Söz

- ELISA, otoimmün büllöz hastalıkların immüno patogenezi ve olası yeni tedavi yaklaşımlarını araştırma amacıyla kullanılmaktadır.
- ELISA'da pozitif sonuç, hastanın o sırada var olan yakınımından sorumlu olmayabilir.
- Sonuçlar, klinik ve histopatolojik olarak ilişkilendirilerek doğrulanabilir.

### Kaynaklar

1. Uzun S, Memişoğlu HR: Büllöz hastalıklarda immüno Floresan bulgular. *TURKDERM* 1999;33:108-18.
2. Zillikens D. Diagnosis of autoimmune bullous skin diseases. *Clin Lab* 2008;54:491-503.
3. Eming R, Hertl M; Autoimmune Diagnostics Working Group: Autoimmune bullous disorders. *Clin Chem Lab Med* 2006;44:144-9.
4. Schmidt E, Dähnrich C, Rosemann A, Probst C, Komorowski L, Saschenbrecker S, et al.: Novel ELISA systems for antibodies to desmoglein 1 and 3: correlation of disease activity with serum autoantibody levels in individual pemphigus patients. *Exp Dermatol* 2010;19:458-63.
5. Sardy M, Karpati S, Merkl B, Paulsson M, Smyth N: Epidermal transglutaminase (TGase 3) is the autoantigen of dermatitis herpetiformis. *J Exp Med* 2002;195:747-57.
6. Rose C, Armbruster FP, Ruppert J, Igl BW, Zillikens D, Shimanovich I: Autoantibodies against epidermal transglutaminase are a sensitive diagnostic marker in patients with dermatitis herpetiformis on a normal or gluten-free diet. *J Am Acad Dermatol* 2009;61:39-43.
7. Andreadis D, Lorenzini G, Drakoulakos D, Belazi M, Mihailidou E, Velkos G, et al.: Detection of pemphigus desmoglein 1 and desmoglein 3 autoantibodies and pemphigoid BP180 autoantibodies in saliva and comparison with serum values. *Eur J Oral Sci* 2006;114:374-80.
8. Ishii K, Amagai M, Hall RP, Hashimoto T, Takayanagi A, Gamou S, et al.: Characterization of autoantibodies in pemphigus using antigen-specific ELISAs with baculovirus expressed recombinant desmogleins. *J Immunol* 1997;159:2010-7.
9. Schmidt E, Zillikens D: Modern diagnosis of autoimmune blistering skin diseases. *Autoimmun Rev* 2010;10:84-9.
10. Probst C, Schlumberger W, Stöcker W, Recke A, Schmidt E, Hashimoto T, et al.: Development of ELISA for the specific determination of autoantibodies against envoplakin and periplakin in paraneoplastic pemphigus. *Clin Chim Acta* 2009;410:13-8.
11. Remington J, Chen M, Burnett J, Woodley DT: Autoimmunity to type VII collagen: epidermolysis bullosa acquisita. *Curr Dir Autoimmun* 2008;10:195-205.
12. Bekou V, Thoma-Uszynski S, Wendler O, Uter W, Schwietzke S, Hunziker T, et al.: Detection of laminin 5-specific auto-antibodies in mucous membrane and bullous pemphigoid sera by ELISA. *J Invest Dermatol* 2005;124:732-40.
13. Nagel A, Lang A, Engel D, Podstawa E, Hunzelmann N, de Pita O, et al.: Clinical activity of pemphigus vulgaris relates to IgE autoantibodies against desmoglein 3. *Clin Immunol* 2010;134:320-30.
14. Wieland CN, Comfere NI, Gibson LE, Weaver AL, Krause PK, Murray JA: Anti-bullous pemphigoid 180 and 230 antibodies in a sample of unaffected subjects. *Arch Dermatol* 2010;146:21-5.
15. Amagai M, Komai A, Hashimoto T, Shirakata Y, Hashimoto K, Yamada T, et al.: Usefulness of enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant desmogleins 1 and 3 for serodiagnosis of pemphigus. *Br J Dermatol* 1999;140:351-7.
16. Sitaru C, Dähnrich C, Probst C, Komorowski L, Blöcker I, Schmidt E, et al.: Enzyme-linked immunosorbent assay using multimers of the 16th non-collagenous domain of the BP180 antigen for sensitive and specific detection of pemphigoid autoantibodies. *Exp Dermatol* 2007;16:770-7.
17. Akman A, Uzun S, Alpsoy E: Immunopathologic features of pemphigus in the east Mediterranean region of Turkey: a prospective study. *Skinmed* 2010;8:12-6.
18. Bystryń JC, Akman A, Jiao D: Limitations in enzyme-linked immunosorbent assays for antibodies against desmogleins 1 and 3 in patients with pemphigus. *Arch Dermatol* 2002;138:1252-3.
19. Cheng SW, Kobayashi M, Tanikawa A, Kinoshita-Kuroda K, Amagai M, Nishikawa T: Monitoring disease activity in pemphigus with enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant desmogleins 1 and 3. *Br J Dermatol* 2002;147:261-5.