

Aplikasi Pengujian Antibodi Anti-Nuklear dalam Menentukan Penyakit Autoimun Reumatik Sistemik dan Penyakit Berkaitan

(Application of Anti-Nuclear Antibody Test in Diagnosis of Systemic Autoimmune Rheumatic Diseases and Related Diseases)

ASRUL ABDUL WAHAB*

Jabatan Mikrobiologi dan Imunologi Perubatan, Fakulti Perubatan, Universiti Kebangsaan Malaysia, Jalan Yaacob Latif, 56000 Cheras, Kuala Lumpur, Wilayah Persekutuan, Malaysia

Diserahkan: 27 Ogos 2022/Diterima: 11 Januari 2023

ABSTRAK

Antibodi anti-nuklear (ANA) merupakan salah satu contoh autoantibodi yang boleh terbentuk sebelum berlakunya penyakit autoimun terutamanya penyakit autoimun reumatik sistemik. Disebabkan itu, ANA telah menjadi satu ujian penting yang dipohon oleh pakar klinikal apabila seseorang pesakit tersebut disyaki mempunyai penyakit autoimun. Terdapat pelbagai kaedah makmal yang boleh digunakan untuk mengesan kehadiran ANA dalam darah seseorang pesakit tetapi kaedah imunofluoresen telah dianggap sebagai kaedah makmal yang piawai untuk tujuan penyaringan ANA. Kehadiran ANA ini tidaklah khusus kepada penyakit autoimun kerana tahap kesensitifan dan kekhususannya adalah berbeza-beza bergantung kepada jenis penyakit autoimun. Penggunaan kaedah makmal yang berbeza juga telah menunjukkan kadar kesensitifan dan kekhususannya yang berbeza-beza dalam mengesan ANA. Pentafsiran keputusan ANA untuk sesuatu penyakit autoimun juga terbatas dengan kehadiran ANA yang boleh dikesan dalam kalangan pesakit yang tidak mempunyai penyakit autoimun malah boleh juga dikesan dalam kalangan mereka yang sihat. Maklumat klinikal pesakit menjadi satu unsur yang penting untuk membolehkan pentafsiran ANA yang berkesan dan juga boleh memberikan panduan kepada ujian selanjutnya jika diperlukan. Dalam beberapa tahun kebelakangan ini, pengujian ANA menggunakan kaedah imunofluoresen telah mengalami beberapa pembaharuan termasuklah penubuhan Kesepakatan Corak ANA Antarabangsa (ICAP) dan pembacaan slaid ANA IF secara automasi. Pembaharuan yang berlaku ini adalah ke arah penyeragaman pelaporan pengujian ANA IF. Ulasan ini merangkumi pelbagai kaedah makmal yang boleh digunakan untuk mengesan ANA, kegunaan klinikal keputusan ANA positif dan perkembangan terkini dalam pengujian ANA.

Kata kunci: Antibodi anti-nuklear; asai multiplek; imunoasai enzim; imunofluoresen

ABSTRACT

Anti-nuclear antibody (ANA) is an example of autoantibodies that precedes the development of autoimmune diseases particularly systemic autoimmune rheumatic diseases. Thus, ANA is one of the most common laboratory tests requested by the clinician when there is suspicious of underlying autoimmune disease in a patient. There are various laboratory methods that can be used to detect ANA in patient's blood but for many years' indirect immunofluorescence (IF) is considered as a gold standard for ANA screening. The presence of ANA does not necessarily indicate the individual has autoimmune disease because the sensitivity and specificity of ANA varies according to the underlying diseases. Various laboratory methods were shown to have different sensitivity and specificity in detecting ANA. The interpretation of ANA and clinical diagnosis are also complicated because ANA can be detected in non-autoimmune conditions and in healthy population. Thus, interpretation of ANA requires appropriate clinical information to be clinically useful and at the same time can suggest if further laboratory test is needed. In recent years, ANA test through indirect immunofluorescence method has seen many new developments that include the establishment of the International Consensus of ANA Pattern (ICAP) and automated ANA IF reader. The direction of these new developments is towards harmonization of ANA reporting. This review will provide an overview of different methods of ANA testing, the clinical utility of ANA positivity and recent advances in ANA testing.

Keywords: Anti-nuclear antibody; enzyme immunoassay; immunofluorescence; multiplex assay

PENDAHULUAN

Pengesanan kehadiran antibodi yang dinamakan antibodi anti-nuklear (ANA) merupakan salah satu ujian penting dalam mendiagnosis penyakit autoimun terutamanya penyakit autoimun reumatik sistemik. Antibodi ini merupakan autoantibodi yang terhasil dan bertindak menyerang nukleus sel manusia. Antara penyakit autoimun utama dengan kehadiran ANA ini menjadi faktor penting untuk proses kejadian penyakit dan juga sebagai ujian diagnostik termasuklah penyakit lupus dan sklerosis sistemik. Justeru, pengesanan ANA ini telah menjadi satu ujian rutin di makmal diagnostik untuk seseorang yang menunjukkan gejala seperti penyakit ini.

Prevalens ANA positif menunjukkan perbezaan yang ketara antara satu kajian dengan kajian yang lain. Perbezaan ini bergantung kepada populasi yang dikaji sama ada kajian itu dijalankan dengan melibatkan penduduk sesuatu tempat secara umumnya ataupun jika ia dijalankan berdasarkan kepada sampel pesakit klinikal di makmal diagnostik. Kajian di Malaysia menunjukkan prevalens ANA positif adalah pada kadar 18.4% dalam kalangan 3163 pesakit di sebuah hospital (Rajalingam, Sakthiswary & Hussein 2013). Dalam satu kajian lain yang dilakukan di Turki, kadar ANA positif yang dilaporkan adalah 15.8% dengan seramai 3127 pesakit klinikal di makmal diagnostik mereka terlibat (Mengeloglu et al. 2014). Kajian seterusnya yang dijalankan di Amerika Syarikat mendapati prevalens ANA positif adalah pada kadar 13.8% bagi populasi penduduk yang berumur 12 tahun dan ke atas (Satoh et al. 2012). Dinse et al. (2020) pula melaporkan kenaikan prevalens ANA positif dalam kalangan populasi penduduk Amerika Syarikat pada tiga tempoh masa yang berbeza iaitu daripada 11.0% (1988-1991) kepada 11.5% (1999-2004) dan seterusnya menaik lagi kepada 15.9% (2011-2012). Prevalens ANA juga mungkin dipengaruhi oleh faktor jantina. Kajian menunjukkan golongan wanita selalunya mempunyai kadar ANA positif adalah lebih tinggi berbanding lelaki. Penemuan ini telah dilaporkan dalam kebanyakan kajian terdahulu (Guo et al. 2014; Satoh et al. 2012). Umur juga mungkin mempengaruhi kadar ANA positif. Terdapat laporan yang menunjukkan kadar ANA positif adalah lebih tinggi dalam kalangan kanak-kanak berbanding populasi dewasa. Perkara ini dapat dilihat pada laporan berikut yang menyatakan kadar ANA positif dalam kalangan kanak-kanak di Turki dan Tunisia adalah 27.6% dan 53.9% (Aygün et al. 2019; Mejdoub et al. 2021). Kajian di Thailand pula menunjukkan kadar ANA positif meningkat dalam kalangan mereka yang berumur antara 60 dan 76 tahun (Prapinjunrune et al. 2017).

Satoh et al. (2012) juga melaporkan perkara yang sama dengan kadar ANA positif adalah tinggi dalam kalangan mereka yang berumur 50-an dan juga untuk populasi yang berumur 70 tahun ke atas. Walau bagaimanapun, dalam pelaporan yang lain pula, didapati kadar ANA positif ini berada pada tahap tertinggi dalam kalangan mereka yang berumur lebih muda iaitu pada usia 20-an dan 40-an (Guo et al. 2014). Kajian yang melibatkan pelbagai kategori hospital juga menunjukkan perbezaan ketara prevalens ANA positif ini. Didapati peratusan ANA positif adalah rendah di hospital primer iaitu pada kadar 6.2% berbanding dengan peratusan ANA positif di hospital rujukan atau hospital tertier iaitu pada kadar 16% (Avery et al. 2014). Oleh itu, pelbagai faktor perlu dilihat dalam kajian penentuan kadar prevalens ANA dalam sesuatu populasi.

Terdapat beberapa teori yang mencadangkan bagaimana ANA ini terhasil. Salah satu teori tersebut menyatakan bahawa ia disebabkan oleh proses kematian sel secara fisiologi yang dinamakan sebagai apoptosis. Kehadiran antigen nukleus dalam bleb ataupun lepuhan sel yang mengalami apoptosis ini menyebabkannya terdedah kepada tindak balas oksidatif yang merangsang perubahan kepada struktur protein antigen tersebut. Kejadian ini menyebabkan antigen ANA ini menjadi imunogen dan seterusnya mengaruhkan tindak balas sistem imun terhadap antigen ini (Smeenk 2000). Didapati juga kebanyakan autoantibodi termasuklah ANA sendiri menyerang antigen yang selalunya berada dalam sel. Oleh itu, pembentukan autoantibodi ini hanya boleh terhasil jika antigen ini terdedah ke luar sel sebelum ia boleh dikesan oleh antibodi yang terhasil melalui tindak balas sistem imun. Dalam keadaan fisiologi, pembentukan kompleks antigen-antibodi akan disingkirkan melalui sistem retikuloendotelium tetapi ini tidak berlaku dalam pembentukan keadaan autoimun dengan mekanisme efektor antibodi yang terhasil tidak dapat menyingkirkan antigen ini kerana sifatnya yang dihasilkan secara berterusan (Suurmond & Diamond 2015). Kegagalan proses penyingkiran ini menyebabkan kompleks antigen-antibodi termendap di permukaan tisu badan tertentu dan menyebabkan keradangan pada tisu tersebut. Ini seterusnya menyebabkan antigen dalam tisu tersebut dibebaskan dan proses seterusnya akan berlaku secara berulang sebagai satu kitaran (Suurmond & Diamond 2015).

Ulasan ini bertujuan untuk menerangkan kaedah makmal yang boleh dilakukan untuk mengesan ANA dalam sampel pesakit, kaitan ANA dan penyakit tertentu terutamanya penyakit autoimun reumatik sistemik dan

perkembangan terkini yang melibatkan pengujian ANA ini.

KAEDAH PENGESANAN ANA PADA SAMPEL PESAKIT

Terdapat pelbagai kaedah yang boleh digunakan bagi mengesan kehadiran ANA. Kaedah ini termasuklah imunofluoresen (IF), immunoasai enzim dan asai multipleks. Kaedah ini digunakan di pelbagai makmal di serata dunia dan terdapat pelbagai algoritma diagnostik yang telah diaplikasikan untuk penyaringan ANA ini.

IMUNOFLUORESEN

Kaedah imunofluoresen (IF) merupakan kaedah yang dianggap sebagai piawai dalam menyaring ANA dalam sampel klinikal pesakit (Gautam 2015). Pada permulaannya, tisu buah pinggang atau hati tikus telah digunakan sebagai antigen dalam ujian ini (Gautam 2015; Kumar, Bhatia & Minz 2009). Tisu buah pinggang atau hati tikus ini mempunyai nukleus yang menyebabkan kehadiran ANA dalam darah pesakit dapat dikesan setelah antibodi tersebut melekat kepada nukleus sel buah pinggang tersebut. Kehadiran ANA ini dapat dilihat melalui pengamatan menggunakan mikroskop fluoresen. Sejalan dengan perkembangan teknologi sel kultur, pada masa kini, tisu buah pinggang atau hati tikus tidak lagi digunakan sebagai antigen pada ujian ANA sebaliknya ia telah diganti dengan sel kanser. Sel kanser ini telah dinamakan sebagai HEP-2. Sel HEP-2 ini telah dianggap sebagai antigen piawai dalam ujian ANA ini memandangkan sel ini menunjukkan saiz nukleus yang besar dan pengesanan ANA menjadi lebih mudah (Kumar, Bhatia & Minz 2009). Sel HEP-2 ini sebenarnya berasal daripada sel penyakit kanser larinks dan diletakkan pada slaid kaca. Berbanding dengan penggunaan tisu tikus sebagai antigen, sel HEP-2 ini membolehkan pengesanan sesetengah antigen yang tidak terdapat pada tisu tikus contohnya antigen Ro (SSA), sentromer dan nukleolar (Gautam 2015). Pengesanan dan pengenalpastian corak ANA pada sel HEP-2 ini dapat membantu perawatan pesakit kerana terdapat corak tertentu yang dapat dikaitkan dengan diagnosis sesuatu penyakit (Kumar, Bhatia & Minz 2009; Mahler et al. 2014). Oleh itu, majoriti makmal di dunia telah beralih kepada penggunaan sel HEP-2 dalam pengujian ANA ini.

Walau bagaimanapun, teknik imunofluoresen ini juga mempunyai beberapa kelemahan yang boleh merencatkan penggunaannya sebagai ujian saringan ANA. Dari sudut pengujian di makmal, walaupun terdapat banyak antigen yang boleh dikenal pasti tetapi keputusan ANA ini perlu

ditafsirkan dengan lebih berhati-hati kerana tidak semua antigen diketahui kepentingan klinikalnya. Pada masa ini, terdapat pelbagai pengeluar yang menghasilkan kit ujian ANA secara komersial. Semua kit ANA ini digunakan di pelbagai makmal diagnostik dan masalah yang timbul adalah terdapat perbezaan yang ketara dalam kemampuan pengesanan ANA antara pengeluar ini (Ling & Murali 2019). Oleh itu, keputusan yang diperoleh pesakit yang sama daripada makmal yang berlainan menggunakan kit diagnostik yang berbeza adalah tidak tekal. Dalam satu kajian yang dijalankan terhadap 101 sampel pesakit didapati tahap persamaan antara dua kit komersial yang berbeza adalah hanya pada kadar 18% apabila menggunakan kriteria yang ketat dan 42% apabila kriteria yang lebih longgar digunakan (Abeles et al. 2016). Jadi tahap persetujuan antara kit tersebut adalah sangat rendah iaitu di bawah paras 50%. Selain daripada itu, pelaksanaan ujian ANA IF ini juga memerlukan seseorang petugas makmal yang kompeten dalam menjalankan ujian tersebut. Petugas makmal ini juga perlu kompeten dalam mentafsir kehadiran ANA dan juga mengenal pasti corak ANA IF pada sampel klinikal (Ling & Murali 2019). Makmal yang menjalankan ujian ANA IF ini memerlukan petugas yang berkemahiran tinggi dan mereka ini perlu terus dilatih untuk mengekalkan tahap kompetensi mereka.

Dari aspek klinikal pula, ujian ANA IF ini telah didapati mempunyai kadar kesensitifan dan kekhususan yang pelbagai bergantung kepada jenis penyakit autoimun tersebut. Sebagai contoh, untuk penyakit lupus didapati kadar kesensitifan ujian ANA IF ini mencapai tahap 95% tetapi kadar kekhususannya adalah hanya pada kadar 20%. Masalah yang serupa juga berlaku kepada sampel rutin pesakit. Jika ujian ANA IF ini dilakukan kepada semua pesakit tanpa melihat kepada kebarangkalian mereka mempunyai penyakit autoimun, maka prestasi ujian ini juga akan turut terkesan. Masalah yang lebih utama adalah jika berlakunya kadar ralat positif yang tinggi dan pesakit tersebut sebenarnya tidak mempunyai penyakit autoimun tetapi ujian ANA adalah positif. Mereka yang mempunyai keputusan ralat ANA positif ini sudah semestinya perlu menjalani ujian lanjutan untuk memastikan mereka sebenarnya bebas daripada penyakit ini. Ujian lanjutan ini pula selalunya mahal dan hanya dilakukan di makmal tertentu.

Pelaporan keputusan ANA secara IF ini melibatkan pelaporan corak dan pencairan terakhir yang memberikan pembacaan positif. Corak dan pencairan ini boleh memberikan impak kepada diagnosis dan pengurusan pesakit. Corak ANA IF pada sel HEP-2 ini boleh

dikategorikan kepada nukleus, sitoplasma dan mitosis. Penubuhan Kesepakatan Corak ANA Antarabangsa (ICAP) merupakan satu percubaan di peringkat global dalam menyelaraskan pelaporan corak ANA (Chan et al. 2015). Menurut ICAP, corak ANA IF ini kemudiannya dibahagikan lagi kepada corak yang bertaraf kompeten dan corak yang memerlukan kepada kepakaran dalam menginterpretasikan corak yang dilihat (Chan et al. 2015). Corak pada nukleus sel HEp-2 merupakan corak yang biasa dilaporkan di makmal diagnostik yang menjalankan ujian ini. Kesemua corak nukleus ini dikategorikan sebagai kompeten dan tidak seharusnya berlaku kesilapan dalam melaporkan corak ini. Corak nukleus yang biasa dikesan dalam sampel klinikal pesakit termasuklah corak homogen, berbintik, nukleolar dan sentromer. Corak ini dikesan dengan ciri tertentu. Hal ini dilakukan dengan melihat kepada pewarnaan fluoresen yang berlaku pada sel rehat dan sel yang sedang bermitosis.

CORAK IMUNOFLOURESEN

Corak homogen berlaku apabila pewarnaan fluoresen adalah sekata dan menyeluruh pada bahagian nukleus sel pada peringkat interfasa. Pancaran fluoresen yang serupa juga dapat dilihat pada plat kromatin pada sel yang sedang bermitosis iaitu sel yang sedang berada pada peringkat metafasa. Nukleolar sel ini juga tidak dapat dilihat dengan jelas kerana pewarnaan fluoresen yang menyeluruh dan sekata. Walau bagaimanapun, ada masanya bahagian nukleolar ini terkecuali daripada pewarnaan fluoresen ini (Chan et al. 2015). Gambar 1(a) dalam Rajah 1 menunjukkan corak homogen ini. Autoantibodi yang tipikal berkaitan dengan corak pewarnaan fluoresen ini adalah anti-dwibebeban DNA (dsDNA) (Demoiseaux et al. 2019).

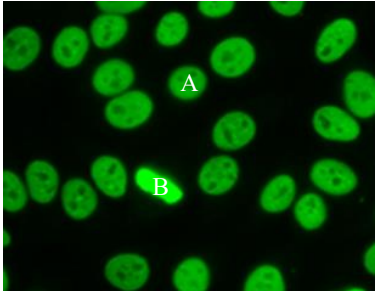
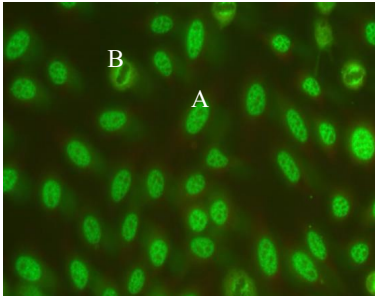
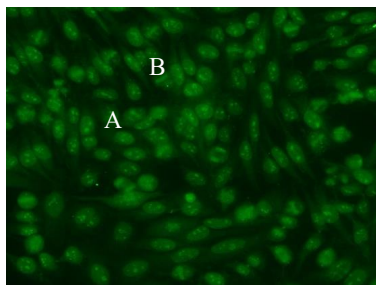
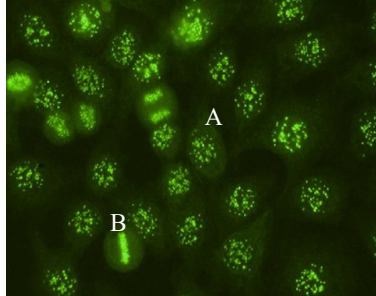
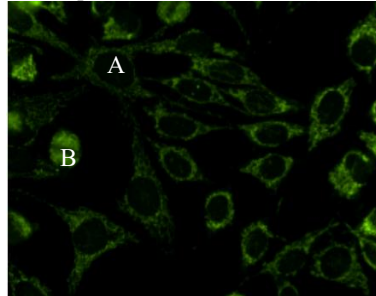
Corak seterusnya adalah corak berbintik seperti ditunjukkan pada Gambar 1(b) dalam Rajah 1. Corak ini dapat dikenali apabila pewarnaan fluoresen pada nukleus sel interfasa adalah tidak sekata dan kelihatan seperti berlubang. Pewarnaan fluoresen ini juga dikatakan bersifat bergranul (Buchner et al. 2014). Nukleolar pada sel ini ada yang ditutupi dengan fluoresen dan ada juga yang tidak terwarna fluoresen. Plat kromatin pada sel yang sedang bermitosis iaitu pada peringkat metafasa, anafasa dan telofasa juga tidak menerima pewarnaan fluoresen (Chan et al. 2015; Sur et al. 2018). Corak ini merupakan corak yang kerap dikenal pasti dalam sampel pesakit yang diuji dengan ujian ANA IF ini (Sur et al. 2018). Corak ini juga boleh dikategorikan lagi kepada corak yang halus atau kasar (Sur et al. 2018). Terdapat pelbagai autoantibodi yang boleh dikaitkan dengan corak

ini. Contoh autoantibodi tersebut termasuklah anti-SSA/Ro, anti-SSB/La dan anti-ribonukleoprotein (RNP) (Demoiseaux et al. 2019).

Corak fluoresen yang secara majoritinya mewarnai bahagian nukleolar dalam sel interfasa HEp-2 dinamakan sebagai corak nukleolar (Chan et al. 2015). Corak nukleolar ini mempunyai pewarnaan fluoresen yang berbeza pada plat kromatin dalam sel pada fasa mitosis seperti metafasa dan ia boleh seperti yang didapati pada corak homogen atau corak berbintik-bintik seperti yang ditunjukkan pada Gambar 1(c) dalam Rajah 1. Corak fluoresen pada nukleolar sel interfasa ini juga boleh menghasilkan corak homogen atau berbintik (Buchner et al. 2014). Jadi, secara lebih terperinci corak nukleolar ini adalah lebih rumit dan dapat dibahagikan kepada tiga jenis iaitu nukleolar homogen, nukleolar gumpalan dan nukleolar berbintik (Sur et al. 2018). Setiap corak ini mempunyai kaitan dengan autoantibodi yang tertentu. Antara autoantibodi yang dikaitkan dengan corak ANA ini adalah anti-U3RNP/fibrillarin dan anti-PM/Scl antibodi (Demoiseaux et al. 2019).

Corak fluoresen nukleus yang berikutnya adalah corak sentromer. Corak ini dapat dikenal pasti dengan melihat pada sel yang bermitosis. Pada sel di peringkat metafasa ini, terdapat tompok fluoresen yang diskret yang membentuk corak yang dikenali sebagai bar metafasa (Buchner et al. 2014). Manakala pada sel interfasa pula, terdapat antara 40 hingga 60 bintik fluoresen diskret ini yang memenuhi keseluruhan nukleus sel (Buchner et al. 2014; Sur et al. 2018). Corak ini ditunjukkan pada Gambar 1(d) dalam Rajah 1. Antara autoantibodi yang menyebabkan terhasilnya corak sentromer ini adalah anti-CENP-A, -B, -C, -D, -E, dan -G (Sur et al. 2018). Corak sentromer ini adalah lebih menjurus kepada anti-CENP-B (Demoiseaux et al. 2019).

Corak pada sitoplasma sel juga dapat diamati pada sel HEp-2 ini. Corak sitoplasma ini merujuk kepada pewarnaan fluoresen yang dapat dilihat pada bahagian sitoplasma sel tanpa mengambil kira sama ada pewarnaan fluoresen juga berlaku pada bahagian nukleus atau sel mitosis. Terdapat beberapa jenis corak sitoplasma yang telah dikategorikan mengikut pewarnaan fluoresen tersebut. Antara corak sitoplasma yang tipikal adalah corak retikular. Corak retikular ini adalah seperti mana yang ditunjukkan pada Gambar 1(e) dalam Rajah 1, dengan corak ini digambarkan sebagai pewarnaan fluoresen yang berbentuk filamen bergranular yang kasar menyeberangi sel dari sampul nukleus serta menirus pada bahagian akhir sitoplasma dan membran sel (Chan et al. 2015). Autoantibodi yang terhasil adalah

Corak Fluoresen	Penerangan
<p>1a: Homogen</p> 	<p>A: Sel interfasa menunjukkan pewarnaan yang sekata dan adakalanya pewarnaan pada bahagian nukleolar tidak berlaku</p> <p>B: Plat kromatin pada sel metafasa juga menunjukkan pewarnaan fluoreesen yang ketara</p>
<p>1b: Berbintik-bintik</p> 	<p>A: Sel interfasa menunjukkan pewarnaan yang tidak sekata dan terdapat lompong yang ketara</p> <p>B: Plat kromatin pada sel metafasa pula tidak menunjukkan pewarnaan fluoreesen berbanding dengan apa yang berlaku pada corak homogen</p>
<p>1c: Nukleolar</p> 	<p>A: Sel interfasa menunjukkan pewarnaan yang ketara pada bahagian nukleolar. Pewarnaan nukleolar ini juga boleh berlaku secara homogen atau berbintik</p> <p>B: Plat kromatin pada sel metafasa pula boleh mengambil fluoreesen sepertimana yang berlaku pada corak homogen ataupun tidak mengambil fluoreesen seperti mana yang berlaku pada corak berbintik</p>
<p>1d: Sentromer</p> 	<p>A: Sel interfasa menunjukkan pewarnaan fluoreesen seolah-olah mempunyai 40-60 bintik fluoreesen yang diskret</p> <p>B: Plat kromatin pada sel metafasa juga menunjukkan pewarnaan fluoreesen yang diskret dan membentuk apa yang dinamakan sebagai bar metafasa</p>
<p>1e: Sitoplasma</p> 	<p>A: Sel interfasa tidak menunjukkan pewarnaan fluoreesen pada bahagian nukleus tetapi ia berlaku pada bahagian sitoplasma sahaja</p> <p>B: Plat kromatin pada sel metafasa juga tidak menunjukkan pewarnaan fluoreesen</p>

RAJAH 1. Corak fluoreesen antibodi anti-nuklear yang biasa dilihat dalam makmal diagnostik dan penerangan bagaimana corak tersebut dikenal pasti melalui sel interfasa (A) dan sel metafasa (B)

terhadap mitokondria yang terdapat pada bahagian sitoplasma sel tersebut. Oleh itu, autoantibodi ini juga dikenali sebagai anti-mitokondria antibodi (Chan et al. 2015). Corak fibrilar pada sitoplasma merupakan satu lagi corak yang tipikal. Corak fibrilar ini dapat dilihat dalam bentuk selari, filamen dan segmental. Bentuk-bentuk ini mewakili autoantibodi yang terhasil kepada antigen yang berbeza. Sebagai contoh, corak fibrillar linear terhasil disebabkan oleh kehadiran autoantibodi yang boleh bertindak balas terhadap antigen aktin yang terdapat dalam sitoplasma sel tersebut (Demoiseaux et al. 2019).

Corak mitosis pula mewakili pewarnaan fluoresen yang terang pada sel mitosis. Terdapat beberapa corak mitosis yang boleh dilihat. Corak NuMa adalah salah satu corak yang dapat diamati dan corak NuMa ini diterangkan sebagai kehadiran fluoresen yang terang pada bahagian perisentriol dan juga pada bahagian spindle mitosis pada sel metafasa tetapi pada masa yang sama juga ia mempunyai corak berbintik pada sel interfasa. Corak NuMa ini adalah disebabkan oleh antigen yang dinamakan sebagai centrophilin (Demoiseaux et al. 2019). Pewarnaan fluoresen pada fiber spindle adalah antara corak mitosis yang lain. Corak fiber spindle ini mewakili pewarnaan fluoresen yang menyeluruh pada apparatus spindle daripada bahagian polar terus kepada plat kromatin pada sel dalam fasa mitosis. Kromosom pada plat kromatin tersebut tidak terwarna dengan warna fluoresen. Fluoresen pada sel interfasa pula adalah tidak tekal dan tidak boleh untuk dikaitkan dengan mana-mana corak nukleus (Chan et al. 2015). Corak mitosis ini dikategorikan sebagai corak yang jarang dilihat dan kaitannya dengan penyakit autoimun seperti lupus masih belum dapat dibuktikan secara kukuh.

PENTITRATAN IMUNOFLUORESEN

Pentitratan kepekatan antibodi ini merupakan satu lagi unsur penting dalam pelaporan keputusan ujian ANA. Dalam pengujian ANA melalui kaedah imunofluoresen ini, kepekatan ANA ini tidak dilaporkan secara kuantitatif sebaliknya ia dilaporkan dengan menggunakan kaedah separa kuantitatif iaitu dengan melaporkan kadar pencairan ataupun titer antibodi tersebut. Pelaporan menggunakan kaedah ini tidak menggunakan unit ukuran tertentu sebaliknya adalah berdasarkan kepada nisbah pencarian antibodi tersebut. Pencairan secara berganda digunakan di kebanyakan makmal dan pencairan terakhir yang menunjukkan imunofluoresen yang positif dijadikan titer antibodi untuk sesuatu sampel pesakit.

Titer yang digunakan sebagai titer awal untuk saringan ujian ini adalah tidak piawai. Terdapat pelbagai

variasi dalam penentuan titer saringan ini. Berdasarkan kepada kajian terdahulu titer yang digunakan sebagai permulaan saringan ANA adalah 1:40, 1:80 atau 1:160. Keupayaan pada setiap titer ini juga menunjukkan hasil yang berbeza. Dalam satu ulasan didapati lebih kurang 50% makmal di seluruh dunia menggunakan titer 1:40 sebagai titer saringan (Pashima et al. 2021). Sebenarnya satu kajian populasi yang menyeluruh adalah perlu dalam menentukan permulaan titer saringan ANA IF ini. Adalah dicadangkan supaya kadar penentu titer saringan ini adalah berpadanan dengan titer pada persentil ke-95 dan ia juga mesti berdasarkan kepada kumpulan umur dan jantina populasi tersebut (Iruire-Ventura & Lopez-Hoyos 2022).

Secara amnya, ANA IF ini juga boleh dikesan pada mereka yang sihat. Populasi yang sihat ini selalunya dijadikan sebagai kumpulan kawalan negatif dalam menghitung ketepatan sesuatu ujian. Kajian menunjukkan kadar ANA positif dalam kalangan mereka yang sihat akan menurun apabila titer ANA meningkat (Pashmina et al. 2021). Jika titer awal saringan ini dinaikkan, kadar pengesanan ANA untuk mereka yang berpenyakit juga akan terencat. Dalam satu kajian oleh Brito et al. (2014), didapati kadar kesensitifan ujian ini berubah daripada 87.7% pada titer 1:80 kepada 82% pada titer 1:160. Dalam satu analisis yang dilakukan, penemuan yang sama juga dilaporkan dengan kadar kesensitifan ANA menurun secara mendadak dari 92.8% untuk titer 1:80 kepada 82.1% untuk titer 1:160 (Jeong et al. 2018). Walau bagaimanapun, kedua-dua kajian tersebut tetap mencadangkan titer 1:160 sebagai titer terbaik untuk saringan ANA memandangkan nilainya yang lebih bermakna untuk penyakit SLE pada titer tersebut (Brito et al. 2014; Jeong et al. 2018). Sebenarnya titer 1:80 adalah titer ANA positif IF yang telah dimasukkan dalam kriteria untuk penyakit SLE dan pada titer ini kadar kesensitifan untuk penyakit SLE adalah 97.8% (Iruire-Ventura & Lopez-Hoyos 2022).

PENGESANAN ANTIBODI ANTI-NUKLEAR SELAIN KAEDAH IMUNOFLUORESEN

Apabila kaedah selain imunofluoresen digunakan untuk mengesan ANA, ia dapat dibahagikan kepada dua kategori iaitu pengesanan ANA secara keseluruhan dan pengesanan ANA secara khusus dengan antibodi yang lebih khusus dikenal pasti contohnya anti-dsDNA, anti-Smith (Sm) dan anti-RNP. Antigen seperti dsDNA, Sm dan RNP ini merupakan komponen nukleus manusia. Pengesanan antibodi khusus ini boleh dilakukan secara tunggal atau pun boleh dijalankan secara multipleks.

Antara kaedah makmal yang biasa digunakan adalah ELISA, kempendarcahaya dan imunoblot.

Kaedah ELISA merupakan kaedah yang paling biasa digunakan untuk mengesan ANA secara keseluruhannya. Ia kerap digunakan di makmal besar dan ANA ELISA digunakan sebagai ujian saringan awal. Jika ANA ELISA ini positif, maka ujian ANA IF akan dilaksanakan untuk menentukan corak dan titrasinya. Kajian telah menunjukkan prestasi kaedah ELISA yang baik untuk memungkinkannya dijadikan ujian saringan menggantikan kaedah imunofluoresen. Dalam satu kajian terdahulu, didapati tahap kesensitifan ANA ELISA ini adalah lebih baik berbanding ANA IF. Kadar ANA positif ELISA pada 74.8% adalah lebih baik berbanding 63.3% untuk ANA IF melibatkan keseluruhan populasi pesakit penyakit autoimun reumatik sistemik termasuklah penyakit SLE (Alsaed et al. 2021). Kajian yang sama juga menunjukkan kadar kekhususan ANA ELISA adalah lebih baik sedikit berbanding ANA IF (Alsaed et al. 2021). Kajian de Almeida Brito et al. (2016) pula melaporkan keputusan ANA ELISA yang pelbagai berbanding ANA IF. Dalam kajian ini terdapat tiga jenama ANA ELISA yang telah digunakan untuk dibandingkan dengan ANA IF. Kadar kesensitifan ANA ELISA dilaporkan antara 76.2%-90.0% berbanding 87.4% oleh ANA IF manakala kadar kekhususan telah dilaporkan antara 45.2%-60.4% untuk ANA ELISA berbanding 72.3% untuk ANA IF (de Almeida Brito et al. 2016). Tonutti et al. (2004) pula telah melaporkan kadar ANA positif ELISA antara 74%-94% berbanding ANA IF pada kadar 92%. Kajian ini menggunakan lima jenama ANA ELISA yang berbeza dan perkara penting yang ditunjukkan dalam kajian ini adalah kadar positif antara 25%-67% dilaporkan dalam kalangan mereka yang menunjukkan ANA IF negatif (Tonuttia et al. 2004). Laporan kajian yang membandingkan kaedah imunofluoresen, fluoresen immunoasai enzim dan kempendarcahaya mendapati kadar kesensitifan tertinggi adalah pada kaedah imunofluoresen (95%) manakala kadar kekhususan terbaik pula adalah dengan menggunakan kaedah fluoresen immunoasai enzim (97.5%) (Claessens et al. 2018). Dalam kajian yang melibatkan temujanji susulan ke atas pesakit yang memberikan keputusan ANA IF positif tetapi ANA ELISA negatif mendapati mereka ini menunjukkan gejala yang menyerupai pesakit dengan ANA ELISA dan ANA IF negatif. Daripada keputusan ini, penyelidik telah menyimpulkan pengenalan ANA ELISA sebagai ujian saringan ANA dapat mengurangkan pesakit yang perlu dirujuk kepada pakar reumatologi hanya kerana keputusan ANA yang positif (Maguire et al. 2009). Di samping itu, didapati juga mereka yang dikesan

positif melalui platform alternatif ini adalah lebih tinggi untuk diberikan diagnosis penyakit autoimun reumatik sistemik (Op De Beeck et al. 2011). Kajian lanjut untuk membandingkan kebolehpayaan ANA ELISA berbanding ANA IF perlu dilakukan dalam menentukan sama ada ANA ELISA atau ANA IF yang terbaik untuk dijadikan sebagai ujian saringan ANA.

Bagi pengujian ANA secara kaedah multiplex pula, kaedah yang boleh digunakan termasuklah imunoblot, asai bermanik multiplex dan mikrotatasusunan. Kelebihan kaedah multiplex ini adalah ia membolehkan pengesanan pelbagai autoantibodi dengan sekali pengujian sahaja berbanding kaedah ELISA yang selalunya membenarkan pengesanan satu autoantibodi sahaja untuk sekali pengujian (Satoh, Tanaka & Chan 2015). Selain itu kaedah ini juga adalah menjimatkan dalam pelbagai aspek pengujian makmal termasuklah jumlah masa pengujian, bahan pengujian, tenaga pekerja yang terlibat dan sistem ini juga dapat mengendalikan jumlah sampel yang banyak dengan cekap (Satoh, Tanaka & Chan 2015). Terdapat pelbagai jenis jenama asai multiplex yang berada di pasaran pada masa kini. Kajian terdahulu menunjukkan keputusan pengujian untuk sampel yang sama menggunakan pelbagai asai multiplex ini adalah tidak tekal. Kajian oleh Copple et al. (2007) menggunakan tiga jenama asai multiplex yang berbeza menunjukkan keputusan pengujian oleh ketiga-tiga jenama ini tidak berkait antara satu sama lain walaupun untuk serum pesakit lupus. Perbezaan yang berlaku ini mungkin disebabkan oleh perbezaan kandungan antigen yang terdapat pada setiap jenama tersebut dan sumber penghasilan antigen yang pelbagai. Walau bagaimanapun, kehadiran pelbagai autoantibodi dalam seseorang pesakit adalah amat membantu dalam diagnosis penyakit autoimun ini.

IMPLIKASI UJIAN ANTIBODI ANTI-NUKLEAR TERHADAP PESAKIT

Pakar yang memohon ujian ini didapati telah berubah daripada pakar reumatologi kepada lebih banyak bidang kepakaran yang lain. Permintaan ujian secara meluas ini telah mengecilkkan prestasi kebarangkalian penyakit autoimun sebelum ujian dilakukan (Iruire-Ventura & Lopez-Hoyos 2022). Kajian yang dijalankan di Korea mendapati daripada keseluruhan permintaan ANA ini hanya 0.69% pesakit sahaja yang didiagnos dengan penyakit autoimun reumatik dan jumlah ini sebenarnya hanyalah mewakili 4.4% daripada keputusan ANA positif (Kang et al. 2022). Majoriti pesakit dengan ANA positif tidak akan mengalami penyakit autoimun,

namun penghasilan ANA ini merupakan salah satu daripada perkara awal yang terjadi sebelum seseorang itu mengalami gejala penyakit ini. Ini adalah kerana ANA boleh dikesan lima tahun lebih awal sebelum seseorang itu mendapat gejala penyakit lupus (Pisetsky 2020). Kehadiran ANA adalah lebih sinonim dengan penyakit autoimun tertentu yang tergolong dalam penyakit autoimun reumatik sistemik berkait ANA. Penyakit eritematosus lupus sistemik (SLE) dan sklerosis sistemik adalah antara dua contoh penyakit ini dan kadar ANA positif pada kedua-dua penyakit adalah melebihi 90%. Dalam keadaan ini terdapat autoantibodi ANA yang khusus yang boleh dikaitkan dengan diagnosis keadaan tersebut. Anti-DNA dan anti-Sm adalah antibodi yang khusus untuk diagnosis penyakit SLE (Pisetsky et al. 2017). Anti-sentromer pula dikatakan lebih prevalen dalam kalangan pesakit sklerosis sistemik manakala anti-SSA/Ro pula lebih menjurus kepada diagnosis Sindrom Sjogren. Kehadiran autoantibodi ini boleh juga dikaitkan dengan corak ANA IF yang diperhatikan (Tebo 2017). Terdapat laporan yang menunjukkan kehadiran corak periferi pada pesakit SLE mempunyai perkaitan dengan tahap serius penyakit tersebut dengan tahap antibodi anti-dsDNA berada pada bacaan tertinggi dan komplemen C4 pula berada pada kepekatan terendah (Al-Mughales 2022). Kehadiran ANA ini tidak khusus kepada penyakit autoimun sistemik sahaja tetapi juga boleh berlaku dalam keadaan autoimun yang melibatkan sistem hepatobiliari. ANA yang positif pada penyakit autoimun hepatobiliari ini menunjukkan autoantibodi ini menyerang antigen khusus untuk penyakit tersebut. Target ANA bagi penyakit hepatitis autoimun adalah kromatin manakala bagi penyakit biliari kolangitis primer pula antigennya adalah histon (Liberal, Mieli-Vergani & Vergani 2013).

Kajian terdahulu juga mendapati ANA boleh positif dalam kalangan mereka yang tidak mengalami penyakit autoimun. Dalam satu kajian, didapati kadar ANA positif adalah 18.3% bagi populasi pesakit kanser, penyakit berjangkit, penyakit biasa yang tidak berjangkit dan penyakit mental manakala 12.3% daripada individu sihat juga menunjukkan keputusan yang sama (Agustinelli et al. 2019). Kajian dalam kalangan mereka yang mengalami penyakit berjangkit juga menunjukkan ANA boleh positif dalam keadaan ini. Salah satu sebab mengapa jangkitan kuman boleh menyebabkan fenomena autoimun adalah disebabkan struktur protein bakteria yang boleh menyerupai struktur protein sel manusia dengan penghasilan antibodi yang sepatutnya akan bertindak terhadap jangkitan sebaliknya bertindak menyerang sel badan manusia. Kajian ke atas kehadiran

anti-dsDNA membuktikan fenomena ini. Kajian lanjut menunjukkan anti-dsDNA yang terhasil dalam tindak balas terhadap jangkitan dan penyakit lupus adalah berbeza dengan IgG2 dihasilkan dalam kalangan mereka yang mengalami jangkitan manakala IgG1 dihasilkan dalam kalangan mereka yang mengalami lupus (Litwin & Binder 2016). Antibodi anti-nuklear ini juga didapati positif dalam kalangan mereka yang mengalami jangkitan virus hepatitis. Dalam satu kajian yang melibatkan pesakit virus Hepatitis A akut, ANA telah positif pada kadar yang agak tinggi iaitu 42.4% (Seo et al. 2011). Walau bagaimanapun, kehadiran ANA ini tidak memberikan kesan kepada prognosis jangkitan kerana tidak terdapat perbezaan ketara antara pesakit ANA positif dan ANA negatif. Di samping itu, ANA tidak dapat dikesan lagi selepas tiga bulan pada majoriti pesakit (Seo et al. 2011). Kajian berikutnya yang melibatkan pesakit dijangkiti virus Hepatitis C pula mendapati kadar ANA positif yang khusus adalah lebih tinggi berbanding populasi individu yang sihat. Antara ANA khusus yang dikesan adalah anti-SSA, anti-dsDNA dan anti-RNP antibodi (Litwin & Rourke 2018). Kajian juga turut dilakukan kepada pesakit yang mengalami COVID-19. Kadar ANA positif telah dilaporkan antara 18 ke 21.3% (Chang, Minn & Kim 2021; Peker, Şener & Kaptan Aydoğmuş 2021). Dari aspek prognosis pesakit, didapati status ANA ini tidak mempengaruhi kadar kematian pesakit COVID-19 (Chang, Minn & Kim 2021). Terdapat kajian lain yang menunjukkan pesakit COVID-19 yang menunjukkan ANA positif mempunyai prognosis lebih teruk berbanding mereka yang ANA negatif tetapi kesimpulan yang kukuh tidak dapat dibuat memandangkan sampel kajian yang kecil pada kajian tersebut (Muratori et al. 2021). Antibodi anti-nuklear juga boleh didapati positif dalam kalangan mereka yang mengalami jangkitan kronik dan juga mereka yang dijangkiti oleh bakteria yang boleh hidup dalam sel manusia. Antara contoh jangkitan tersebut termasuklah tuberkulosis dan sifilis (Im et al. 2020).

Oleh itu, ANA positif tidak semestinya seseorang itu mempunyai penyakit autoimun tetapi diagnosis akhir seseorang pesakit itu bergantung kepada pelbagai perkara lain termasuklah penilaian klinikal dan keputusan-keputusan ujian yang lain. Walau bagaimanapun, keputusan ujian ANA yang negatif didapati sangat membantu untuk membolehkan diagnosis pesakit tidak menjurus kepada penyakit autoimun reumatik sistemik. Penggunaan algoritma diagnostik dalam ujian ANA dengan maklumat klinikal pesakit dapat diberikan supaya ia boleh digunakan untuk pakar di makmal mencadangkan ujian selanjutnya jika perlu. Ini dapat mengoptimalkan

proses kerja ujian ANA dan memberikan manfaat kepada pakar yang merawat pesakit (Bizzaro & Wiik 2004).

PERKEMBANGAN TERKINI UJIAN ANTIBODI ANTI-NUKLEAR

Dalam dekad ini, perkembangan terkini ANA lebih tertumpu kepada ujian ANA IF. Keseragaman dalam pelaporan ujian ANA IF ini menjadi agenda utama di samping usaha yang dilakukan untuk mengurangkan kepelbagaian pelaporan antara makmal. Penubuhan ICAP dilihat sebagai salah satu usaha melibatkan pakar di seluruh dunia untuk memberikan pendapat mereka dalam pengenalpastian corak ANA IF. Perbincangan secara berkala yang dilaksanakan oleh pakar ini membolehkan satu kesepakatan dapat dicapai dalam hal berkaitan corak ANA IF dan kaitannya dengan diagnosis klinikal pesakit.

Penggunaan teknologi baharu juga sudah diadaptasi di makmal tertentu. Teknologi terbaharu melibatkan ujian ANA IF ini ialah penggunaan perisian dalam penafsiran corak dan titrasi ANA IF. Terdapat pelbagai syarikat yang terlibat dalam pengujian ANA IF ini telah menghasilkan perisian ini. Ini memudahkan pengguna dalam melakukan penafsiran ANA IF dan mempercepatkan proses ini. Kajian awal menunjukkan penggunaan teknologi baharu ini memberikan impak yang positif dari aspek penilaian kemampuan diagnostiknya. Laporan kajian yang dijalankan oleh Voigt et al. (2012), menunjukkan penggunaan teknologi ini mencapai tahap 99.4% persetujuan jika dibandingkan dengan pembacaan secara manual. Begitu juga dengan laporan yang dihasilkan oleh Yoo et al. (2017) dengan kadar persetujuan yang dicapai adalah 94.2% dengan skor kappa yang cemerlang iaitu 0.860. Kedua-dua kajian ini mengamalkan pembacaan slaid imunofluoresen ANA secara automatik EURO Pattern (Euroimmun, Jerman) dan dibandingkan dengan pembacaan slaid imunofluoresen ANA secara manual. Terdapat juga kajian lain yang melaporkan penggunaan pembacaan slaid imunofluoresen ANA menggunakan pengeluar yang lain. Kajian yang menggunakan NOVA View (INOVA Diagnostics, San Diego, California) pula mendapati kadar diskriminasi keputusan positif dan negatif mencapai 96.5% dibandingkan dengan pembacaan secara manual pada titrasi saringan 1:40. Skor kappa yang cemerlang juga dilaporkan dalam kajian tersebut dan ia adalah pada skor 0.92 (Copple et al. 2014). Seterusnya, pencapaian HELIOS (Aesku Diagnostics, Wendelsheim, Jerman) pula menunjukkan kadar positif dan negatif melebihi 90% dengan kajian ini telah dijalankan di lapan buah makmal yang berbeza di negara China (Li et al. 2020). Kajian lain yang

menggunakan enam sistem diagnostik dibantu perisian komputer mendapati kesensitifan keseluruhan sistem ini mencapai tahap yang memberangkan iaitu pada 96.7% dengan tahap kekhususan pula pada 89.2%. Keadaan ralat negatif dalam kajian ini didapati disebabkan oleh tahap kepekatan fluoresen yang rendah menyebabkan adakalanya ia tidak dapat dikesan (Bizarro et al. 2014). Kelebihan penggunaan sistem automasi ini juga telah menunjukkan perbezaan yang ketara dari segi kecepatan pemrosesan sampel pesakit dan ia didapati dapat mengurangkan tempoh pengujian kepada waktu yang lebih singkat dan seperti laporan sebelum ini, ia juga memberikan persetujuan yang sangat baik iaitu pada kadar 95.6% dibandingkan dengan pembacaan secara manual (Ricchiuti et al. 2018). Penggunaan teknologi ini juga diharapkan dapat memberikan keseragaman dalam pembacaan slaid ANA IF ini antara makmal yang menjalankan pengujian ini. Rigon et al. (2017) telah menunjukkan keputusan kajian mereka yang dijalankan di tiga makmal yang berbeza dengan persetujuan antara ketiga-tiga makmal ini dalam membaca slaid ANA IF yang sama menggunakan kaedah bantuan perisian telah mencapai kadar yang memuaskan dengan skor purata kappa 0.627. Pembacaan slaid ANA IF melalui kaedah terbaharu menjadi satu peluang untuk memurnikan tujuan ini tetapi ia perlu dikawal oleh program jaminan kualiti yang berkesan (Van den Bremt et al. 2017).

Walau bagaimanapun, masih terdapat kelemahan dalam penggunaan perisian ini. Kajian yang dilakukan menunjukkan bahawa masih terdapat perbezaan penafsiran antara perisian ini. Perbezaan ini menyebabkan kesepakatan penafsiran antara pengeluar tidak dapat dilaksanakan. Di samping itu, tidak semua corak ANA IF ini dapat ditafsirkan oleh perisian dan ada juga perisian yang gagal menafsir corak berganda yang hadir dalam sesuatu sampel (Meroni et al. 2014). Perisian ini juga sebenarnya membolehkan penentuan kepekatan akhir ANA IF pada titrasi saringan. Namun begitu, fungsi ini didapati masih tidak dapat diseragamkan secara sepenuhnya kerana masih lagi terdapat perbezaan antara kepekatan sebenar dan kepekatan yang dianggarkan oleh perisian ini.

KESIMPULAN

Ujian antibodi anti-nuklear ini sudah menjadi ujian rutin dalam penentuan penyakit autoimun terutamanya penyakit autoimun reumatik sistemik. Walau bagaimanapun, keputusan ANA yang positif perlu menjadi kriteria sokongan bukannya kriteria utama dalam diagnosis penyakit ini kerana ia boleh juga didapati dalam penyakit

bukan autoimun. Perkembangan terkini ujian ANA terutamanya menggunakan kaedah imunofluoresen memberikan peluang untuk penyeragaman hasil ujian ini antara pengeluar ANA menerusi penggunaan perisian yang piawai.

PENGHARGAAN

Penulis merakamkan setinggi-tinggi penghargaan kepada Dekan Fakulti Perubatan Universiti Kebangsaan Malaysia di atas galakan dan sokongan yang diberikan sehingga terhasilnya penulisan ini.

RUJUKAN

- Abeles, A.M., Gomez-Ramirez, M., Abeles, M. & Honiden, S. 2016. Antinuclear antibody testing: Discordance between commercial laboratories. *Clinical Rheumatology* 35(7): 1713-1718.
- Agustinelli, R.A., Rodrigues, S.H., Mariz, H.A., Prado, M.S. & Andrade, L.E.C. 2019. Distinctive features of positive anti-cell antibody tests (indirect immunofluorescence on HEp-2 cells) in patients with non-autoimmune diseases. *Lupus* 28(5): 629-634.
- Al-Mughales, J.A. 2022. Anti-nuclear antibodies patterns in patients with systemic lupus erythematosus and their correlation with other diagnostic immunological parameters. *Frontiers in Immunology* 14(13): 850759. doi: 10.3389/fimmu.2022.850759
- Alsaed, O.S., Alamlah, L.I., Al-Radideh, O., Chandra, P., Alemadi, S. & Al-Allaf, A.W. 2021. Clinical utility of ANA-ELISA vs ANA-immunofluorescence in connective tissue diseases. *Scientific Reports* 11(1): 8229.
- Avery, T.Y., van de Cruys, M., Austen, J., Stals, F. & Damoiseaux, J.G. 2014. Anti-nuclear antibodies in daily clinical practice: Prevalence in primary, secondary, and tertiary care. *Journal of Immunology Research* 2014: 401739. doi: 10.1155/2014/401739
- Aygün, E., Kelesoglu, F.M., Dogdu, G., Ersoy, A., Basbug, D., Akça, D., Çam, Ö.N., Akyüz, B., Günsay, T., Kapici, A.H., Aydin, N.G., Karapinar, E., Atay, S., Saglam, N., Okumus, N.K., Can, M.Z., Yazici, F. & Ömeroglu, R.E. 2019. Antinuclear antibody testing in a Turkish pediatrics clinic: is it always necessary? *The Pan African Medical Journal* 32: 181. doi: 10.11604/pamj.2019.32.181.13793
- Bizzaro, N., Antico, A., Platzgummer, S., Tonutti, E., Bassetti, D., Pesente, F., Tozzoli, R., Tampoia, M., Villalta, D. & Study Group on Autoimmune Diseases of the Italian Society of Laboratory Medicine, Italy. 2014. Automated antinuclear immunofluorescence antibody screening: A comparative study of six computer-aided diagnostic systems. *Autoimmunity Reviews* 13(3): 292-298.
- Bizzaro, N. & Wiik, A. 2004. Appropriateness in anti-nuclear antibody testing: From clinical request to strategic laboratory practice. *Clinical and Experimental Rheumatology* 22(3): 349-355.
- Brito Fde, A., Santos, S.M., Ferreira, G.A., Pedrosa, W., Gradisse, J., Costa, L.C. & Neves, S.P. 2014. Detection of anti-nuclear antibodies by indirect immunofluorescence on HEp-2 cells: Setting the appropriate screening dilution for the diagnosis of autoimmune rheumatic diseases. *Revista Brasileira de Reumatologia* 54(1): 13-20.
- Buchner, C., Bryant, C., Eslami, A. & Lakos, G. 2014. Anti-nuclear antibody screening using HEp-2 cells. *Journal of Visualized Experiments* 88: e51211. doi: 10.3791/51211
- Chan, E.K., Damoiseaux, J., Carballo, O.G., Conrad, K., de Melo Cruvinel, W., Francescantonio, P.L., Fritzler, M.J., Garcia-De La Torre, I., Herold, M., Mimori, T., Satoh, M., von Mühlen, C.A. & Andrade, L.E. 2015. Report of the First International Consensus on Standardized Nomenclature of Antinuclear Antibody HEp-2 Cell Patterns 2014-2015. *Frontiers in Immunology* 6: 412. doi: 10.3389/fimmu.2015.00412
- Chang, S.H., Minn, D. & Kim, Y.K. 2021. Autoantibodies in moderate and critical cases of COVID-19. *Clinical and Translational Science* 14(5): 1625-1626.
- Claessens, J., Belmondo, T., De Langhe, E., Westhovens, R., Poesen, K., Hüe, S., Blockmans, D., Mahler, M., Fritzler, M.J. & Bossuyt, X. 2018. Solid phase assays versus automated indirect immunofluorescence for detection of antinuclear antibodies. *Autoimmunity Reviews* 17(6): 533-540.
- Copple, S.S., Martins, T.B., Masterson, C., Joly, E. & Hill, H.R. 2007. Comparison of three multiplex immunoassays for detection of antibodies to extractable nuclear antibodies using clinically defined sera. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1109: 464-472.
- Copple, S.S., Jaskowski, T.D., Giles, R. & Hill, H.R. 2014. Interpretation of ANA indirect immunofluorescence test outside the darkroom using NOVA view compared to manual microscopy. *Journal of Immunology Research* 2014: 149316. doi: 10.1155/2014/149316
- Damoiseaux, J., Andrade, L.E.C., Carballo, O.G., Conrad, K., Francescantonio, P.L.C., Fritzler, M.J., Garcia de la Torre, I., Herold, M., Klotz, W., Cruvinel, W.M., Mimori, T., von Muhlen, C., Satoh, M. & Chan, E.K. 2019. Clinical relevance of HEp-2 indirect immunofluorescent patterns: The International Consensus on ANA patterns (ICAP) perspective. *Annals of Rheumatic Diseases* 78(7): 879-889.
- de Almeida Brito, F., Maria Elói Santos, S., Aparecida Ferreira, G., Pedrosa, W., Gradisse, J., Cristina Costa, L. & Pretti Figueiredo Neves, S. 2016. Diagnostic evaluation of ELISA and chemiluminescent assays as alternative screening tests to indirect immunofluorescence for the detection of antibodies to cellular antigens. *American Journal of Clinical Pathology* 145(3): 323-331.
- Dinse, G.E., Parks, C.G., Weinberg, C.R., Co, C.A., Wilkerson, J., Zeldin, D.C., Chan, E.K.L. & Miller, F.W. 2020. Increasing prevalence of antinuclear antibodies in the United States. *Arthritis & Rheumatology* 72(6): 1026-1035.

- Gautam, K. 2015. Anti-nuclear antibodies: Current concepts and future direction for diagnosing connective tissue disease. *Journal of Pathology of Nepal* 5(9): 766-773.
- Guo, Y.P., Wang, C.G., Liu, X., Huang, Y.Q., Guo, D.L., Jing, X.Z., Yuan, C.G., Yang, S., Liu, J.M., Han, M.S. & Li, H.X. 2014. The prevalence of antinuclear antibodies in the general population of china: A cross-sectional study. *Current Therapeutic Research, Clinical and Experimental* 76: 116-119. doi: 10.1016/j.curtheres
- Im, J.H., Chung, M.H., Park, Y.K., Kwon, H.Y., Baek, J.H., Lee, S.Y. & Lee, J.S. 2020. Antinuclear antibodies in infectious diseases. *Infectious Diseases* 52(3): 177-185.
- Irure-Ventura, J. & López-Hoyos, M. 2022. The past, present, and future in antinuclear antibodies (ANA). *Diagnostics* 12(3): 647.
- Jeong, S., Yang, D., Lee, W., Kim, G.T., Kim, H.S., Ahn, H.S. & Kim, H.J. 2018. Diagnostic value of screening enzyme immunoassays compared to indirect immunofluorescence for anti-nuclear antibodies in patients with systemic rheumatic diseases: A systematic review and meta-analysis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 48(2): 334-342.
- Kang, S.H., Seo, Y.I., Lee, M.H. & Kim, H.A. 2022. Diagnostic value of anti-nuclear antibodies: Results from Korean University-Affiliated Hospitals. *Journal of Korean Medical Science* 37(19): e159. doi: 10.3346/jkms.2022.37.e159
- Kumar, Y., Bhatia, A. & Minz, R.W. 2009. Antinuclear antibodies and their detection methods in diagnosis of connective tissue diseases: A journey revisited. *Diagnostic Pathology* 4: 1. doi: 10.1186/1746-1596-4-1
- Ling, M. & Murali, M. 2019. Antinuclear antibody tests. *Clinics in Laboratory Medicine* 39(4): 513-524.
- Li, X., Pan, J., Zhou, H., He, M., Li, W., Chen, Z., Dai, W., Wang, F., Wei, Q., Lao, X., Zhang, L., Li, L., Hu, H., Li, M., Qiu, Y. & Hou, T. 2020. A multi-centre study for standardization of antinuclear antibody indirect immunofluorescence screening with automated system. *Journal of Immunological Methods* 477: 112701. doi: 10.1016/j.jim.2019.112701
- Liberal, R., Mieli-Vergani, G. & Vergani, D. 2013. Clinical significance of autoantibodies in autoimmune hepatitis. *Journal of Autoimmunity* 46: 17-24.
- Litwin, C.M. & Binder, S.R. 2016. ANA testing in the presence of acute and chronic infections. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry* 37(5): 439-452.
- Litwin, C.M. & Rourk, A.R. 2018. Anti-ENA antibody profiles in patients with hepatitis C virus infection. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 32(3): e22279. doi: 10.1002/jcla.22279
- Maguire, G.A., Ginawi, A., Lee, J., Lim, A.Y., Wood, G., Houghton, S., Kumararatne, D.S. & Gaston, H.J. 2009. Clinical utility of ANA measured by ELISA compared with ANA measured by immunofluorescence. *Rheumatology* 48(8): 1013-1014.
- Mahler, M., Meroni, P.L., Bossuyt, X. & Fritzler, M.J. 2014. Current concepts and future directions for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. *Journal of Immunology Research* 2014: 315179. doi: 10.1155/2014/315179
- Mejdoub, S., Hachicha, H., Gargouri, L., Feki, S., Mahfoudh, A. & Masmoudi, H. 2021. Antinuclear antibodies in children: Clinical signification and diagnosis utility. *Tunisie Medicale* 99(10): 982-984.
- Mengeloglu, Z., Tas, T., Kocoglu, E., Aktas, G. & Karabörk, S. 2014. Determination of anti-nuclear antibody pattern distribution and clinical relationship. *Pakistan Journal of Medical Sciences* 30(2): 380-383.
- Meroni, P.L., Bizzaro, N., Cavazzana, I., Borghi, M.O. & Tincani, A. 2014. Automated tests of ANA immunofluorescence as throughput autoantibody detection technology: Strengths and limitations. *BMC Medicine* 12: 38. doi: 10.1186/1741-7015-12-38
- Muratori, P., Lenzi, M., Muratori, L. & Granito, A. 2021. Antinuclear antibodies in COVID 19. *Clinical and Translational Science* 14(5): 1627-1628.
- Op De Beeck, K., Vermeersch, P., Verschueren, P., Westhovens, R., Mariën, G., Blockmans, D. & Bossuyt, X. 2011. Detection of antinuclear antibodies by indirect immunofluorescence and by solid phase assay. *Autoimmunity Reviews* 10(12): 801-808.
- Pashnina, I.A., Krivolapova, I.M., Fedotkina, T.V., Ryabkova, V.A., Cheresheva, M.V., Churilov, L.P. & Chereshev, V.A. 2021. Antinuclear autoantibodies in health: Autoimmunity is not a synonym of autoimmune disease. *Antibodies* 10(1): 9.
- Peker, B.O., Şener, A.G. & Kaptan Aydoğmuş, F. 2021. Antinuclear antibodies (ANAs) detected by indirect immunofluorescence (IIF) method in acute COVID-19 infection; future roadmap for laboratory diagnosis. *Journal of Immunological Methods* 499: 113174. doi: 10.1016/j.jim.2021.113174
- Pisetsky, D.S. 2017. Antinuclear antibody testing - misunderstood or misbegotten? *Nature Reviews Rheumatology* 13(8): 495-502.
- Pisetsky, D.S. 2020. Immune phenotypes in individuals positive for antinuclear antibodies: The impact of race and ethnicity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 146(6): 1346-1348.
- Prapinjumrune, C., Prucktrakul, C., Sooktonglarng, T. & Thongprasom, K. 2017. Serum antinuclear antibody in adult Thais. *Gerodontology* 34(1): 86-89.
- Ricchiuti, V., Adams, J., Hardy, D.J., Katayev, A. & Fleming, J.K. 2018. Automated processing and evaluation of anti-nuclear antibody indirect immunofluorescence testing. *Frontiers in Immunology* 9: 927. doi: 10.3389/fimmu.2018.00927
- Rajalingam, S., Sakthiswary, R. & Hussein, H. 2013. The performance of the anti-nuclear antibody test in a Malaysian setting. *International Medical Journal* 20(6): 661-664.
- Rigon, A., Infantino, M., Merone, M., Iannello, G., Tincani, A., Cavazzana, I., Carabellese, N., Radice, A., Manfredi, M., Soda, P. & Afeltra, A. 2017. The inter-observer reading variability in anti-nuclear antibodies indirect (ANA) immunofluorescence test: A multicenter evaluation and a review of the literature. *Autoimmunity Reviews* 16(12): 1224-1229.

- Satoh, M., Tanaka, S. & Chan, E.K. 2015. The uses and misuses of multiplex autoantibody assays in systemic autoimmune rheumatic diseases. *Frontiers in Immunology* 6: 181. doi: 10.3389/fimmu.2015.00181
- Satoh, M., Chan, E.K., Ho, L.A., Rose, K.M., Parks, C.G., Cohn, R.D., Jusko, T.A., Walker, N.J., Germolec, D.R., Whitt, I.Z., Crockett, P.W., Pauley, B.A., Chan, J.Y., Ross, S.J., Birnbaum, L.S., Zeldin, D.C. & Miller, F.W. 2012. Prevalence and sociodemographic correlates of antinuclear antibodies in the United States. *Arthritis & Rheumatology* 64(7): 2319-2327.
- Seo, Y.S., Lee, K.G., Jung, E.S., An, H., Kim, J.H., Yeon, J.E., Byun, K.S., Yim, H.J., Lee, H.S., Um, S.H., Kim, C.D. & Ryu, H.S. 2011. Clinical significance of the detection of antinuclear antibodies in patients with acute hepatitis A. *Gut and Liver* 5(3): 340-347.
- Smeenk, R.J. 2000. Antinuclear antibodies: Cause of disease or caused by disease? *Rheumatology* 39(6): 581-584.
- Sur, L.M., Floca, E., Sur, D.G., Colceriu, M.C., Samasca, G. & Sur, G. 2018. Antinuclear antibodies: Marker of diagnosis and evolution in autoimmune diseases. *Laboratory Medicine* 49(3): e62-e73. doi: 10.1093/labmed/lmy024
- Suurmond, J. & Diamond, B. 2015. Autoantibodies in systemic autoimmune diseases: Specificity and pathogenicity. *The Journal of Clinical Investigation* 125(6): 2194-2202.
- Tebo, A.E. 2017. Recent Approaches to optimize laboratory assessment of antinuclear antibodies. *Clinical and Vaccine Immunology* 24(12): e00270-17. doi: 10.1128/CVI.00270-17
- Tonuttia, E., Bassetti, D., Piazza, A., Visentini, D., Poletto, M., Bassetto, F., Caciagli, P., Villalta, D., Tozzoli, R. & Bizzaro, N. 2004. Diagnostic accuracy of ELISA methods as an alternative screening test to indirect immunofluorescence for the detection of antinuclear antibodies. Evaluation of five commercial kits. *Autoimmunity* 37(2): 171-176.
- van den Breemt, S., Schouwens, S., Van Blerk, M. & Van Hoovels, L. 2017. ANA IIF Automation: Moving towards harmonization? Results of a multicenter study. *Journal of Immunology Research* 2017: 6038137. doi: 10.1155/2017/6038137
- Voigt, P., LeRoy, G., Drury, W.J., Zee, B.M., Son, J., Beck, D.B., Young, N.L., Garcia, B.A. & Reinberg, D. 2012. Asymmetrically modified nucleosomes. *Cell* 151(1): 181-193.
- Yoo, I.Y., Oh, J.W., Cha, H.S., Koh, E.M. & Kang, E.S. 2017. Performance of an automated fluorescence antinuclear antibody image analyzer. *Annals of Laboratory Medicine* 37(3): 240-247.

*Pengarang untuk surat-menyurat; email: saw@ppukm.ukm.edu.my