

Laboratorinė medicina.  
2019, t. 21, Nr. 4(84), p. 194–198.

# Anti-DFS70 antikūnų klinikinė reikšmė ir nustatymo galimybės

Miglė Montrimaitė<sup>1,3</sup>  
Loreta Bagdonaitė<sup>2,3</sup>  
Nijolė Gerčiukaitė<sup>3</sup>

## Santrauka

Autoantikūnai prieš branduolio antigenus (ANA) yra vienas iš pagrindinių serologinių kriterijų diagnozuojant su ANA susijusias reumatinės ligas. Standartinis ANA atrankinis tyrimas – netiesioginės imunofluorescencijos metodas, kuriuo gali būti aptinkamas tankiai švelniai grūdėtas ląstelių branduolio švytėjimas, siejamas su anti-DFS70 antikūnais. Šie antikūnai yra nukreipti prieš DNR surišantį transkripcijos koaktyvatorių p75, dalyvaujantį ląstelės apsaugos nuo žalojančių aplinkos veiksnių mechanizme. Anti-DFS70 antikūnai gali būti aptinkami sveikų žmonių populiacijoje, akių ir odos uždegiminėmis ligomis, autoimuniniu tiroiditu ir kitomis ligomis sergantiems pacientams. Tačiau izoliuoti anti-DFS70 antikūnai pacientams, sergantiems su ANA susijusiomis sisteminėmis reumatinėmis ligomis, aptinkami labai retai, todėl gali būti reikšmingas biožymuo atmetant tokių ligų kaip sisteminė raudonoji vilkligė, sisteminė sklerozė, idiopatinį uždegiminį miopatijų ir mišrios jungiamojo audinio ligos diagnozes.

Anti-DFS70 antikūnams būdingas netiesioginės imunofluorescencijos metodu (NIF) nustatomas DFS (tankiai švelniai grūdėtas) švytėjimas, tačiau atpažinti šį tipą gali būti gana sudėtinga. Ne visuose mėginiuose, kuriuose matomas DFS švytėjimas, anti-DFS70 antikūnai yra patvirtinami jautresniais metodais. Neatitikimą gali lemti įvairių tyrėjų skirtinga ANA švytėjimo tipų interpretacija, ANA švytėjimo tipų persidengimas esant antikūnų prieš kitus sąveikaujančius branduolio antigenus. Todėl svarbu pasirinkti tinkamą diagnostikos taktiką ir ne tik remtis NIF ANA metodu, bet ir gautus rezultatus patvirtinti specifiskesniais metodais, pavyzdžiui, imunobloto metodu, kad būtų išvengta klaidingos klinikinės interpretacijos, diagnozės, nereikalingų pakartotinių tyrimų ir gydymo.

**Reikšminiai žodžiai:** anti-DFS70, antikūnai prieš branduolio antigenus, reumatinės ligos, netiesioginė imunofluorescencija.

## ĮVADAS

Autoantikūnų prieš branduolio antigenus (ANA) aptikimas yra vienas iš pagrindinių serologinių kriterijų diagnozuojant su ANA susijusias reumatinės ligas [1]. Su ANA susijusios reumatinės ligos – tai grupė sutrikimų, kuriems būdingi autoantikūnai prieš viduląstelinis antigenus, ypač prieš branduolio antigenus (ANA) [2]. Autoantikūnų aptikimas svarbus ne tik

diagnozuojant šias ligas, bet ir numatant prognozę, ligos aktyvumą, o autoantikūnų titro dinamika svarbi gydymo efektyvumo stebėsenai [3, 4]. ANA yra įtraukti į sisteminės raudonosios vilkligės (SRV) ir sisteminės sklerozės (SS) klasifikacijos kriterijus [1]. Standartinis ANA atrankinis tyrimas – netiesioginės imunofluorescencijos (NIF) metodas, naudojant žmogaus epitelio 2 tipo ląstelių substratą (angl. *Human Epithelial type 2 sub-*

<sup>1</sup>Vilniaus universiteto  
Medicinos fakultetas  
Vilnius University, Faculty of Medicine

<sup>2</sup>Vilniaus universiteto Medicinos  
fakulteto Biomedicinos mokslų instituto  
Fiziologijos, biochemijos,  
mikrobiologijos ir laboratorinės  
medicinos katedra  
Vilnius University, Faculty of Medicine,  
Institute of Biomedical Sciences,  
Department of Physiology,  
Biochemistry, Microbiology  
and Laboratory Medicine

<sup>3</sup>Vilniaus universiteto ligoninės  
Santaros klinikų Laboratorinės  
medicinos centro Klinikinės  
imunologijos ir kraujo perpylimo  
laboratorija  
Vilnius University Hospital Santaros  
klinikos, Centre of Laboratory  
Medicine, Laboratory of Clinical  
Immunology and Blood Transfusion

strate, HEp-2). ANA NIF metodu identifikuojami įvairūs fluorescencinio švytėjimo tipai, kurie atspindi autoantikūnų prisijungimą prie ląstelių antigenų ir leidžia numatyti autoantikūnų specifiskumą [4]. Šiuo tyrimu dažnai aptinkamas tankiai švelniai grūdėtas branduolio švytėjimo tipas, siejamas su anti-DFS70 antikūnais, gali kelti diagnostinių sunkumų, nes anti-DFS70 antikūnų aptinkama ne tik autoimuninėmis ligomis sergantiems pacientams, bet ir sveikų žmonių populiacijoje [2, 4–6].

## DFS70 ANTIGENAS

Tankiai švelniai grūdėto (angl. *dense fine speckled*, DFS) švytėjimo tipas yra vienas iš dažniausiai ANA NIF tyrimu aptinkamų imunofluorescencijos švytėjimo tipų rutininėje diagnostikoje [7]. Antikūnai, ANA NIF lemiantys DFS švytėjimo tipą ir atpažįstantys 70 kDa baltymą, kuris buvo nustatytas imunobloto metodu, aptikti dar 1994 metais pacientams, sirgusiems intersticiniu cistitu [8]. Remiantis NIF būdu nustatyto švytėjimo pobūdžiu ir antigeno molekulinė mase, sudarytas DFS70 antigeno pavadinimas [1, 5, 9, 10]. Vėliau buvo nustatyta, kad DFS70 – tai DNR surišantis transkripcijos koaktyvatorius p75, dar žinomas kaip iš lęšių epitelio kilęs augimo faktorius (angl. *lens epithelium derived growth factor*, LEDGF) [11, 12]. Šis baltymas aptinkamas daugelio organų ir audinių ląstelių branduoliuose [13], jis ekspresuojamas lęšių epitelio ląstelėse, keratinocituose, fibroblastuose [14]. DFS70/LEDGF suteikia ląstelei apsaugą reguliuodamas su stresu susijusių genų transkripciją [7]. Šio antigeno ekspresija ryškėja susidūrus su tokiais stresiniais veiksniais kaip alkoholis, ultravioletinė spinduliuotė, kai kurie virusai ir citotoksiniai preparatai. Pagrindinė DFS70/LEDGF funkcija – apsaugoti ląsteles nuo aplinkos streso poveikio, reguliuojant tam tikrų genų raišką, pavyzdžiui karščio šoko baltymų genų, su stresu susijusių baltymų genų. Todėl sumažėjus DFS70/LEDGF ekspresijai ląstelės tampa jautresnės žalojančiam aplinkos poveikiui [3] ir tai gali paveikti tiek sveikų, tiek sergančių asmenų ląstelių išgyvenimą [15].

DFS70/LEDGF gali būti siejamas su kai kuriomis ligomis. Ryški DFS70/LEDGF ekspresija nustatyta prostatos vėžio audiniuose bei sergant kitomis vėžinėmis ligomis. Taip pat šis baltymas yra 1 tipo žmogaus imunodeficit viruso (ŽIV-1) replikacijos kofaktorius sąveikaudamas su viruso integ-

raze [1, 3, 9] ir yra svarbus autoimuninių ir uždegiminių ligų patofiziologijoje [7]. DFS70/LEDGF funkcijos ar struktūros pokyčiai yra reikšmingi ligų patogenezėje ir skatina autoantikūnų gamybą [13, 15]. Antikūnų atsiradimo mechanizmas ir klinikinė reikšmė dar nėra iki galo ištirti, tačiau įvairių studijų autoriai praneša, kad šių antikūnų aptinkama tiek sergančių žmonių, tiek sveikų žmonių populiacijoje [16]. Anti-DFS70 antikūnai dažniausiai yra IgG klasės ir yra nukreipti prieš DFS70/LEDGF baltymą C galo autoepitopą [15, 16]. Aukšti anti-DFS70 titrai dažnai aptinkami sveikiems individams ir pacientams, sergantiems įvairiomis uždegiminėmis ligomis [14], tačiau vis dar nėra aišku, ar šie antikūnai yra natūralūs ir turintys apsauginę reikšmę, ar veikia kaip patogeninis veiksnys [7, 16].

## ANTI-DFS70 ANTIKŪNŲ PAPLITIMAS

Yra duomenų, kad anti-DFS70 antikūnai ir DFS švytėjimo tipas yra gana paplitę bendroje populiacijoje, kai kuriuose tyrimuose nurodomas paplitimas iki 4–5 % [4]. 2017 m. atlikto metaanalizės duomenimis, išnagrinėjus 20 studijų, į kurias įtraukta 78 399 atvejai iš įvairių pacientų kohortų, nustatyta, kad anti-DFS70 antikūnų paplitimas tarp kraujo donorų, sveikų vaikų ir rutiniškai atliekamuose ANA tyrimų mėginiuose svyravo nuo 0 iki 5 % [16]. Tačiau anti-DFS70 paplitimas tarp asmenų, kuriems nustatyti teigiami ANA, buvo didesnis: svyravimo ribos – 0–37 %. Įvairių studijų rezultatų svyravimo ribos plačios dėl tirtų populiacijų heterogeniškumo, geografinių skirtumų bei nevienodo laboratorijų NIF interpretavimo [16], tačiau apibendrinant galima pastebėti tendenciją, kad anti-DFS70 antikūnai dažniau nustatomi pacientams, sergantiems lėtinėmis uždegiminėmis ligomis [17], bet retai – pacientams, sergantiems su ANA susijusiomis sisteminėmis reumatinėmis ligomis [16].

Kelios studijos parodė, kad anti-DFS70 antikūnai dažniau paplitę tarp jaunesnių nei 35 metų asmenų [3, 9], nors vaikų populiacijoje paplitimas mažesnis: H. Schmeling ir kt. duomenimis, anti-DFS70 antikūnų rasta 2,1 % sveikų vaikų [3, 18]. H. A. Mariz ir kt. atliktoje studijoje DFS švytėjimo tipas nustatytas 10 % vyresnių nei 50 metų tiriamųjų, o 18–50 metų pacientų grupėje NIF metodu DFS pastebėtas 32,3–42,3 % atvejų [19]. Esama duomenų, kad rasti anti-DFS70 antikūnai dažniausiai išlieka stabilūs

bėgant laikui [9], bet nėra susiję su autoimuninių reumatinų ligų išsivystymu ateityje [3]. 2005 m. Brazilijoje atlikto tyrimo duomenimis, 40 pacientų aukštas anti-DFS70 antikūnų titras išliko 23–33 mėn. Daliai šių pacientų nustatyti pakitę ūmios fazės žymenų rodikliai nesant specifinių klinikinių simptomų, o tai galėtų rodyti nedidžią uždegimo procesą [20].

Anti-DFS70 antikūnų dažniau aptinkama moterims. T. Carbone ir kt. 2018 m. atliktoje rutininių ANA tyrimų dėl anti-DFS70 antikūnų studijoje, apėmusioje 3175 pacientų kohortą, buvo nustatytas statistiškai reikšmingai didesnis anti-DFS70 antikūnų paplitimas tarp moterų (moterų ir vyrų santykis 4:1). Įdomu tai, kad izoliuoti teigiami anti-DFS70 antikūnai nustatyti tik vyrų grupėje, o moterų grupėje anti-DFS70 antikūnų rasta kartu su kitais autoantikūnais (anti-TPO, anti-TG, ANCA ir kt.) [15]. Panašūs rezultatai gauti ir 2019 m. studijoje, kurioje iš daugiau nei 3000 pacientų DFS švytėjimo tipas nustatytas 243 moterims ir tik 34 vyrams [6]. Tokius duomenis būtų galima aiškinti didesniu autoimuninių ligų paplitimu tarp moterų dėl įvairių su lytimi susijusių veiksnių – lytinių hormonų, tam tikrų genų lytinės chromosomos [19], tačiau tikslesnes skirtingo anti-DFS70 antikūnų pasiskirstymo tarp lyčių priežastis bus galima nustatyti atlikus daugiau studijų [15].

Anti-DFS70 antikūnų sintezė esant įvairiems klinikiniams simptomams gali turėti įtakos genetiniai veiksniai [21]. Japonų atliktoje ŽLA (žmogaus leukocitų antigenų) II klasės alelių studijoje rasta sąsajų tarp anti-DFS antikūnų gamybos ir kai kurių ŽLA alelių: ŽLA-DRB1\*0410, -DQB1\*0402 ir -DPB1\*0301. Mažesnis anti-DFS70 paplitimas, palyginti su bendra populiacija, pastebėtas asmenims, turintiems ŽLA-DQB1\*0302 alelį [22, 23]. Gauti duomenys nebuvo statistiškai reikšmingi dėl per mažo tirtų asmenų skaičiaus, todėl reikia atlikti didesnių kohortų tyrimus siekiant įvertinti genetinių veiksnių įtaką anti-DFS70 antikūnų gamybai [14, 23].

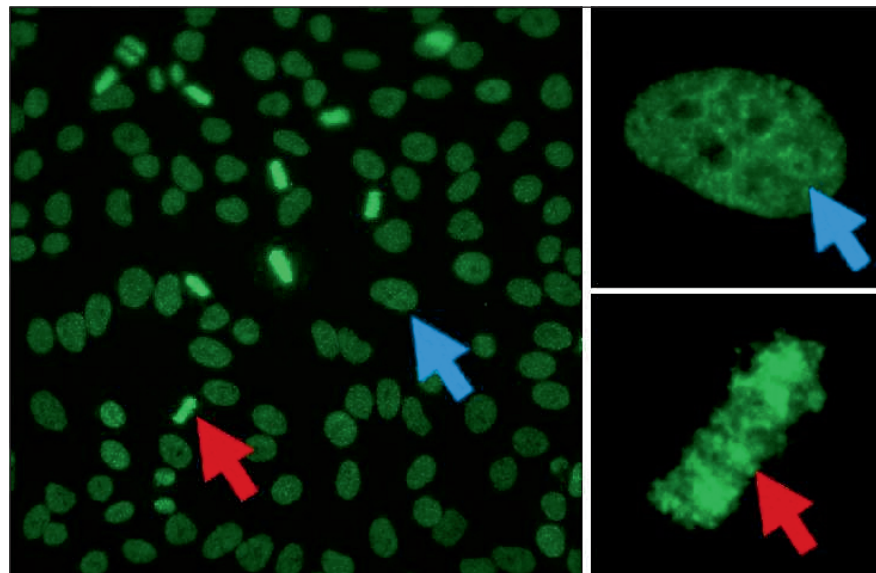
## ANTI-DFS70 ANTIKŪNŲ KLINIKINĖ REIKŠMĖ

Iki šiol nėra nustatyta patikimos anti-DFS70 antikūnų klinikinės sąsajos su įvairiomis ligų grupėmis, išskyrus kai kurias akių ir odos uždegimines ligas [16]. Didžiausias šių antikūnų paplitimas nustatytas pacientams, sergantiems Vogt–Harada sindromu (66,7 %), atopiniu dermati-

tu (30 %), astma (16 %), židinė alopecija (19,8 %) [3, 5, 10], tačiau klinikinė anti-DFS70 reikšmė sergant šiomis ligomis vis dar nežinoma [15, 22]. Labai nedaug duomenų surinkta apie anti-DFS70 antikūnų paplitimą sergant organams specifinėmis autoimuninėmis ligomis. Didesnis paplitimas nustatytas tik pacientams, sergantiems autoimuniniu tiroiditu [17]. 2019 m. Pietų Korėjoje atlikto fibromialgija sergančių pacientų tyrimo duomenimis, teigiama koreliacija siejo anti-DFS70 antikūnų titrą ir vaizdinės skausmo skalės vertinimo rezultatus [24]. Šiuo metu daugiausia diskusijų kelia anti-DFS70 antikūnų reikšmė su ANA susijusių sisteminių autoimuninių ligų (SRV, SS, Sjogreno sindromas) atvejais.

Pastebėta, kad anti-DFS70 antikūnai labiau paplitę tarp sveikų asmenų ar sergančių kitomis, ne su ANA susijusiomis sisteminėmis reumatinėmis ligomis [16]. 2018 m. atliktos anti-DFS70 paplitimo studijos duomenimis, šių antikūnų paplitimas tarp sveikų individų buvo statistiškai patikimai didesnis nei tarp pacientų, sergančių su ANA susijusiomis reumatinėmis ligomis (atitinkamai 10,9 % ir 1,9 %,  $p=0,02$ ) [2]. Įvertinus daugiau nei 13 000 teigiamų ANA mėginių imunofermentinės analizės (ELISA) ir imunoblotto metodais buvo nustatyta, kad anti-DFS70 antikūnų dažnai aptinkama individams, kuriems nėra jokių sisteminės autoimuninės reumatinės ligos požymių. Šio tyrimo metu dažniausiai anti-DFS70 nustatyta pacientams, sergantiems autoimuniniu tiroiditu ar nespecifine artralgija [20, 24]. Taigi anti-DFS70 antikūnai galėtų būti reikšmingas biožymuo atmetant sisteminių reumatinėlių ligų diagnozę.

Pacientams, sergantiems su ANA susijusiomis sisteminėmis reumatinėmis ligomis, anti-DFS70 antikūnų taip pat aptinkama, tačiau dažniausiai kartu su kitais ANA, o sveikiems individams ir pacientams, sergantiems kitomis ligomis, jie dažniausiai aptinkami izoliuotai [1]. Pavyzdžiui, šešiose studijose, apėmusiose 1396 SRV sergančius pacientus, anti-DFS antikūnų paplitimas siekė 2,7 %, o izoliuotai šių antikūnų rasta tik 0,7 % pacientų. Tiriama pacientus, sergančius sistetine skleroze, visi anti-DFS70 antikūnai (aptikti 1,5 % pacientų) buvo nustatomi kartu su kitais sisteminei sklerozei specifiniais antikūnais [17]. Remiantis neseniai atlikta metaanalize, vidutinis izoliuotų anti-DFS70 antikūnų paplitimas tarp pacientų, sergančių su ANA susijusiomis reumatinėmis ligomis, yra tik apie 0,7 %, o 3,8 % pacientų anti-DFS70 antikūnų rasta kartu



Pav. DFS (tankiai švelniai grūdėtas) švytėjimo tipas.

Mėlyna rodykle pažymėtas tankiai švelniai grūdėtas branduolio švytėjimas esant ląstelės interfazės stadijai, raudona rodykle – chromatino regiono švytėjimas esant ląstelės metafazės stadijai

Fig. DFS (dense fine speckled) fluorescence pattern.

Blue arrow – dense fine speckled fluorescence of the nucleus in cell interphase, red arrow – fluorescence of chromatin region in cell metaphase

su kitais specifiniais autoantikūnais [7, 25]. H. A. Mariz ir kt. pastebėjo, kad pacientams, kuriems buvo aptikta anti-DFS70 antikūnų izoliuotai, po 4 metų stebėjimo su ANA susijusių reumatinėlių ligų nepasireiškė [19]. Tai gali būti daryti išvada, kad izoliuotai nustatyti anti-DFS70 antikūnai nėra būdingi su ANA susijusioms reumatinėms ligoms [4, 9] ir jie gali būti reikšmingas biožymuo, padedantis atmesti tokių ligų kaip SRV, SS, idiopatinį uždegiminį miopatiją ir mišrios jungiamojo audinio ligos diagnozes [1, 2, 5, 9, 17].

Klinicistams rekomenduojama atsargiai vertinti teigiamų ANA rezultatus pacientams, kuriems izoliuotai randama anti-DFS70 antikūnų, ir būtina atkreipti dėmesį į kitus rastus antikūnus [6]. Tai ypač svarbu diagnozuojant SRV, nes teigiami ANA yra vienas iš SRV klasifikacijos kriterijų, todėl DFS švytėjimo tipas gali lemti klaidingą klinikinę interpretaciją, klaidingą diagnozę, nereikalingus pakartotinius tyrimus, pacientų ir gydytojų nerimą, nereikalingą gydymą bei padidėjusias išlaidas [5, 13]. Anti-DFS70 antikūnai dažnai gali būti nustatomi vidutiniais ar dideliais titrais [7, 17], pavyzdžiui, Italijoje atlikto tyrimo duomenimis, 70 % DFS švytėjimo tipų aptikta 1:320 titru, tačiau jie nėra susiję su sisteminėmis reumatinėmis ligomis, kaip aukšti kitų autoantikūnų titrai [17, 22]. Todėl svarbu atpažinti anti-DFS70 antikūnus, kad būtų išvengta klaidingos ANA interpretacijos [13], ir dėl to, kad šie anti-

kūnai yra reikšmingas žymuo, paneigiantis su ANA susijusias autoimunines reumatinės ligas [10]. Remiantis esamais duomenimis, teigiamas ANA rezultatas, jeigu jis yra nulemtas anti-DFS70 antikūnų, neturėtų būti naudojamas kaip SRV klasifikacijos kriterijus [22].

## ANTI-DFS70 ANTIKŪNŲ NUSTATYMO METODAI

Tarptautinio 2014 m. ANA švytėjimo tipų komiteto sutarimu (angl. *International Consensus on ANA Patterns*, ICAP) NIF DFS švytėjimo tipas klasifikuojamas į atskirą „AC-2“ kategoriją ir apibūdinamas kaip tankus, švelnus, heterogeniškai grūdėtas branduolio švytėjimas, aplenkiantis branduolėlius ir matomas ląstelės interfazės ir metafazės stadijose [26] (žr. pav.). Labai svarbus DFS švytėjimo tipo požymis yra ląstelės metafazėje matomas chromatino regiono dažymasis, kuris nėra būdingas grūdėtam švytėjimo tipui [26]. DFS70 yra baltymas, kuris jungiasi prie DNR, tai paaiškina matomą tankų branduolio švytėjimą interfazėje ir chromatino nusidarymą metafazėje [20].

Kelių tyrimų duomenimis, atpažinti DFS švytėjimo tipą gali būti nemenkas iššūkis [9]. Įrodyta, kad ne visuose mėginiuose, kuriuose pastebimas DFS švytėjimas, anti-DFS70 antikūnai yra patvirtinami specifiskiais metodais [9, 13]. Neatitiktima gali lemti skirtinga įvairių tyrėjų ANA

švytėjimo tipų interpretacija, ANA švytėjimo tipų persidengimas. Neatitikimų gali būti ir atliekami patvirtinamuosius testus dėl DFS70/LEDGF antigeno struktūros ypatumų [13].

Atpažinti DFS švytėjimo tipą gali būti sunku net ir daug patirties turintiems tyrėjams. DFS švytėjimo pobūdis gali įvairuoti priklausomai nuo HEp-2 ląstelių gamintojo. Kartu aptinkami kiti autoantikūnai taip pat gali paslėpti DFS švytėjimo tipą [6]. Pavyzdžiui, 2016 m. studijoje anti-DFS70 antikūnai buvo patvirtinti ne tik pacientams, kuriems atliekant ANA tyrimą pastebėtas DFS švytėjimo tipas. Kai kuriais atvejais anti-DFS70 antikūnų buvo rasta ir esant homogeniniam švytėjimo tipui [5]. Kitos studijos taip pat parodė, kad nuostaičius DFS švytėjimo tipą nebūtinai pasitvirtins, kad tai yra anti-DFS70 antikūnai. Pavyzdžiui, 2019 m. studijoje teigiamus NIF ANA DFS patvirtinus imunobloto metodu, 20 % atvejų anti-DFS70 antikūnų nebuvo aptikta. Klaidingai teigiami rezultatai galėjo būti dėl naudojamo titro (1:40), o remiantis SRV kriterijais ANA rezultatas yra teigiamas, kai antikūnų titras siekia 1:80. Tačiau klaidingai teigiamą ANA NIF galėjo lemti ir klaidingas homogeninio ar grūdėto švytėjimo tipo priskyrimas DFS švytėjimo tipui [27].

Nustatyta, kad DFS70 antigenas branduolyje sąveikauja su kitais antigenais – MeCP2 (angl. *Methyl CpG binding protein 2*), PogZ (angl. *Pogo transposable element-derived protein with zinc*) ir kt. [28]. Šie antigenai gali pasižymėti panašiomis savybėmis kaip ir DFS70, pavyzdžiui, MeCP2 antigenas yra tokios pačios molekulinės masės (75 kDa) baltymas, kuris randamas toje pačioje branduolio vietoje kaip ir DFS70 [7, 13, 28]. Todėl keliama teorija, kad DFS švytėjimo pobūdį gali lemti ne tik anti-DFS70, bet ir kiti antikūnai, nukreipti prieš antigenus, esančius toje pačioje ląstelės vietoje [7, 28]. A. Basu ir kt. šią teoriją paneigė išanalizavę 65 pacientų, kuriems aptiktas DFS švytėjimo tipas, mėginius ir nustatė, kad visuose mėginiuose antikūnai buvo specifiški DFS70/LEDGF baltymui, o specifiskų antikūnų prieš MeCP2 antigeną neaptikta. Tačiau autoriai kategoriškai neatmeta galimybės, kad DFS švytėjimo tipą gali lemti ir antikūnai prieš kitus branduolio antigenus [28], todėl reikalingi tolesni tyrimai nagrinėjant ryšį tarp DFS švytėjimo tipo ir su DFS70 sąveikaujančių antigenų [13, 28].

NIF metodu nustatytas DFS švytėjimo tipas leidžia įtarti esant anti-DFS70 antikūnų, tačiau reikalingi specifiniai testai, kuriais būtų patvir-

tinta, kad matomas švytėjimo tipas yra nulemtas būtent anti-DFS70 antikūnų [2, 7, 13, 17]. Tam yra taikomi įvairūs metodai: chemiluminescencinė imunoanalizė, imunobloto metodas, ELISA, imunoabsorbicijos metodas [2]. Anti-DFS70 antikūnų nustatymas imunobloto metodu yra įtrauktas į ENA (ekstrahuojamų branduolio antigenų) tyrimo paletę. Imunobloto tyrimas remiasi antikūnų sąveika su išgrynintais rekombinantiniais viso ilgio DFS70 antigenais, fiksuotais tyrimo juostelėse. Praskiestas mėginys inkubuojamas su imunobloto juostelėmis. Esant teigiamam mėginiui, specifiniai antikūnai susijungia su atitinkama antigenine vieta. Su antigenu susijungusiems antikūnams nustatyti atliekama antroji inkubacija naudojant spalvinę reakciją paskatinančius fermentu žymėtus antikūnus prieš žmogaus IgG (fermento konjugatą). Spalvos intensyvumas pateikiamas skaitmenine išraiška, pagal kurią skiriamas rezultatas: neigiamas, ribinis, teigiamas ar stipriai teigiamas [29].

Pažymėtina, jog skirtingų individų organizmuose galimas skirtingas antikūnų spektras, todėl net ir antikūnai, nukreipti prieš tą patį antigeną, gali įvairuoti savo struktūrą ir reakciją į tą patį antigeną. Bendroje populiacijoje nemažai individų gali turėti panašų antikūnų spektrą, tačiau nemaža antikūnų dalis gali turėti kitokių reaktyvumą [4]. Anti-DFS70 antikūnai taip pat yra grupė heterogeninių antikūnų ir todėl gali būti nukreipti prieš skirtingus epitopus [1]. Tai yra svarbu diagnostikai, nes įvairūs autoantikūnų aptikimo metodai remiasi skirtingų epitopų nustatymo principais, todėl mėginių rezultatai gali įvairuoti [4]. Gamintojai pasirenka skirtingą antigeno struktūrą – naudojamas viso ilgio DFS70 antigenas ar sutrumpinta DFS70 antigeno seka. Anti-DFS70 nustatymo imunobloto metodu lyginamoji studija parodė, kad diagnostikos tikslumui antigeno sekos ilgis įtakos neturi [13], tačiau neatitikimų gali atsirasti, todėl rekomenduojama visada remtis paties metodo rezultatais.

## IŠVADOS

1. Anti-DFS70 antikūnų atpažinimas ir teisingas klinikinis įvertinimas yra svarbus žingsnis diagnozuojant su ANA susijusias reumatines ligas. Izuoti anti-DFS70 antikūnai nebūdingi su ANA susijusioms reumatinėms ligoms, todėl galėtų būti naudojami kaip reikšmingas biožymuo atmetant šių ligų diagnozę.

2. Anti-DFS70 antikūnai gali būti aptinkami sveikiems asmenims, akių ir odos uždegiminėmis ligomis, autoimuniniu tiroiditu ir įvairiomis kitomis ligomis sergantiems pacientams.

3. Svarbu pasirinkti tinkamą diagnostikos taktiką ir ne tik remtis NIF metodu, bet ir gautus rezultatus patvirtinti specifiskesniais metodais, pavyzdžiui, imunobloto metodu, kad būtų išvengta klaidingos klinikinės interpretacijos, nereikalingų pakartotinių tyrimų ir gydymo taktikos. ◆

Gauta:

2019 12 02

Priimta spaudai

2019 12 27

## Summary

### CLINICAL SIGNIFICANCE AND EVALUATION OF ANTI-DFS70 ANTIBODIES

Miglė Montrimaitė, Loreta Bagdonaitė, Nijolė Gerčiukaitė

Detection of antinuclear antibodies (ANA) by indirect immunofluorescence assay (IIF) is a significant serological criteria in diagnostics of ANA associated rheumatic diseases. A frequent find is dense fine speckled (DFS) fluorescence pattern, associated with anti-DFS70 antibodies. These antibodies are directed against DNA binding transcription coactivator p75, which participates in the mechanisms of cell protection against environmental stress. Anti-DFS70 antibodies can be found in general population, in patients with eye and skin inflammatory diseases, autoimmune thyroiditis and other pathologies. Intriguingly, isolated anti-DFS70 antibodies are rarely found in patients with ANA associated systemic rheumatic diseases, therefore anti-DFS70 has been proposed as a significant biomarker that helps to rule out a diagnosis of such diseases as systemic lupus erythematosus, systemic sclerosis, idiopathic inflammatory myopathies and mixed connective tissue disease.

DFS fluorescence type, associated with anti-DFS70 antibodies, may be difficult to distinguish. Not all samples, in which DFS is observed, are confirmed to be positive for anti-DFS70, when tested with other specific methods. The discrepancy may be caused by the variability of ANA fluorescence interpretation among observers, overlapping of ANA patterns or other interacting antibodies. Therefore it is very important to choose the right diagnostic approach, interpret ANA IIF results with caution and use more specific tests, such as immunoblot assay, for confirmation to avoid misinterpretation, misdiagnosis, unnecessary testing and treatment.

**Keywords:** anti-DFS70, antinuclear antibodies, rheumatic diseases, indirect immunofluorescence.

## LITERATŪRA

1. Infantino M, Shovman O, Pérez D, Grossi V, Manfredi M, Benucci M, et al. A better definition of the anti-DFS70 antibody screening by IIF methods. *J Immunol Methods* 2018; 461: 110–6.
2. Shovman O, Gilburd B, Chayat C, Amital H, Langevitz P, Watad A, et al. Prevalence of anti-DFS70 antibodies in patients with and without systemic autoimmune rheumatic diseases. *Clin Exp Rheumatol* 2018; 36(1): 121–6.
3. Aragón C-C, González JD, Posso-Osorio I, Naranjo-Escobar J, Puerta G, Echeverri A, et al. Anti-DFS70 antibodies: A new useful antibody in the exclusion of auto-immune diseases. *Rev Colomb Reumatol Engl Ed* 2018; 25(2): 104–11.
4. Dellavance A, Baldo DC, Zheng B, Mora RA, Fritzler MJ, Hiepe F, et al. Establishment of an international autoantibody reference standard for human anti-DFS70 antibodies: proof-of-concept study for a novel Megapool strategy by pooling individual specific sera. *Clin Chem Lab Med* 2019; 57(11): 1754–63.
5. Gundín S, Irure-Ventura J, Asensio E, Ramos D, Mahler M, Martínez-Taboada V, et al. Measurement of anti-DFS70 antibodies in patients with ANA-associated autoimmune rheumatic diseases suspicion is cost-effective. *Auto-Immun Highlights* 2016; 7(1): 10.
6. Yumuk Z, Demir M. Clinical value of anti-DFS70 antibodies in a cohort of patients undergoing routine antinuclear antibodies testing. *J Immunol Methods* 2020; 112754.
7. Carter JB, Carter S, Saschenbrecker S, Goeckeritz BE. Recognition and relevance of anti-DFS70 autoantibodies in routine antinuclear autoantibodies testing at a community hospital. *Front Med (Lausanne)* 2018; 5: 88.
8. Ochs RL, Stein TW, Peebles CL, Gittes RF, Tan EM. Autoantibodies in interstitial cystitis. *J Urol* 1994; 151(3): 587–92.
9. Mahler M, Meroni PL, Andrade LE, Khamashta M, Bizzaro N, Casiano CA, et al. Towards a better understanding of the clinical association of anti-DFS70 autoantibodies. *Autoimmun Rev* 2016; 15(2): 198–201.
10. Mutlu E, Eyigör M, Mutlu D, Gültekin M. Confirmation of anti-DFS70 antibodies is needed in routine clinical samples with DFS staining pattern. *Cent-Eur J Immunol* 2016; 41(1): 6–11.
11. Ge H, Si Y, Roeder RG. Isolation of cDNAs encoding novel transcription coactivators p52 and p75 reveals an alternate regulatory mechanism of transcriptional activation. *EMBO J* 1998; 17(22): 6723–9.
12. Singh DP, Ohguro N, Kikuchi T, Sueno T, Reddy VN, Yuge K, et al. Lens epithelium-derived growth factor: effects on growth and survival of lens epithelial cells, keratinocytes, and fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 267(1): 373–81.
13. Bizzaro N, Pesente F, Cucchiari F, Infantino M, Tampona M, Villalta D, et al. Anti-DFS70 antibodies detected by immunoblot methods: a reliable tool to confirm the dense fine speckles ANA pattern. *J Immunol Methods* 2016; 436: 50–3.
14. Ochs RL, Mahler M, Basu A, Rios-Colon L, Sanchez TW, Andrade LE, et al. The significance of autoantibodies to DFS70/LEDGFp75 in health and disease: integrating basic science with clinical understanding. *Clin Exp Med* 2016; 16(3): 273–93.
15. Carbone T, Pafundi V, Tramontano G, Gilio M, Padula MC, Padula AA, et al. Prevalence and serological profile of anti-DFS70 positive subjects from a routine ANA cohort. *Sci Rep* 2019; 9(1): 2177.
16. Malyavantham K, Suresh L. Analysis of DFS70 pattern and impact on ANA screening using a novel HEp-2 ELITE/DFS70 knockout substrate. *Scinapse [Internet]*. 2017 Dec 1 [cited 2020 Mar 3]. Available from: <https://scinapse.io/papers/2597299251>
17. Conrad K, Röber N, Andrade LEC, Mahler M. The clinical relevance of anti-DFS70 autoantibodies. *Clin Rev Allergy Immunol* 2017; 52(2): 202–16.
18. Schmeling H, Mahler M, Levy DM, Moore K, Stevens AM, Wick J, et al. Autoantibodies to dense fine speckles in pediatric diseases and controls. *J Rheumatol* 2015; 42(12): 2419–26.
19. Mariz HA, Sato EI, Barbosa SH, Rodrigues SH, Dellavance A, Andrade LEC. 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.
20. Dellavance A, Viana VST, Leon EP, Bonfa ESDO, Andrade LEC, Leser PG. The clinical spectrum of antinuclear antibodies associated with the nuclear dense fine speckled immunofluorescence pattern. *J Rheumatol* 2005; 32(11): 2144–9.
21. Peker BO, Şener AG, Tarhan EF, Kaya S. Investigation of anti-DFS70 antibody in patients with systemic autoimmune rheumatic diseases. *Clin Rheumatol* 2019; 38(12): 3627–33.
22. Infantino M, Pregnotato F, Bentow C, Mahler M, Benucci M, Li Gobbi F, et al. Only monospecific anti-DFS70 antibodies aid in the exclusion of antinuclear antibody associated rheumatic diseases: an Italian experience. *Clin Chem Lab Med* 2019; 57(11): 1764–9.
23. Muro Y, Ogawa Y, Sugiura K, Tomita Y. HLA-associated production of anti-DFS70/LEDGF autoantibodies and systemic autoimmune disease. *J Autoimmun* 2006; 26(4): 252–7.
24. Jeong J, Kim DH, Park G, Park S, Kim H-S. Clinical significance of antinuclear dense fine speckled 70 antibody in patients with fibromyalgia. *Korean J Intern Med* 2019; 34(2): 426–33.
25. Seelig CA, Bauer O, Seelig H-P. Autoantibodies against DFS70/LEDGF exclusion markers for systemic autoimmune rheumatic diseases (SARD). *Clin Lab* 2016; 62(4): 499–517.
26. Chan EK, Damoiseaux J, Carballo OG, Conrad K, de Melo Cruvinel W, Francescantonio PLC, et al. Report of the First International Consensus on Standardized Nomenclature of Antinuclear Antibody HEp-2 Cell Patterns 2014–2015. *Front Immunol* 2015; 6: 412.
27. Kang SY, Lee WI, Kim MH, La Jeon Y. Clinical use of anti-DFS70 autoantibodies. *Rheumatol Int* 2019; 39(8): 1423–9.
28. Basu A, Woods-Burnham L, Ortiz G, Rios-Colon L, Figueroa J, Albesa R, et al. Specificity of antinuclear autoantibodies recognizing the dense fine speckled nuclear pattern: preferential targeting of DFS70/LEDGFp75 over its interacting partner MeCP2. *Clin Immunol Orlando Fla* 2015; 161(2): 241–50.
29. EUROLINE ANA profilis 3 plius DFS70 (IgG) tyrimo instrukcija. DL\_1590-30G\_A\_LT\_C03.docx [Internet]. Available from: [www.euroimmun.de](http://www.euroimmun.de)