

Nöromiyelitis Optika'da Aquaporin-4 Antikorumun Akış Sitometrik Canlı Hücre Tabanlı Analiz ve Ticari Hücre Tabanlı Endirekt İmmüno Floresan Analiz ile Değerlendirilmesi: Karşılaştırmalı Çalışma

Live Cell-Based Flow Cytometry Assay Versus Commercial Cell-Based Indirect Immunofluorescence Assay of Aquaporin-4 Antibody in Neuromyelitis Optica: A Comparative study

İpek GÜNGÖR DOĞAN¹, Mesut YİĞİT^{2,7}, Damla ÇETİNKAYA TEZER¹, Özlem GÜLAÇTI^{2,7}, Şevval AYHAN², İpek DUYGU TÜRKDEMİR², Betül ÇELİK², Beril TAŞDELEN¹, Cihat UZUNKÖPRÜ³, Mehmet Fatih YETKİN⁴, Melih TÜTÜNCÜ⁵, Meltem KİLERCİK⁶, Serkan DEMİR¹

¹Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Sancaktepe Şehit Prof. Dr. İlhan Varank Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Nöroloji Kliniği, İstanbul, Türkiye

²Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi, İnsan İmmünolojisi Merkezi, İstanbul, Türkiye

³Katip Çelebi Üniversitesi, Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Nöroloji Kliniği, İzmir, Türkiye

⁴Erciyes Üniversitesi, Nöroloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

⁵İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Nöroloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

⁶Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

⁷My Gene and Cell Therapies Biyoteknoloji, İstanbul, Türkiye

ÖZ

Giriş ve Amaç: Nöromiyelitis Optika (NMO), merkezi sinir sistemini (MSS), özellikle optik sinir ve spinal kordu etkileyen enflamatuvar bir hastalıktır. Seropozitif NMO, aquaporin-4 (AQP4) proteinine karşı IgG antikorlarının varlığı ile tanımlanır. AQP4-IgG antikorlarının doğru şekilde saptanması, NMO'nun diğer MSS demiyelinizan hastalıklarından ayrılmasında kritik öneme sahiptir. Ancak geleneksel tanı testleri duyarlılık ve özgüllük açısından bazı sınırlamalara sahiptir. Bu çalışma, geliştirdiğimiz yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip akış sitometrik canlı hücre tabanlı analiz (flow cytometry live cell-based assay; FC-LCBA) ile AQP4 antikorlarının tespiti üzerinedir. Amacımız AQP4 antikorlarının saptanmasında yeni geliştirdiğimiz FC-LCBA testimizin doğruluğunu valide etmek ve ticari hücre tabanlı endirekt immüno floresan analiz (IIFA) ile etkinliğini karşılaştırmaktır.

Yöntem: Etik kurul onayı alınarak gerçekleştirilen bu tek kör çalışmada 101 serum örneği kullanılmıştır. Nöromiyelitis optika spektrumunda değerlendirilen ve tanı veya takip sırasında en az bir kez hücre tabanlı IIFA testi pozitif çıkan 17 hastadan

elde edilen 25 örnek (tekrar testler dâhil) ile, testimiz olan FC-LCBA ve hücre tabanlı IIFA testi paralel olarak çalışılmıştır. Ayrıca, miyelin oligodendrosit glikoprotein antikor ilişkili hastalık (MOGAD) tanısı alan 36 hastanın serum örnekleri ve 40 sağlıklı bireyden alınan serum örnekleri ile özgüllük analizi yapılmıştır.

Bulgular: Geliştirdiğimiz FC-LCBA, immünosüpresif tedavi altındaki NMO hastalarında hücre tabanlı IIFA negatif sonuç verse dahi pozitif sonuçlar vererek üstün duyarlılık göstermiştir. Ek olarak, FC-LCBA, NMO'ya yüksek özgüllük göstererek, MOGAD tanısı alan hastalarda ve sağlıklı bireylerde negatif sonuç vermiştir. Testin güvenilirliği, tekrar testlerde tutarlı sonuçlar gösterilerek doğrulanmıştır.

Sonuç: Geliştirdiğimiz FC-LCBA, AQP4 antikorlarının saptanmasında, duyarlılık, özgüllük ve güvenilirlik açısından ümit vaat eden bir tanı aracı olarak öne çıkmaktadır ve potansiyeline olan güveni artırmaktadır.

Anahtar Sözcükler: Aquaporin-4 antikorları, akış sitometrisi, canlı hücre tabanlı analiz, nöromiyelitis optika, serolojik tanı

ABSTRACT

Introduction: Neuromyelitis Optica (NMO) is an inflammatory disorder affecting the central nervous system, notably the optic nerve and spinal cord. Seropositive NMO is marked by serum IgG antibodies against aquaporin-4 (AQP4). The accurate identification of AQP4-IgG is crucial for distinguishing NMO from other demyelinating diseases of the central nervous system. However, traditional diagnostic assays have limitations in sensitivity and specificity. Here, we introduce our in-house flow cytometry live cell-based assay (FC-LCBA) for detecting AQP4 antibodies with enhanced sensitivity and specificity. Our objective is to report the accuracy and compare the efficacy of our newly developed in-house FC-LCBA against the commercial cell-based indirect immunofluorescence assay (IIFA) in detecting AQP4 antibodies.

Methods: This single-blind study was approved by the ethical committee and involved 101 serum samples. Twenty-five samples (including retests) from 17 patients evaluated in the NMO spectrum who had at least one positive cell-based IIFA test during the diagnosis or follow-up are tested in parallel with our

in-house FC-LCBA and cell-based IIFA. In addition, 36 serum samples from myelin oligodendrocyte glycoprotein-associated disease (MOGAD) patients and 40 serum samples from healthy subjects are also referred for specificity analysis.

Results: Our in-house FC-LCBA displayed superior sensitivity, detecting positive results even when the cell-based IIFA yielded negative results in patients under immunosuppressive treatments. Additionally, FC-LCBA exhibited high specificity for NMO, showing negligible antibody levels in patients with MOGAD diagnosis and healthy individuals. The assay's stability was confirmed through consistent results in retests.

Conclusion: Our in-house FC-LCBA emerges as a promising diagnostic tool for detecting AQP4 antibodies, offering improved sensitivity, specificity, and reliability, instilling confidence in its potential.

Keywords: Aquaporin-4 antibodies, flow cytometry, live cell-based assay, neuromyelitis optica, serological diagnosis

Cite this article as: Güngör Doğan İ, Yiğit M, Çetinkaya Tezer D, Gülaçtı Ö, Ayhan Ş, Türkdemir İD ve ark. Nöromiyelitis Optika'da Aquaporin-4 Antikorumun Akış Sitometrik Canlı Hücre Tabanlı Analiz ve Ticari Hücre Tabanlı Endirekt İmmüno Floresan Analiz ile Değerlendirilmesi: Karşılaştırmalı Çalışma. Arch Neuropsychiatry 2025;62:259–263. doi: 10.29399/npa.28951

Öne Çıkan Noktalar

- FC-LCBA, AQP4 antikorlarının tespitini artırarak NMOSD tanısında yüksek doğruluk sağlar.
- FC-LCBA, klasik IIFA testlerine kıyasla daha yüksek özgüllük ve tanısal güvenilirlik sunar.
- Canlı hücre kullanımı, AQP4 antijeninin doğal yapısını koruyarak yalancı negatif sonuçları en aza indirir.

GİRİŞ

Nöromiyelitis Optika (NMO), Devic Hastalığı olarak bilinen, merkezi sinir sistemini (MSS) etkileyen nadir ve potansiyel olarak ciddi bir enflamatuvar hastalıktır. Fransız nörolog Dr. Eugène Devic'in 19. yüzyıldaki tanımlamalarına dayanan bu hastalık, 2004 yılında astroglial hücrelerde bulunan bir su kanalı olan Aquaporin-4 (AQP4) antikorlarının keşfiyle, NMO ve Multipl Skleroz (MS) arasındaki ayrımın netleşmesiyle daha iyi anlaşılmıştır (1-3). Bu antikorlar, özellikle optik sinir ve spinal kordta, ayrıca beyin sapı, diensefalon, area postrema ve serebrumda yoğun enflamasyon ile karakterize olabilecek NMO'nun tanı ve tedavisinde kritik bir rol oynar (4). AQP4 antikorlarının ilk tanımlanmasından bu yana, bu antikorlar çeşitli tekniklerle test edilmiştir; bazıları laboratuvarlarda geliştirilen yöntemlerken bazıları farklı duyarlılık ve özgüllük oranlarına sahip ticari kitlelerle gerçekleştirilmiştir (5,6). Günümüzde kabul edildiği üzere, hücre tabanlı analizler (Cell based assays; CBA), AQP4-IgG için oldukça duyarlı ve yüksek özgüllüğe sahiptir ve bu nedenle doku bazlı ve protein bazlı analizlerden daha iyi performans gösterirler (7-12). Türkiye'de, AQP4-IgG tespiti genellikle canlı hücreler yerine fikse hücreleri içeren ve ticari olarak yaygınlık gösteren hücre tabanlı indirekt immüno floresan analizle (IIFA) yapılmaktadır. Birincil olarak kaynak kısıtlılıkları nedeniyle canlı hücre tabanlı analizlere erişimde bölgesel limitasyonlar, hücre tabanlı IIFA'yı daha erişilebilir ve uygulanabilir bir alternatif haline getirmektedir. Ancak, bazı çalışmalarda canlı CBA, antijenlerin doğal konformasyonlarında sunulmasından dolayı biraz daha duyarlı bir teknik olarak görülmektedir. Hücre tespiti ile ilişkili olası transfekte hücre bütünlüğüne yönelik tehditler, canlı CBA tekniklerinde görülmez (13,14). Ayrıca geliştirdiğimiz FC-LCBA, hücre tabanlı IIFA ile karşılaştırıldığında, AQP4 testinde önemli bir yenilik sağlayan akış sitometrisinin kullanımı nedeniyle de öne çıkmaktadır (11,12,15,16,17).

Bu çalışmada, testimizin doğruluğunu raporlamak ve hücre tabanlı IIFA ile daha önce seropozitifliği en az bir kez gösterilmiş hastalardan alınan örnekler ile duyarlılığı; miyelin oligodendrosit glikoprotein antikor ilişkili hastalık (MOGAD) tanısı olan hastalardan ve sağlıklı bireylerden alınan örnekler ile özgüllüğü karşılaştırarak, yeni geliştirdiğimiz FC-LCBA'mızın etkinliğini raporladık.

YÖNTEM

Örnek toplama

Şehit Prof. Dr. İlhan Varank Sancaktepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi nöroimmünoloji polikliniğinden 101 serum örneği elde edilmiştir. Tanı veya takip sürecinde en az bir kez pozitif IIFA testi bulunan ve NMO spektrumunda değerlendirilen 17 hastaya ait 25 örnek (tekrar testler dâhil) test edilmiştir. Bu örneklerin, ticari hücre tabanlı IIFA testleri ile MOG-IgG açısından negatif olduğu da bilinmektedir. Ayrıca, uluslararası MOGAD Paneli'nin önerdiği 2023 kriterlerini (18) karşılayan MOGAD hastalarına ait 36 serum örneği (17) ve sağlıklı bireylerden alınan 40 serum örneği, özgüllük analizine dâhil edilmiştir.

FC-LCBA için AQP4 proteini aşırı ekspresyonuna sahip hücrelerin üretilmesi

İnsan kodonlarına optimize edilmiş tam uzunlukta AQP4-M23 izoformu, Addgene (#126464) plazmidinden amplifiye edilmiştir ve Not-I ile EcoR1 kısıtlama bölgeleri PCR ile eklenmiştir. Ardından, internal ribozomal giriş bölgesi (internal ribosomal entry site; IRES) aracılığıyla bir GFP raportörü tarafından ayrılan birden fazla klonlama alanına sahip bir lentiviral ekspresyon vektörüne klonlanmıştır. AQP4 konstrüksiyonu, Lipofectamine 3000 (Invitrogen) kullanılarak üretici firmanın protokolüne uygun şekilde insan embriyonik böbrek hücreleri (HEK-293) T hücrelerine yaklaşık %80 hücre konfluensi sağlandıktan sonra ko-transfekte edilmiştir. Transfeksiyondan 24 saat sonra süpernatantlar toplanmış ve 4°C'de saklanarak bir 24 saat daha inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen viral süpernatantlar, 500× g hızında 10 dakika santrifüj edilerek ve ardından 0,45 µm filtre membranı (millipore) kullanılarak hücresel artıkların uzaklaştırılması için filtrelenmiştir. Filtrelenen viral süpernatantlar, Polietilen Glikol (PEG) 3000 ile 1:2 oranında karıştırılarak 4°C'de bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Karışım, 2000× g hızında 4°C'de bir saat santrifüj edilerek çöktürülmüş ve sonrasında uygun hacimde bir besiyerinde yeniden süspansiyon edilerek 10 kat konsantrasyonda viral süspansiyon elde edilmiştir. Viral titreler, üç kat seri dilüsyon uygulanarak ve psödodotipleştirilmiş virüslerin hedef hücrelere eklenmesiyle ölçülmüştür. Yetmiş iki saat sonra, akış sitometrisi kullanılarak GFP-pozitif hücrelerin sayılarak psödodotipli enfeksiyon düzeyi belirlenmiş ve ml başına enfeksiyon birimi hesaplanmıştır. Daha sonra HEK-293 hücreleri, AQP4 lentivirüsü ile stabil AQP4 proteini eksprese eden HEK-293 hücreleri üretmek amacıyla transdükte edilmiştir. Transdükte edilen hücreler, tam RPMI 1640 besiyerinde %10 FBS (Atlanta Biologicals, Lawrenceville, GA), %8 GlutaMAX (Life Technologies), %8 sodyum pirüvat, %8 MEM vitaminleri, %8 MEM esansiyel olmayan amino asitler ve %1 penisilin/streptomisin (tümü Corning kaynaklı) ilave edilerek kültüre alınmıştır.

FC-LCBA ile AQP4 antikor testi

AQP4-IgG seviyelerini ölçmek için AQP4 (HEK-AQP4) kullanılmış olup, kontrol amacıyla GFP (HEK-GFP) eksprese eden HEK-293 hücreleri kullanılmıştır. Test için 101 serum örneği (1:10, 1:30, 1:100, 1:300, 1:1000, 1:3000, 1:10000, 1:30000 dilüsyonlarında) 1×10⁵ HEK-AQP4 hücreleriyle 4°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrası hücreler iki kez yıkanmış ve ardından florokrom-konjuge insan IgG'ye karşı antikor (Biolegend 409306, APC, 2 µg/ml) ile 4°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra hücreler tekrar yıkanarak PBS içerisinde süspansiyon edilmiş ve BD akış sitometrisi kullanılarak analiz edilmiştir. Elde edilen veriler, FlowJo yazılımı ile değerlendirilmiştir. Deneylerden önce plazma örnekleri, 56°C'de 30 dakika ısı ile inaktive edilmiştir.

FC-LCBA analizleri, İstanbul, Türkiye'deki Acıbadem İnsan İmmünolojisi Merkezi'nde tek kör analiz edilmiştir.

Hücre tabanlı IIFA ile AQP4 antikor testi

Tüm örnekler, üretici firmanın protokolüne (5,6) uygun olarak, İstanbul, Türkiye'de bulunan yerel bir laboratuvarında mevcut ticari hücre tabanlı IIFA testi kullanılarak tek kör analiz edilmiştir.

Laboratuvar testlerini gerçekleştiren araştırmacılar, birbirlerinin örneklerine ait serolojik durumlar ve klinik bilgiler hakkında da körleştirilmiştir.

Veri analizi

İstatistiksel analiz, duyarlılık, özgüllük ve %95 güven aralığını belirlemek için gerçekleştirilmiştir. Testler arasındaki uyum derecesi, Cohen kappa katsayısı (K) ile değerlendirilmiştir. Tüm veriler, GraphPad Prism V9 yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir.

BULGULAR

AQP4 antikor düzeyini belirlemek amacıyla, canlı hücreler ve akış sitometrisi kullanımıyla avantaj sağlayan FC-LCBA'yi laboratuvarda geliştirdik. Bu test için, öncelikle tam uzunlukta AQP4, GFP raportörü içeren bir ekspresyon vektörüne klonlandı. Daha sonra, AQP4 kodlayan ekspresyon vektörü ve paketlenmiş plazmidleri ile HEK-293 hücreleri ko-transfekte edilerek AQP4 protein lentiviral partikülleri üretildi. Ardından, HEK-293 hücreleri, GFP eksprese eden AQP4 protein psödovirüsü ile etkin bir şekilde transdükte edildi. Kontrol olarak GFP eksprese eden boş vektör kullanıldı. AQP4 aşırı ekspresyonu, AQP4-IgG pozitif olduğu bilinen bir hasta plazması ile boyama yapılarak, ardından anti-IgG Fc antikorlu ile sekonder boyama uygulanarak doğrulandı.

Laboratuvar içi FC-LCBA yöntemimizin doğruluğunu göstermek ve etkinliğini karşılaştırmak amacıyla, NMO spektrumunda değerlendirilen ve tanı sürecinde veya takip sırasında en az bir kez hücre tabanlı IIFA testi pozitif sonuç veren 17 hastaya ait 25 serum örneği (tekrar testleri dâhil) kullanılarak hücre tabanlı IIFA ile geliştirdiğimiz FC-LCBA yöntemi eş zamanlı olarak test edilmiştir. Örnekler, yöntem bölümünde belirtilen

farklı dilüsyonlarda ilgili hücre hatlarına eklenmiştir. Ardından, AQP4-IgG seviyeleri, APC florokrom ile konjuge edilmiş IgG Fc'ye özgü sekonder antikorlar kullanılarak ölçülmüştür.

Tablo 1, temel demografik verileri ve test sonuçlarını özetlemektedir. Bu sonuçlara göre, 17 hastanın 15'i semptom başlangıcında hücre tabanlı IIFA testi pozitif olarak değerlendirilmiştir. Geriye kalan iki hastada ise takip sürecinde hücre tabanlı IIFA pozitif hale gelmiştir. Çalışma kapsamında, 17 hastanın 5'inde IIFA test sonucu negatifleşmiştir.

Tablo 2'de gösterildiği gibi, bu 17 hastanın 11'inde hem hücre tabanlı IIFA hem de FC-LCBA testleri AQP4 antikorlarını tespit etmiştir (eş zamanlı pozitiflik %73,33). İki hastada ise her iki test de negatif sonuç vermiştir (eş zamanlı negatiflik %33,33). İki test arasındaki uyum yüzdesi %76,47 olarak hesaplanmıştır (Cohen kappa katsayısı 0,358; %95 GA -0,130 ila 0,847).

Hastalık modifiye edici tedavi almakta olan üç hasta yalnızca FC-LCBA ile pozitif sonuç vermiştir. 1/300 dilüsyonu, hem FC-LCBA hem de IIFA pozitifliğini gösterebilecek eşik olarak belirlenmiş olsa da, bu dilüsyonun

Tablo 1. On yedi hastanın temel demografik verileri ve tüm test sonuçları

Hasta	Cinsiyet (K: Kadın; E: Erkek)	Hastalık başlangıç yaşı	Hastalık süresi (Ay)	Oligoklonal band (Negatif 0, Pozitif: 1)	Semptom başlangıcında alınan IIFA sonucu (Negatif: 0, Pozitif: 1)	Takip IIFA sonuçları (Negatif: 0, Pozitif: 1)	Çalışma kapsamında IIFA sonuçları (Negatif 0, Pozitif: 1)	Çalışma kapsamında FC-LCBA sonuçları (Negatif: 0, Pozitif: 1)	Titreler (Negatif: 0)	Re-test titre (Negatif: 0)
1	K	60	57	0	1	x	0	1	1/30	1/10
2	K	38	100	0	1	x	0	1	1/300	1/100
3	K	41	52	0	1	x	0	1	1/30	1/10
4	K	43	112	1	1	x	1	1	1/300	1/300
5	K	37	52	0	1	x	1	1	1/300	x
6	K	54	31	0	1	x	1	1	1/1000	1/1000
7	E	48	24	1	1	x	1	1	1/10000	1/3000
8	K	40	160	0	1	x	1	1	1/10000	x
9	K	32	36	0	1	x	1	1	1/1000	x
10	K	14	52	0	1	x	1	1	1/1000	x
11	K	57	72	0	1	x	1	1	1/10000	x
12	K	55	3	0	1	x	1	1	1/10000	x
13	K	31	136	0	0	1	1	1	1/1000	x
14	K	41	160	0	0	1	1	1	1/10000	x
15	K	23	39	0	1	x	0	0	0	0
16	K	36	64	x	1	x	0	0	0	0
17*	K	25	29	0	1	x	1	0	0	x

FC-LCBA: akış sitometrik canlı hücre tabanlı analiz; IIFA: endirekt immüno Floresan analiz x: Çalışılmadı.

17*: Çalışma kapsamında MOGAD tanısı alan hasta.

Tablo 2. AQP4-IgG seviyelerinin hücre tabanlı IIFA ve FC-LCBA ile tespiti

	Hasta (n)	Karşılaştırma	
		Hücre tabanlı IIFA	FC-LCBA
Tanı anında hücre tabanlı IIFA (+) (n=15)	9	+	+
	3	-	+
	2	-	-
	1	+	-
Tanı anında hücre tabanlı IIFA (-) (n=2)	2	+	+

FC-LCBA: akış sitometrik canlı hücre tabanlı analiz; IIFA: endirekt immüno Floresan analiz.

altındaki titrelerde yalnızca FC-LCBA pozitifliği kayda değer bulunmuştur (Tablo 1). Dört uyumsuz örnekten birinde, IIFA pozitif sonuç verirken, FC-LCBA negatif sonuç vermiştir. Ancak, bu hastanın örneği, hücre tabanlı IIFA dışındaki başka bir canlı hücre tabanlı test ile MOG için analiz edildiğinde yüksek titrede pozitif sonuç vermiş ve uluslararası MOGAD Paneli kriterlerini karşılayan bir MOGAD tanısını doğrulamıştır. Son olarak, geliştirdiğimiz FC-LCBA yöntemimiz, %87,5 duyarlılık (%95 CI 61,65-98,45) göstererek hücre tabanlı IIFA ile karşılaştırıldığında daha yüksek bir duyarlılık oranı sergilemiştir (IIFA duyarlılığı %68,75; %95 CI 41,34-88,98).

Geliştirdiğimiz FC-LCBA yöntemimizin AQP4-IgG için özgüllüğünü değerlendirmek amacıyla, 40 sağlıklı birey ve 36 MOGAD tanılı hastada antikor seviyeleri ölçülmüştür. Test, her iki kontrol grubunda da ihmal edilebilir düzeyde antikor tespit ederek, AQP4 antikorlarını belirlemede yüksek özgüllüğe (%100) sahip olduğunu doğrulamıştır. Otuz altı MOGAD hastasından birinde, hücre tabanlı IIFA pozitifliği gözlemlenmiştir. Bu hasta, canlı hücre tabanlı analizde yüksek titrede kesin MOG pozitifliği gösteren ve aynı zamanda uluslararası MOGAD Paneli'nin önerdiği kriterleri karşılayan bir hasta olarak değerlendirilmiştir. Geliştirilen testin stabilitesini değerlendirmek amacıyla, sekiz (n=8) örnek iki farklı zaman noktasında tek kör olarak FC-LCBA kullanılarak tekrar test edilmiştir. Sonuçlar, ilk ölçümlerle yüksek derecede tutarlılık ve benzerlik göstermiştir.

TARTIŞMA

Aquaporin-4, NMO patofizyolojisinde kritik bir rol oynamakta olup, AQP4-IgG hastalığın temel belirleyicilerinden biridir. Nöromiyelitis optika gibi nadir bir hastalık bağlamında, güvenilir bir testin geliştirilmesi ve iyileştirilmesi büyük önem taşımakta olup, klinik tanı ve tedavi kararları açısından önemli sonuçlar doğurmaktadır (8). Bu çalışmada, geliştirdiğimiz FC-LCBA testimizin duyarlılığını ve özgüllüğünü ortaya koyduk. Ayrıca, AQP4 antikorlarının tespitinde ticari hücre tabanlı IIFA testine kıyasla sunduğu avantajları gösterdik.

Bu pilot çalışmada, hücre tabanlı IIFA ve FC-LCBA testleri, 17 hastanın 11'inde AQP4 antikorlarını tespit etmiştir. Her iki testin de negatif sonuç verdiği iki hasta bulunmakta olup, bu durum toplamda %76,47'lik bir uyum oranı sağlamıştır. İki hastada hiçbir antikor tespit edilmemiştir. Bu durum, bu hastaların gerçekten AQP4-IgG negatif olabileceğini, testlerin duyarlılığının yetersiz kalmış olabileceğini veya immünsupresif tedaviler nedeniyle negatifleşmiş olabileceklerini düşündürmektedir. On yedi hastadan dördünde, hücre tabanlı IIFA ve FC-LCBA testleri arasında uyumsuz sonuçlar gözlemlenmiştir. Hastalığın başlangıcında hücre tabanlı IIFA ile pozitif olan üç hasta, takip sürecinde hücre tabanlı IIFA ile negatif ancak FC-LCBA ile pozitif bulunmuş olup, bu hastaların tamamı kesin NMO tanılıdır. AQP4-IgG, remiyon dönemlerinde çoğu hastada tespit edilebilir durumda kalmaktadır. Ancak, immünsupresif tedavi altında ataksız dönemlerde antikor titreleri düşük olabilmektedir (19). Hastalarımızdan alınan üç örnek de benzer bir dönemde toplanmış olup, düşük AQP4-IgG titresi göstermiştir. Bu veriler, önceki çalışmalarla uyumluluk göstermektedir (12,16). Bu durum, atak dönemlerinde ve immünsupresif tedaviler başlanmadan önce alınan örneklerin test edilmesinin önemini vurgulamaktadır. Aksi takdirde, yanlış negatif sonuçları önlemek için gelişmiş tekniklerle tekrar test yapılması mutlaka göz önünde bulundurulmalıdır.

Antikor testlerinin duyarlılığını ve özgüllüğünü etkileyen çeşitli faktörler bulunmaktadır. Tespit uygulanmış hücrelerde, canlı hücrelere kıyasla çeşitli antijenlere karşı daha yüksek düzeyde özgül olmayan bağlanmaların gözlenmesi, bu farklılığın en önemli nedenlerinden biridir (20). Ayrıca, IIFA sonuçlarının objektif kantifiye değerlendirmeler karşısında subjektif olarak yorumlanması (örneğin, floresan yoğunluğu

ve paterni değerlendirme) farklı gözlemciler arasında tutarsızlıklara yol açabilir (3,16). Transfeksiyon için kullanılan izomer seçimi de etkili faktörler arasında yer almaktadır. Önceki çalışmalarda gösterildiği üzere, M1 izomeri yerine daha yüksek ortogonal partikül dizilimi oluşturan AQP4'ün M23 izomerinin tercih edilmesi, AQP-IgG tespitinde duyarlılığı artırabilmektedir (21,22). Bu bağlamda, çalışmamızda AQP4'ün M1 izomeri yerine M23 izomeri kullanılmış ve objektif kantifikasyon sağlamak amacıyla akış sitometrisi tercih edilmiştir.

Dört örnek arasındaki son uyumsuzluk, IIFA'da yanlış pozitif sonuç veren bir hastada gözlemlenmiştir. Miyelin oligodendrosit antikoruna hücre tabanlı IIFA ile yapılan ilk incelemesi negatif sonuçlanan hastanın MOGAD tanısı, canlı hücre tabanlı test ile çalışmamız kapsamında doğrulanmıştır. Bu vaka, hücre tabanlı IIFA ile MOG antikor testinin karşılaştığı zorlukları vurgulamaktadır, çünkü MOG antikorları konformasyon duyarlıdır ve hücrelerin kimyasal tespit süreci, MOG proteinine ait spesifik konformasyonel epitopları değiştirebilir, bu da yanlış negatif sonuçlara yol açabilir (13,14). Son olarak, bu hastada canlı hücre tabanlı test ile MOG pozitifliği gözlemlenmesi, önceki verileri doğrulamakla kalmayıp aynı zamanda testimizin özgüllüğünü farklı bir açıdan da ortaya koymuştur.

Kırk sağlıklı birey ve 36 MOGAD hastasında yapılan testler, geliştirdiğimiz FC-LCBA yöntemimizin tamamen özgül (%100) olduğunu ve IIFA'nın aksine yanlış pozitif sonuç vermediğini göstermiştir. Kesin MOGAD tanısı alan bir hastaya ait bir örnek, canlı hücre tabanlı test ile MOG antikoruna açısından yüksek titrede pozitif sonuç vermiş, ancak hücre tabanlı IIFA'da düşük titrede AQP4 pozitifliği göstermiştir. Bu bağlamda, FC-LCBA testimizin güçlü özgüllüğü, seropozitif NMO ile MOGAD'ı ayırt etmek için daha güvenilir bir tanısal araç olma potansiyelini artırmakta ve gelecekteki kullanımı için güven oluşturmaktadır.

Çalışmamız, AQP4-IgG pozitif ve negatif hastalarda tekrar testlerinin tutarlı sonuçlar vermesi ile, testimizin güvenilirliğini ve sağlamlığını ortaya koymuştur. Bu bulgu, testimizin zaman içinde tutarlı performans sergilediğini de vurgulamaktadır. Ancak, çalışmamızın ve geliştirdiğimiz FC-LCBA yönteminin bazı kısıtlılıkları bulunmaktadır. Öncelikle, hasta sayısının nispeten düşük olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Bu çalışmanın amacı, bu testlerin tanısal değerini analiz etmek değil, daha çok testin teknik değerlendirmesini yapmak olmuştur. Bu nedenle, çalışmaya yalnızca hastalık başlangıcında veya takip sürecinde IIFA ile AQP4 pozitifliği gösteren hastalar dâhil edilmiştir. Buna ek olarak, geliştirdiğimiz FC-LCBA yöntemi özel beceri, deneyim ve zaman gerektirmektedir. Bu faktörler, bu testin daha fazla merkezde uygulanmasını kısıtlayan önemli faktörlerdir.

Sonuç olarak, elde edilen duyarlılık, özgüllük ve tekrarlanabilirlik verileri, geliştirdiğimiz LCBA yöntemimizin, NMO tanısı ve takibinde AQP4-IgG tespiti için tek başına veya tamamlayıcı bir teknik olarak mevcut en iyi testlerden biri olduğunu göstermektedir. Testimizin en önemli avantajları arasında, yanlış pozitif sonuçların bulunmaması ve düşük titreli serumlarda artan duyarlılığı yer almaktadır. Bununla birlikte, seropozitif NMO ve ilişkili hastalıkların tanısal metodolojilerindeki gelişmelere katkıda bulunmak ve mevcut bilgilerimizi ilerletmek için geniş hasta serilerinde yapılacak ek çalışmalara acilen ihtiyaç duyulmaktadır.

Etik Komite Onayı: Çalışma için, Şehit Prof. Dr. İlhan Varank Sancaktepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi Etik Kurulu'ndan 25.09.2023 tarih ve E-46059653-050,99-225231255 numarası ile etik kurul onayı almıştır.

Hasta Onamı: Çalışmaya dâhil edilen tüm hastalar, aydınlatılmış onam formunu imzalamıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış Bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir- SDİ İGD, MY; Tasarım- SD, MY, İGD; Denetleme- İGD, DTÇT; Kaynaklar- MY, ÖG; Malzemeler- SD, İGD, MK, CU, MFY, MT; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi- MY, ÖG, ŞA, İDT, BÇ; Analiz ve/veya Yorum- İGD, MY, ÖG, DÇT, SD; Literatür Taraması- BT, İGD, DÇT; Yazıyı Yazan- MY, İGD, ÖG, SD; Eleştirel İnceleme- MY, İGD, BT.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma tamamen SZA Sağlık Araştırma ve Geliştirme Kurumu tarafından finanse edilmiştir

KAYNAKLAR

- Lennon VA, Wingerchuk DM, Kryzer TJ, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Fujihara K, et al. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet* (London, England). 2004;364(9451):2106–2112. [Crossref]
- Lennon VA, Kryzer TJ, Pittock SJ, Verkman AS, Hinson SR. IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *J Exp Med*. 2005;202(4):473–477. [Crossref]
- Jarius S, Wildemann B. The history of neuromyelitis optica. *J Neuroinflammation*. 2013;10:8. [Crossref]
- Wingerchuk DM, Banwell B, Bennett JL, Cabre P, Carroll W, Chitnis T, et al. International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders. *Neurology*. 2015;85(2):177–189. [Crossref]
- Jarius S, Wildemann B. AQP4 antibodies in neuromyelitis optica: diagnostic and pathogenetic relevance. *Nat Rev Neurol*. 2010;6(7):383–392. [Crossref]
- Jarius S, Probst C, Borowski K, Franciotta D, Wildemann B, Stoecker W, et al. Standardized method for the detection of antibodies to aquaporin-4 based on a highly sensitive immunofluorescence assay employing recombinant target antigen. *J Neurol Sci*. 2010;291(1-2):52–56. [Crossref]
- Chan KH, Kwan JSC, Ho PWL, Ho JWM, Chu ACY, Ramsden DB. Aquaporin-4 autoantibodies in neuromyelitis optica spectrum disorders: comparison between tissue-based and cell-based indirect immunofluorescence assays. *J Neuroinflammation*. 2010;7:50. [Crossref]
- Jarius S, Wildemann B. Aquaporin-4 antibodies (NMO-IgG) as a serological marker of neuromyelitis optica: a critical review of the literature. *Brain Pathol*. 2013;23(6):661–683. [Crossref]
- Prain K, Woodhall M, Vincent A, Ramanathan S, Barnett MH, Bundell CS, et al. AQP4 antibody assay sensitivity comparison in the era of the 2015 diagnostic criteria for NMOSD. *Front Neurol*. 2019;10:1028. [Crossref]
- Redenbaugh V, Montalvo M, Sechi E, Buciu M, Fryer JP, McKeon A, et al. Diagnostic value of aquaporin-4-IgG live cell based assay in neuromyelitis optica spectrum disorders. *Mult Scler J Exp Transl Clin*. 2021;7(4):20552173211052656. [Crossref]
- Waters P, Reindl M, Saiz A, Schanda K, Tuller F, Kral V, et al. Multicentre comparison of a diagnostic assay: aquaporin-4 antibodies in neuromyelitis optica. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2016;87(9):1005–1015. [Crossref]
- Waters PJ, McKeon A, Leite MI, Rajasekharan S, Lennon VA, Villalobos A, et al. Serologic diagnosis of NMO -a multicenter comparison of aquaporin-4-IgG assays. *Neurology*. 2012;78(9):665–671; discussion 669. [Crossref]
- Reindl M, Schanda K, Woodhall M, Tea F, Ramanathan S, Sagen J, et al. International multicenter examination of MOG antibody assays. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2020;7(2):e674. [Crossref]
- Waters PJ, Komorowski L, Woodhall M, Lederer S, Majed M, Fryer J, et al. A multicenter comparison of MOG-IgG cell-based assays. *Neurology*. 2019;92(11):e1250–e1255. [Crossref]
- Jiao Y, Fryer JP, Lennon VA, Jenkins SM, Quek AML, Smith CY, et al. Updated estimate of AQP4-IgG serostatus and disability outcome in neuromyelitis optica. *Neurology*. 2013;81(14):1197–1204. [Crossref]
- Yang J, Kim SM, Kim Y-J, Cheon SY, Kim B, Jung KC, et al. Accuracy of the fluorescence-activated cell sorting assay for the aquaporin-4 antibody (AQP4-Ab): comparison with the commercial AQP4-Ab assay kit. *PLoS One*. 2016;11(9):e0162900. [Crossref]
- Dogan IG, Yigit M, Cetinkaya Tezer D, Gulacti O, Tasdelen B, Ayhan S, et al. No Title. In: Sensitivity and Specificity of FL-CBA versus IFA for NMO-IgG Detection in Neuromyelitis Optica Patients. 10th Congress of the European Academy of Neurology. Helsinki, Finland: 29 June - 2 July; 2024
- Banwell B, Bennett JL, Marignier R, Kim HJ, Brilot F, Flanagan EP, et al. Diagnosis of myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody-associated disease: international MOGAD Panel proposed criteria. *Lancet Neurol*. 2023;22(3):268–282. [Crossref]
- Takahashi T, Fujihara K, Nakashima I, Misu T, Miyazawa I, Nakamura M, et al. Anti-aquaporin-4 antibody is involved in the pathogenesis of NMO. A study on antibody titre. *Brain*. 2007;130(Pt 5):1235–1243. [Crossref]
- Fujihara K, Sato DK. AQP4 antibody serostatus: is its luster being lost in the management and pathogenesis of NMO? *Neurology*. 2013;81:1186–1188. [Crossref]
- Mader S, Gredler V, Schanda K, Rostasy K, Dujmovic I, Pfaller K, et al. Complement activating antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein in neuromyelitis optica and related disorders. *J Neuroinflammation*. 2011;8:184. [Crossref]
- Pisani F, Sparaneo A, Tortorella C, Ruggieri M, Trojano M, Mola MG, et al. Aquaporin-4 autoantibodies in neuromyelitis optica: AQP4 isoform-dependent sensitivity and specificity. *PLoS One*. 2013;8(11):e79185. [Crossref]