

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARTINA BIČEK

DIPLOMSKA NALOGA

**DIAGNOSTIČNA UPORABNOST AVTOPROTITELES PROTI
 β_2 -GLIKOPROTEINU I**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARTINA BIČEK

**DIAGNOSTIČNA UPORABNOST AVTOPROTITELES PROTI
 β_2 -GLIKOPROTEINU I**

**DIAGNOSTIC VALUE OF ANTI- β_2 -GLYCOPROTEIN I
AUTOANTIBODIES**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2016

Diplomsko nalogo sem opravljala v Laboratoriju za imunologijo revmatizma, Klinični oddelek za revmatologijo, SPS Interna klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana pod mentorstvom prof. dr. Boruta Božiča, mag. farm., spec.med. biokem. in somentorstvom doc. dr. Saše Čučnik, univ. dipl. biol., spec. med. biokem..

Zahvala

Zahvalila bi se rada mentorju prof. dr. Borutu Božiču mag. farm., spec. med. biokem. in somentorici doc. dr. Saši Čučnik, univ. dipl. biol., spec. med. biokem. za vse nasvete, strokovno pomoč ter spodbudo pri izdelavi diplomske naloge.

Hkrati se zahvaljujem tudi osebju v Laboratoriju za imunologijo revmatizma za nasvete pri delu v laboratoriju.

Prav tako bi se rada zahvalila staršem, bratoma ter prijateljem za vso podporo v času študija in pri izdelavi diplomske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Boruta Božiča, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom doc. dr. Saše Čučnik, univ. dipl. biol., spec. med. biokem..

Martina Biček

Komisija

Predsednica:izr. prof. dr. Anamarija Zega

Članica: asist. dr. Meta Kokalj Ladan

VSEBINA

POVZETEK	III
ABSTRACT	V
SEZNAM OKRAJŠAV	VI
1 UVOD	1
1.1 Antifosfolipidni sindrom	1
1.2 Antifosfolipidna protitelesa	2
1.3 β_2-glikoprotein I	3
1.4 Protitelesa proti β_2-GPI	4
1.5 Klasifikacijski kriteriji za določitev APS	4
1.6 ELISA kot metoda za določanje protiteles	6
1.7 Parametri vrednotenja	7
1.7.1 Statistika frekvenčne porazdelitve	7
1.7.2 Diagnostična občutljivost in diagnostična specifičnost	7
2 NAMEN DELA	9
3 MATERIALI IN METODE	10
3.1 Humani vzorci	10
3.2 Antigen	10
3.3 Monoklonska protitelesa (MoAb)	11
3.4 Interni standardi in pozitivne kontrole za določanje medanalizne variabilnosti	11
3.5 Encimski konjugati (sekundarna protitelesa)	12
3.6 Kemikalije	12
3.7 Pufri in raztopine	13
3.7.1 Fosfatno pufrana slanica (PBS, pH=7,4)	13
3.7.2 Pufer PBS (pH=7,4) – 0,05 % Tween 20.....	13
3.7.3 Dietanolaminski pufer (DEA, pH=9,8).....	13
3.8 Mikrotitrne plošče	13

3.9	Aparature in pribor	14
3.10	Encimsko imunska metoda na trdnem nosilcu: anti-β_2-GPI ELISA	15
3.10.1	Postopek analize	15
3.10.2	Princip analize	16
3.10.3	Statistična obdelava podatkov.....	17
4	<i>REZULTATI</i>	18
4.1	Variabilnost znotraj analize.....	18
4.2	Medanalizna variabilnost.....	18
4.3	Frekvenčna porazdelitev rezultatov pri krvodajalcih	19
4.4	Statistični podatki in opredelitev praznih vrednosti na podlagi rezultatov pri krvodajalcih	21
4.5	Določanje anti-β_2-GPI pri bolnikih z APS	22
4.6	Določanje parametrov vrednotenja metode	23
5	<i>RAZPRAVA</i>.....	26
5.1	Variabilnost znotraj analize in med analizami	26
5.2	Določanje praznih vrednosti	27
5.3	Diagnostična občutljivost in specifičnost	28
6	<i>SKLEP</i>.....	30
7	<i>LITERATURA</i>	31

POVZETEK

Antifosfolipidni sindrom predstavlja eno najpogostejših avtoimunskih bolezni, ki je opredeljena s trombozami in/ali zapleti v nosečnosti ob prisotnosti t.i. fosfolipidnih avtoprotiteles. Antifosfolipidna protitelesa so zelo raznovrstna skupina protiteles, med katerimi prevladujejo antikardiolipinska protitelesa, lupusni antikoagulant ter protitelesa proti β_2 -glikoproteinu I, ki hkrati predstavljajo laboratorijska merila za razvrstitev antifosfolipidnega sindroma. Protitelesa proti β_2 -glikoproteinu I, ki jih določamo z encimsko imunsko metodo na trdnem nosilcu, so bila med klasifikacijske kriterije sprejeta šele leta 2006 v Sydneyu. Namen naše naloge je bil predvsem s kliničnega vidika ovrednotiti uporabnost rezultatov, pridobljenih na hišni izvedbi metode za določanje prisotnosti avtoprotiteles proti β_2 -glikoproteinu I na podlagi novejših smernic, ki predpisujejo uporabo 99. percentila za določitev praznih vrednosti. Testirali smo 221 serumov krvodajalcev, 45 serumov bolnikov z antifosfolipidnim sindromom ter 172 serumov bolnikov z drugimi avtoimunskimi boleznimi brez antifosfolipidnega sindroma (58 s sistemskim lupusom eritematozusom, 83 z revmatoidnim artritismom, 91 s Sjögrenovim sindromom). Uporabljeno metodo smo najprej ovrednotili z vidika ponovljivosti ter ugotovili zadovoljivo znotraj analizno in med analizno variabilnost. Ob upoštevanju 99. percentila smo določili prazne vrednosti, ki so znašale 3 titrne enote za IgG, 1 titrno enoto za IgM in 2 titrni enoti za IgA. Mejne vrednosti za IgG in IgM so se razlikovale od mejnih vrednosti določenih po metodi standardnih odmikov, ki jih pri diagnostičnem delu že vrsto let uporabljajo v Laboratoriju za imunologijo revmatizma in znašajo 2 titrni enoti za vse izotipe protiteles proti β_2 -glikoproteinu. V okviru naloge smo dokazali, kako različno postavljene prazne vrednosti vplivajo na diagnostično uporabnost dobljenih rezultatov. Diagnostična občutljivost je ob upoštevanju novo postavljenih praznih vrednosti znašala 82,2 %, 28,8 % ter 48,9 % za IgG, IgM ter IgA, skupna diagnostična občutljivost za vse tri razrede pa je bila za 4 odstotne točke nižja od diagnostične občutljivosti določene ob upoštevanju starih praznih vrednosti, medtem ko je bila diagnostična specifičnost za približno 2 odstotni točki višja. Diagnostična specifičnost se je ob upoštevanju kontrolne skupine v katero so bili vključeni le krvodajalci za posamezen razred protiteles gibala med 96,4 % in 98,2 %.

Ključne besede: antifosfolipidni sindrom, β_2 -glikoprotein I, protitelesa proti β_2 -GPI
klasifikacijski kriteriji, diagnostična uporabnost

ABSTRACT

The antiphospholipid syndrome is one of the most common autoimmune diseases characterised by thrombosis and/or recurrent complication of pregnancy in concurrent presence of antiphospholipid autoantibodies. Antiphospholipid autoantibodies are a heterogenous group of antibodies, among which anticardiolipin antibodies, lupus anticoagulant and anti- β_2 -glykoprotein I antibodies are the most common and present laboratory criteria for classification of antiphospholipid syndrome. In 2006 anti- β_2 -glykoprotein I antibodies measured by ELISA have been added to the revised Sydney classification criteria.

In our thesis the main goal was to evaluate clinical value of anti- β_2 -glykoprotein based on new recommendation to use 99th percentil for cut off calculation. We analysed 221 serums of blood donors, 45 serums of patients with antiphospholipid syndrome and 172 serums of patients with other autoimmune disorders (58 SLE patients, 83 patients with rheumatoid arthritis and 91 with Sjögren syndrome). At first we have evaluated ELISA in terms of precision and have confirmed satisfactory inter- and intra-variability. Cut-off levels calculated based on 99th percentile in titer units were 3 for IgG, 1 for IgA and 2 titer units for IgM respectively. IgG and IgM cut-offs were different compared to cut-off values used in the Laboratory for several years and has been calculated based on standard deviation approach (cut-off is 2 titre unit for IgG, IgM and IgA).

In thesis we have demonstrated the impact of cut-off levels on diagnostic value of results. Based on new cut-offs diagnostic sensitivity was 82.2 %, 28.8 % and 48.9 % for IgG, IgM and IgA respectively and overall diagnostic sensitivity was approximately 4 % lower in comparison to diagnostic sensitivity calculated based on »old« cut-off levels. Overall diagnostic specificity increased for about 2% if calculated based on »new« cut-offs. (diagnostic specificity was 96,4 % - 98,2 % when only blood donors were included in control group).

Keywords: antiphospholipid syndrome, β_2 -glycoprotein, β_2 -GPI autoantibodies, classification criteria, diagnostic value

SEZNAM OKRAJŠAV

aCL	antikardiolipinska protitelesa (<i>ang. anticardiolipinantibodies</i>)
anti- β_2 -GPI	protitelesa proti β_2 -GPI
anti- β_2 -GPI ELISA	ELISA za določanje protiteles proti β_2 -GPI
aPL	antifosfolipidna protitelesa
APS	antifosfolipidni sindrom
AU	arbitrarne enote
AUA	arbitrarne enote za IgA
AUG	arbitrarne enote za IgG
AUM	arbitrarne enote za IgM
β_2 -GPI	β_2 -glikoprotein I
CV	koeficient variabilnosti (<i>ang. Coefficient of variability</i>)
DEA	dietanolaminski pufer
ELISA	encimsko imunska metoda na trdnem nosilcu (<i>ang. Enzyme linked immunosorbent assay</i>)
IgA	imunoglobulin razreda A
IgG	imunoglobulin razreda G
IgM	imunoglobulin razreda M
LA	lupusni antikoagulant
mOD	absorbanca x 1000 (<i>ang. Optical density value x 1000</i>)
PBS	fosfatno pufrana slanica (<i>ang. Phosphate buffered saline</i>)
PBS-0,05% Tw 20	0,05% Tween 20 v fosfatno pufrani slanici
<i>p.v.</i>	pražna vrednost
RA	revmatoidni artritis
SD	standardna deviacija
SLE	sistemski lupus eritematozus
SjS	Sjögrenov sindrom
TU	titerna enota (<i>ang. Titer Unit</i>)
VDRL	flokulacijski test za dokazovanje sifilisa (<i>ang. Venereal Disease Research Laboratory test</i>)

1 UVOD

1.1 Antifosfolipidni sindrom

Antifosfolipidni sindrom (APS) danes predstavlja eno najpogostejših avtoimunskih bolezni, ki je opredeljena s trombozami in/ali zapleti v nosečnosti ob prisotnosti t.i. fosfolipidnih avtoprotiteles (1).

APS je kot samostojno, od sistemskega lupusa eritematozusa (SLE) ločeno klinično-laboratorijsko entiteto leta 1983 prvi opisal Graham Hughes, zaradi česar so njemu v čast APS poimenovali tudi Hughesov sindrom. Opis je temeljil na desetletjih dela in raziskovanja ter številnih primerih. Prvi klinični opis je vseboval ponavljajoče arterijske in venske tromboze, izgube plodu ter trombocitopenije (1, 2).

Zgodovinsko lahko razvoj odkritja in razumevanja APS razdelimo na tri obdobja in sicer t.i. obdobje »opazovanja« med leti 1953 – 1983, obdobje »ekspotencialne rasti zanimanja« od 1983 do 1995 ter obdobje »utrditve in izboljšanja v razumevanju APS«, ki se je pričelo okoli leta 1995 in še vedno traja (3).

V obdobju med in po 2. svetovni vojni, so ob množičnem testiranju na sifilis poročali o številnih primerih, ko je bil serološki test VDRL (*Veneral Disease Research Laboratory*) na sifilis pozitiven, vendar so bili posamezniki brez kliničnih znakov sifilisa. Pri mnogih od njih, se je čez leta razvil SLE. Moore and Mohr sta leta 1952 prva uvedla izraz lažno pozitivni serološki test za sifilis. Kasneje, leta 1957, sta Laurell in Nilsson pri mnogih lažno pozitivnih testih na sifilis ugotovila prisotnost lupusnega antikoagulanta (LA) medtem ko ga pri dejanskih bolnikih s sifilisom niso zasledili. Bowie, Alarcon-Segovia ter Osmundsun so z objavo prvih poročil o povezavi trombotičnih dogodkov z LA v letih 1963 – 1965 položili temelje za nadaljnje raziskave, ki so vodile do odkritja APS, leta 1980 pa so Soulier in Boffa, ter leto kasneje Carreras s sodelavci prvič objavili trojno povezavo med ponavljajočimi splavi, trombozami in LA. Leta 1985 je Hughes prvič uvedel izraz antikardiolipinski sindrom, ki pa so ga že dve leti kasneje preimenovali v APS. Pri VDRL testu so kot antigen uporabljal alkoholni ekstrakt govejega srca, ki je vseboval fosfolipid, ki so ga poimenovali kardiolipin. To je v začetku 80-ih let vodilo v razvoj radiomunskih (RIA) in nato encimsko imunskih testov na trdnem nosilcu (ELISA) za odkrivanje antifosfolipidnih protiteles, pri katerih so kot antigen uporabili kardiolipin, in jih

poimenovali antikardiolipinski testi. Leta 1990 so tri neodvisne raziskovalne skupine raziskovalcev prišle do spoznanja, da pri ELISA testih antifosfolipidna protitelesa za vezavo na kardiolipin potrebujejo kofaktor, plazemski protein β_2 -glikoprotein I (β_2 -GPI). V tem letu so s pomočjo eksperimentalnih živalskih modelov potrdili povezavo aPL s kliničnimi manifestacijami. Od takrat so odkrili še številne druge proteinske kofaktorje (2-5).

V preteklosti so APS pogosto delili na primarni APS, kjer bolezen nastopa kot samostojni sindrom ter sekundarni APS, če je sočasno prisotna še neka druga bolezen, najpogosteje SLE. Dandanes taka delitev ni zaželeno, saj v kliničnem pogledu ni razlik med njima, ampak se priporoča navedba bolezni, ki se pojavlja sočasno z APS. Poznamo še t.i. katastrofični APS, ki je zelo redka oblika bolezni, ki izredno hitro napreduje in je pogosto smrtna (4, 6, 7).

V nevrologiji naj bi bil APS povezan z do 20 % kapi pri ljudeh, mlajših od 40 let. Odkritje in opis APS sta ogromno prispevala k spremembi načina zdravljenja ter končnemu izidu bolezni. Uspeh v nosečnosti je npr. narasel iz 20 % na več kot 80 % živorojenih otrok pri ženskah s to boleznijo (2).

1.2 Antifosfolipidna protitelesa

Antifosfolipidna protitelesa (aPL) so zelo raznovrstna skupina protiteles, ki so usmerjena proti negativno nabitim ali nevtralnimi fosfolipidom, (npr. kardiolipinu, fosfatidilserinu, fosfatidiletanolaminu ter drugim), kompleksom fosfolipid - serumski protein ali serumskim proteinom, ki imajo visoko afiniteto do fosfolipidov (8). Do sedaj najbolj raziskana in poznana so antikardiolipinska protitelesa (aCL), LA ter protitelesa proti β_2 -GPI (anti- β_2 -GPI) (9).

Pojavnost aPL v splošni zdravi populaciji je majhna. Glede na obsežne študije se giblje med 2 % in 7 % ter narašča s starostjo (do 12% pri starejših od 65 let). Poleg APS, se aPL pojavljajo še pri številnih drugih sistemsko vezivnih boleznih. Pri bolnikih s SLE so različne študije pokazale pojavnost anti- β_2 -GPI od 10 do 18 % (1).

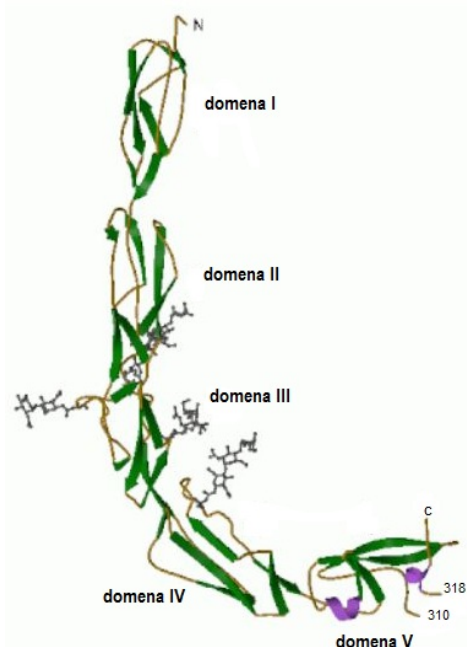
Prehodno povišane vrednosti aPL se lahko pojavijo tudi pri določenih virusnih infekcijah (npr. HIV, citomegalovirus, hepatitis B in C), bakterijskih okužbah (gobavost, sifilis), malignih obolenjih in ob jemanju določenih zdravil kot so nekateri antibiotiki, hidralazin,

prokainamid in klorpromazin (10, 11). Pri infekcijskih obolenjih so večinoma prisotna aCL, ki se vežejo direktno na kardiolipin in niso vključena v patogenezo APS (1).

Pri bolnikih z APS se večina aPL ne veže direktno na fosfolipide, temveč so usmerjena proti plazemskim proteinom, ki se vežejo z negativno nabitimi molekulami. Taki plazemski proteini so β_2 -GPI, protrombin, aneksin V, protein C, visoko molekularni kinonogeni in drugi, med katerimi pa velja za enega najpomembnejših β_2 -GPI (8, 12).

1.3 β_2 -glikoprotein I

β_2 -GPI je približno 50 kDa velik enoverižni protein, sestavljen iz 326 aminokislin, ki v glavnem nastaja v jetrih ter posteljici in se v plazmi nahaja v koncentraciji okoli



Slika 1: Struktura β_2 -GPI (13)

200 $\mu\text{g/ml}$. Sestavlja ga 5 homolognih domen; prve štiri domene vsebujejo po 60 aminokislin, domena V pa ima dodatno zanko na končnem C-delu in skupek lizinov, ki predstavlja pozitivno nabit del molekule. Glede na kristalno strukturo, se β_2 -GPI s tem delom veže v lipidni dvosloj ter z drugimi negativno nabitimi molekulami kot so heparin, DNA, oksidiran LDL in z apoptotičnimi telesci. Za vsako od domen I – IV sta značilni po dve notranji disulfidni vezi, za razliko od domene V, ki vsebuje tri notranje disulfidne vezi. Epitopi za vezavo anti- β_2 -GPI ležijo na vseh domenah β_2 -GPI, vendar ležijo na domenah III in IV 4 glikacijska mesta, ki otežujejo vezavo proteinov (Slika 1) (14,15,16).

Po svoji kristalni strukturi β_2 -GPI posnema obliko črke »J« oz. hokejske palice (Slika 1), vendar v raztopini prevzame »S« konformacijo ali celo krožno konformacijo, pri kateri si domeni I in V ležita nasproti, vezavna mesta za avtoprotitelesa pa so zaščitena (17).

β_2 -GPI velja za naravni antikoagulant v telesu, vpleten naj bi bil tudi v metabolizmu lipidov, vendar njegova točna vloga v telesu še ni popolnoma pojasnjena (17). *In vitro* β_2 -GPI aktivira encim lipoprotein lipazo, zato so ga poimenovali tudi lipoprotein H. Goveji

in humani β_2 -GPI kažeta visoko stopnjo homologije (približno 85 %) in se oba široko uporabljata v diagnostičnih sistemih (14).

1.4 Protitelesa proti β_2 -GPI

Protitelesa proti β_2 -GPI so zelo heterogena skupina protiteles, ki se lahko vežejo na različne epitope na β_2 -GPI, so vpletena v različne patološke mehanizme in se med seboj razlikujejo v avidnosti. Patološke so le določene podskupine teh avtoprotiteles. S kliničnimi manifestacijami naj bi bila povezana predvsem tista, ki se vežejo na domeno I β_2 -GPI (16). Proučevali so povezavo med protitelesi proti β_2 -GPI in kliničnimi manifestacijami. Poročila kažejo signifikantno povezavo IgM in IgG avtoprotiteles v visokih titrih s trombozami. IgA izotip anti- β_2 -GPI je slabše raziskan, vendar prav tako nakazuje možno povezavo s pojavom tromboz. (14). Na nastanek tromboz naj bi anti- β_2 -GPI vplivala preko različnih mehanizmov med katerimi so inhibicija antikoagulantne aktivnosti β_2 -GPI, zaviranje aktivacije proteina C, ki deluje kot antikoagulant (protein C razgrajuje faktorja Va in VIIIa, ki sodelujeta v procesu koagulacije), celično posredovani mehanizmi, pospešitev ateroskleroze ter številni drugi (8,14).

Anti- β_2 -GPI predstavljajo danes samostojni laboratorijski kriterij za določitev APS in imajo v primerjavah z aCL večjo napovedno vrednost za arterijsko trombozo. V primerjavi z LA in aCL izkazujejo večjo diagnostično specifičnost za APS (7,18).

Različne študije navajajo, da naj bi imelo med 11 % in 27 % bolnikov z APS pozitiven rezultat le na anti- β_2 -GPI, kar je več kot pojavljanje le LA ali le aCL. Anti- β_2 -GPI so tudi v večji meri povezana z arterijskimi trombozami kot venskimi trombozami pri bolnikih s primarnim APS (17).

1.5 Klasifikacijski kriteriji za določitev APS

Prve preliminarne klasifikacijske kriterije za opredelitev APS so sprejeli leta 1998 na mednarodnem kongresu v Sapporu in jih nato na podlagi obstoječih študij in dokazov revidirali leta 2005 na mednarodni delavnici v Sydneyu. Med najpomembnejšimi spremembami je bila vključitev protiteles proti β_2 -glikoproteinu I razreda IgG in/ali IgM kot dodatnega neodvisnega laboratorijskega merila (1, 7). Za potrditev nedvomnega APS mora biti izpolnjeno vsaj eno od kliničnih meril in eden od laboratorijskih kriterijev, ki so prikazani v preglednici I.

Preglednica I: Revidirana klasifikacijska merila za razvrstitev APS sprejeta na kongresu o antifosfolipidnih protitelesih 2006 v Sidneyu (7). Podčrtan kriterij smo obravnavali v tej diplomski nalogi.

Klinična merila
<p>1. Vaskularna tromboza</p> <p>Ena ali več epizod arterijske, venske ali maložilne tromboze v katerem koli tkivu ali organu. Trombozo moramo potrditi z objektivnim veljavnim kriterijem (s slikovnimi metodami ali histopatološkim izvidom). Površinska venska tromboza je izključena iz meril.</p> <p>2. Zapleti v nosečnosti</p> <p>(a) Ena ali več nepojasnjenih smrti morfološko normalnega plodu v ali po 10. tednu nosečnosti, ki je morfološko normalen (morfologijo plodu preverimo z ultrazvokom ali z neposrednim pregledom fetusa);</p> <p>(b) Eden ali več prezgodnjih rojstev morfološko normalnih otrok pred 34. tednom nosečnosti zaradi eklampsije ali hude preeklampsije, ali insuficience posteljice;</p> <p>(c) Trije ali več nepojasnjenih zaporednih spontanih splavov pred 10. tednom nosečnosti, pri katerih smo izključili vse anatomske nepravilnosti maternice, hormonske motnje in starševske kromosomske nepravilnosti.</p>
Laboratorijska merila
<p>1. Lupusni antikoagulant (LA) prisoten v plazmi dvakrat ali večkrat v razmaku najmanj 12 tednov. LA določamo na podlagi smernic Mednarodne zveze o trombozi in hemostazi (ISTH - <i>International Society on Trombosis and Haemostasis</i>).</p> <p>2. Antikardiolipinska protitelesa (aCL) razreda IgG in/ali IgM v serumu ali plazmi, prisotna v območju srednjega ali visokega titra (> 40GPL ali MPL ali > 99. percentil); določena dvakrat ali večkrat v razmaku najmanj 12 tednov s pomočjo standardizirane ELISA.</p> <p>3. Protitelesa proti β_2-glikoproteinu I razreda IgG in/ali IgM prisotna v serumu ali plazmi (<u>v titru > 99. percentil</u>), dvakrat ali večkrat v razmaku najmanj 12 tednov, določena s standardizirano ELISA, v skladu s priporočenimi postopki.</p>

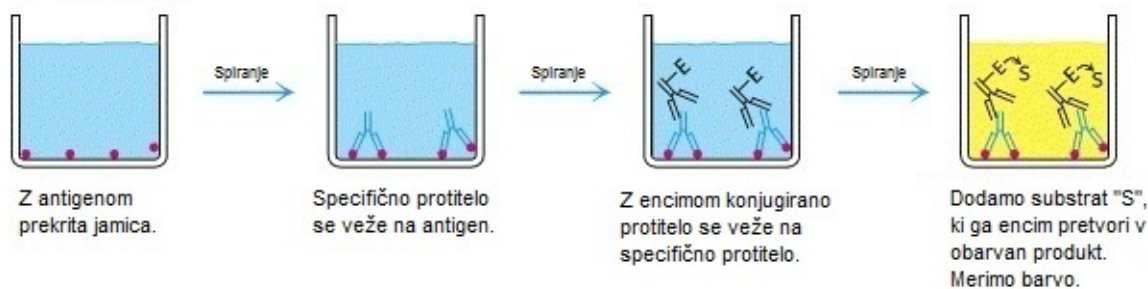
Če je med pozitivnim laboratorijskim testom in klinično manifestacijo manj kot 12 tednov razmika, ali je po drugi strani minilo več kot 5 let, je klasifikacija APS vprašljiva. Manjša nihanja v titrih aPL so sicer običajna, vendar se na podlagi posamičnih objavljenih primerov količina protiteles lahko pred trombotičnim dogodkom zmanjšuje celo do popolne negativnosti ob samem dogodku (19). Pomembno je tudi, da so testi aPL pozitivni skozi daljše časovno obdobje. Da bi se izognili napačnemu postavljanju diagnoze APS zaradi prehodno prisotnih aPL, so interval med dvema pozitivnima testoma povečali iz 6 na 12 tednov (7, 20).

V povezavi z APS so poročali tudi o številnih drugih kliničnih motnjah in seroloških značilnostih, ki pa vsaj zaenkrat še niso del klasifikacijskih kriterijev, med katerimi so okvara srčnih zaklopk, hemolitična anemija, livedo retikularis, trombocitopenija, nefropatija, nevrološke manifestacije (prehodna cerebralna ishemija, možganska kap, transverzalna mielopatija, mielitis, horea, migrena, kognitivna disfunkcija), IgA anti- β_2 -GPI, avtoprotitelesa proti trombinu, avtoprotitelesa proti fosfatidilserinu ter drugi (8,7,21). IgA anti- β_2 -GPI zaradi nasprotnojučih si podatkov glede uporabnosti v diagnostiki APS niso vključena v klasifikacijske kriterije. Njihovo določanje kljub temu priporočajo pri posameznih bolnikih, kjer obstaja sum na APS, kljub negativnim rezultatom za preostale aPL (7, 17).

1.6 ELISA kot metoda za določanje protiteles

Encimsko imunske metode spadajo v skupino metod vezanja ligandov tako kot radioimunske metode, od katerih se razlikujejo po načinu detekcije. Med encimsko imunske metode lahko tako uvrščamo vse tiste metode, pri katerih kot reagente uporabljamo encime in protitelesa ločeno ali povezano v isti reagent. Najpogosteje se srečamo z reagentom, kjer je encim kovalentno vezan na protitelo, ki ga uporabljamo za detekcijo bodisi antigenov, bodisi protiteles. Glede na izvedbo jih delimo v več skupin. Ena izmed njih je tudi encimsko imunska metoda na trdem nosilcu (ELISA), pri kateri poteka encimska reakcija v mikrotitrskih ploščah z ravnim dnom. Encim, običajno alkalna fosfataza ali peroksidaza, reagira z brezbarvnim substratom in nastane obarvan produkt, ki ga merimo spektrofotometrično. Za razliko od ostalih metod, ELISA, ob uporabi ustrezne umeritvene krivulje z znanimi koncentracijami antigena ali protiteles, omogoča poleg kvalitativnega tudi kvantitativno določanje analita. Pri določevanju protiteles, se običajno odločimo za indirektno ELISA (22, 23).

Pri indirektnem ELISA testu v mikrotitrsko vdolbinico, ki je prekrita z antigenom, naneseimo preiskovani vzorec (Slika 2). V kolikor vzorec vsebuje za antigen specifična protitelesa, se le-ta vežejo nanj. Nevezane snovi speremo in dodamo z encimom konjugirana sekundarna protitelesa, ki se vežejo na primarna protitelesa. Nevezana protitelesa speremo in dodamo ustrezen substrat za encim. Obarvan produkt merimo s posebnim spektrofotometrom za merjenje v mikrotitrskih ploščah (23).



Slika 2: Princip določanja protiteles z indirektno ELISA (24)

1.7 Parametri vrednotenja

Pri vsakem laboratorijskem delu je pomembno, da dobimo kakovostne rezultate, ki so natančni, točni in zanesljivi, metode, s katerimi delamo, pa morajo biti selektivne, občutljive in specifične. Poleg ustrezne analitske občutljivosti in specifičnosti je pomembno tudi, da nimamo lažno negativnih ali lažno pozitivnih rezultatov (Preglednica II) oz. je teh čim manj, saj je to predpogoj za sprejemanje pravih odločitev.

1.7.1 Statistika frekvenčne porazdelitve

Frekvenčna porazdelitev je razvrstitev statističnih enot populacije po vrednosti spremenljivke v pripadajoče razrede. Ločimo normalno frekvenčno porazdelitev in nenormalno frekvenčno porazdelitev. Normalna porazdelitev ima značilno zvonasto obliko, je simetrična in normalno sploščena. Za ugotavljanje oblike porazdelitve rezultatov lahko uporabimo grafično metodo (npr. histogram), izračunamo statistične parametre (sploščenost in asimetričnost) ali pa uporabimo katerega od statističnih testov za preverjanje normalne distribucije kot sta Kolmogorov-Smirnov test in Shapiro-Wilk test (25). Pri nenormalni porazdelitvi določimo mejne vrednosti na podlagi percentilov, če pa se vrednosti porazdeljujejo normalno, lahko mejne vrednosti določimo tudi z uporabo standardne deviacije, ki predstavlja razpršenost rezultatov.

1.7.2 Diagnostična občutljivost in diagnostična specifičnost

Diagnostična občutljivost in diagnostična specifičnost sta parametra vrednotenja rezultatov na osnovi zanesljivih in primerljivih metod. Ker različne izvedbe imunokemijskih reakcij ne določajo vedno istega spektra protiteles, se lahko diagnostična občutljivost in diagnostična specifičnost rezultatov, pridobljenih z različnimi metodami, razlikujeta.

Diagnostična občutljivost predstavlja delež preiskovancev z boleznijo, ki imajo patološki laboratorijski izvid (25). Večja kot je diagnostična občutljivost, manj lažno negativnih rezultatov dobimo.

Diagnostična specifičnost predstavlja delež preiskovancev (zdravih ali bolnih), ki nimajo preiskovane bolezni, pri katerih je laboratorijski izvid »normalen« oziroma ni patološki (25, 26). Večja diagnostična specifičnost pomeni manj lažno pozitivnih rezultatov

Diagnostično občutljivost in specifičnost izračunamo z enačbama 1 in 2, pri čemer si pomagamo s preglednico II.

$$\text{Diagnostična občutljivost } v \% = (a/(a+c)) \times 100 \qquad \text{enačba 1}$$

$$\text{Diagnostična specifičnost } v \% = (d/(b+d)) \times 100 \qquad \text{enačba 2}$$

Preglednica II: Pomožna razpredelnica za izračun diagnostične občutljivosti ali specifičnosti (25)

		Bolezen		
		Prisotna	Odsotna	Skupaj
Test	Pozitiven	a - pravilno pozitivni	b - lažno pozitivni	a+b
	Negativen	c - lažno negativni	d - pravilno negativni	c+d
	Skupaj	a+c	b+d	

2 NAMEN DELA

Protitelesa proti β_2 -GPI predstavljajo enega od sprejetih laboratorijskih meril za določanje APS. ELISA za določanje anti- β_2 -GPI, ki jo izvajajo v Laboratoriju za imunologijo revmatizma Kliničnega oddelka za revmatologijo UKC Ljubljana, je metoda lastne izvedbe («in house») in jo že vrsto let uporabljajo v diagnostiki APS. Smernice za vrednotenje rezultatov metode so se v zadnjih letih spremenile, zato je bilo potrebno nekatere parametre ponovno preveriti. Namen naloge je predvsem s kliničnega vidika ovrednotiti uporabnost rezultatov pridobljenih na hišni izvedbi metode za določanje prisotnosti avtoprotiteles proti β_2 -glikoproteinu I, pri čemer so naši cilji sledeči:

- določitev ponovljivosti metode;
- določitev praznih vrednosti anti- β_2 -GPI na podlagi testiranja serumov krvodajalcev s poudarkom na uporabi 99. percentile v skladu z zadnjimi veljavnimi klasifikacijskimi kriteriji, ki so bili sprejeti leta 2006 v Sydney-u;
- določitev diagnostične občutljivosti in diagnostične specifičnosti na podlagi 99. percentile;
- primerjava diagnostične občutljivosti in diagnostične specifičnosti določene na podlagi praznih vrednosti po starem pristopu (standardni odmiki od srednje vrednosti ob predpostavki normalnega porazdelevanja rezultatov) z vrednostmi, določenimi po novem pristopu (percentili).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Humani vzorci

Za analize v okviru naše naloge smo uporabili:

- 221 serumov klinično zdravih ljudi (krvodajalcev) (139 moških in 82 žensk, starih od 19 do 65 let);
- 45 serumov bolnikov z APS, (17 moških in 28 žensk, starih od 10 do 65 let);
- 58 serumov bolnikov s SLE, (ženske, stare od 19 do 71 let);
- 83 serumov bolnikov z revmatoidnim artritidom (RA), (10 moških in 73 žensk, starih od 28 do 82 let);
- 91 serumov bolnikov s Sjögrenovim sindromom (SjS), (6 moških in 79 žensk, 6 ni podatka o spolu, starih od 17 do 77 let).

Serume krvodajalcev smo dobili iz krvne banke Zavoda za transfuzijo krvi, medtem ko so serumi bolnikov s sistemskimi avtoimunskimi boleznimi iz obstoječih bank Kliničnega oddelka za revmatologijo, SPS Interne klinika, UKC Ljubljana.

Uporabo ostankov serumov krvodajalcev je odobrila Komisija za medicinsko etiko RS.

Vzorci bolnikov so bili pridobljeni za diagnostične namene, pri čemer so bolniki soglašali z uporabo ostankov serumov v raziskovalne namene.

3.2 Antigen

Humani β_2 -GPI (koncentracija 1 g/l), pridobljen z izolacijo v Laboratoriju po modificirani metodi (27, 28).

3.3 Monoklonska protitelesa (MoAb)

- IgG Sapporo Standard **HCAL** 508668, IgG aCL and anti- β_2 GPI antibody ELISA Control and/or Standard Curve, INOVA Diagnostics, Inc. San Diego.
- IgM Sapporo Standard **EY2C9** 50863, IgM aCL and anti- β_2 GPI antibody ELISA Control and/or Standard Curve, INOVA Diagnostics, Inc. San Diego, ZDA.

HCAL je himerno IgG monoklonsko protitelo, ki je sestavljeno iz humanih $\gamma 1$ in κ konstantnih regij ter variabilne regije iz monoklonskega protitelesa WBCAL-1, pridobljenega iz mišjega modela APS, ki ima in vitro lastnosti podobne anti- β_2 GPI bolnikov z APS. Pridobili so ga s pomočjo celične linije (29).

EY2C9 je IgM monoklonsko protitelo, ki so ga pridobili iz periferne krvi bolnikov z APS z uporabo kombinirane tehnike transformacije z Epstein-Barr virusom in hibridizacije somatskih celic (30).

Monoklonski protitelesi HCAL in EY2C9 prepoznata epitope na β_2 -GPI, ki je vezan na kardiolipin ali na oksigenirano polistirensko površino ter se uporabljata za kontrolo kakovosti pri ELISA za določevanje antikardiolipinskih in anti- β_2 -GPI protiteles (29, 30).

3.4 Interni standardi in pozitivne kontrole za določanje medanalizne variabilnosti

Interne standarde (IS) predstavljajo predhodno večkrat testirani serumi bolnikov z diagnosticiranim APS, ki smo jih dobili iz obstoječih serumskih bank Kliničnega oddelka za revmatologijo.

- VA (IgA)
- G820 (IgM in IgA)
- P449 (IgG- redčen 1:2, IgM, IgA)
- SM (IgG, IgA)
- 3 pozitivne kontrole za vsakega od Ig (POZ G, POZ M, POZ A)

Oznake standardov so identične oznakam, ki jih uporabljajo v Laboratoriju za imunologijo revmatizma Kliničnega oddelka za revmatologijo UKC Ljubljana pri diagnostičnem delu.

3.5 Encimski konjugati (sekundarna protitelesa)

Afinitetno prečiščena kozja protitelesa, konjugirana z encimom alkalno fosfatazo usmerjena proti človeškim:

- IgG, specifična za Fc_γ fragment (0,6 mg/ml);
- IgM, specifična za Fc_{5μ} fragment (0,6 mg/ml);
- IgA, specifična za verigo α (0,6 mg/ml);

Accurate Chemical & Scientific Corporation (ACSC), Westbury, ZDA

3.6 Kemikalije

- Dietanolamin (NH(C₂H₅OH)₂), analitsko čist, MP Biomedicals, LLC, Illkirch, Francija
- Etanol, absolutni (C₂H₅OH), analitsko čist, Riedel-de Hën, Sigma-Aldrich GmbH, Seelze, Nemčija
- Kalijev dihidrogenfosfat (KH₂PO₄), analitsko čist, Merck, Darmstadt, Nemčija
- Kalijev klorid (KCl), analitsko čist, Merck, Darmstadt, Nemčija
- Klorovodikova kislina (HCl), 37 %, Merck, Darmstadt, Nemčija
- Magnezijev klorid heksahidrat (MgCl₂ x 6H₂O), analitsko čist, Kemika, Zagreb, Hrvaška
- Natrijev azid (NaN₃), Merck, Darmstadt, Nemčija
- Natrijev hidrogenfosfat dihidrat (Na₂HPO₄ x 2H₂O), analitsko čist, Kemika, Zagreb, Hrvaška
- Natrijev hidroksid (NaOH), analitsko čist, Kemika, Zagreb, Hrvaška
- Natrijev klorid (NaCl), analitsko čist, Kemika, Zagreb, Hrvaška
- *Para*-nitrofenil-fosfat tablete, pNPP, (5 mg substrata/tableto), Sigma, St. Louis, ZDA
- Tween 20, polioksietilen sorbitan monolavrat, C₅₈H₁₁₄O₂₆, Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija

3.7 Pufri in raztopine

3.7.1 Fosfatno pufrana slanica (PBS, pH=7,4)

	1 ×
Natrijev klorid (NaCl)	8,00 g
Kalijev klorid (KCl)	0,20 g
Natrijev hidrogenfosfat dihidrat (Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O)	1,15 g
Kalijev dihidrogenfosfat (KH ₂ PO ₄)	0,20 g
Demineralizirana voda (H ₂ O)	do 1000 ml

Po potrebi uravnamo pH z 2 M HCl ali 2 M NaOH

3.7.2 Pufer PBS (pH=7,4) – 0,05 % Tween 20

Tween 20	0,50 g
PBS (pH 7,4)	do 1000 g

3.7.3 Dietanolaminski pufer (DEA, pH=9,8)

	200 ml	500 ml
Demineralizirana voda (H ₂ O)	150 ml	320 ml
Magnezijev klorid (MgCl ₂ x 6H ₂ O)	0,02 g	0,05 g
Natrijev azid (NaN ₃)	0,04 g	0,10 g
Dietanolamin (NH(C ₂ H ₅ OH) ₂)	20,40 g	51,0 g
2 M HCl do pH=9,8	~20 ml	~50 ml
Demineralizirana voda (H ₂ O)	do 200 ml	do 500 ml

Po potrebi uravnamo pH z 2 M HCl ali 2 M NaOH

3.8 Mikrotitrne plošče

Polistirenske mikrotitrne plošče, Costar® 3590, 96 Well EIA/RIA Plate, Flat Bottom without Lid, High Binding, Certified Surface Chemistry, Non-Sterile, Corning Incorporated, Corning, NY, ZDA

3.9 Aparature in pribor

- ročni spiralec TECAN CE, Avstrija
- spektrofotometer za mikrotitrne plošče, SunRiseTecan, Tecan Tradin AG, Švica
- tehtnica, Mettler Toledo, PM2500, Mettler Toledo AG Greifensee, Švica
- pH meter, Mettler Toledo Seven Easy, Columbus
- magnetno mešalo
- inkubator mikrotitrskih plošč, Laboratorij za imunologijo revmatizma, KOR-KC, Ljubljana
- stojalo za pipete
- pipete in multipipete, Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- pipetni nastavki, Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- steklovina (čase, epruvete, erlenmajerice, merilni valji, stekleničke, steklene palčke)
- plastične kadičke, kapalke, epice
- stančevina, spatule, žličke, kartice za tehtanje

3.10 Encimsko imunska metoda na trdnem nosilcu: anti- β_2 -GPI ELISA

Analize smo izvajali po protokolu za določanje avtoprotiteles proti β_2 -GPI z encimsko imunsko metodo na trdnem nosilcu (ELISA). Metoda je hišne izvedbe («in house») in jo v rutini že vrsto let uporabljajo v Laboratoriju za imunologijo revmatizma v specialistični diagnostiki avtoimunskih motenj. Z njo smo določili avtoprotitelesa proti β_2 -GPI razreda IgG, IgM in IgA.

3.10.1 Postopek analize

Najprej smo pripravili raztopino antigena s končno koncentracijo 10 $\mu\text{g/ml}$, tako da smo 150 μl β_2 -GPI s koncentracijo 1 g/L, dodali 14850 μl predhodno pripravljenega pufra PBS pH 7,4. Glede na vrsto protiteles, ki jih določamo, smo označili 3 polistirenske mikrotitrne plošče (IgG, IgM in IgA), da kasneje med analizo ne bi prišlo do zamenjave in napak. V vsako vdolbinico mikrotitrskih plošč Costar High Binding smo nanesti 50 μl pripravljene raztopine antigena ter plošče 2 uri inkubirali v inkubatorju pri sobni temperaturi (22 °C – 26 °C). Nato smo sprali enkrat s po 250 μl pufra PBS-0,05% Tw 20 ter plošče ročno otresli. Na tako pripravljene plošče smo nanesti predhodno pripravljene raztopine vzorcev, kontrol in standardov. Raztopine vzorcev, pozitivnih kontrol in internih standardov (G820, P449 in SM) smo pripravili z redčenjem 1:100 (4 μl vzorca/kontrola smo dodali po 396 μl pufra PBS-0,05% Tw 20). Standarde za umeritveno krivuljo (MoAb in VA) pa smo pripravili po predpisani shemi redčenja (Preglednica III). Ponovno smo 30 minut inkubirali v inkubatorju pri sobni temperaturi. Po zaključeni inkubaciji smo plošče štirikrat sprali s PBS-0,05% Tw 20 in sicer s po 250 μl na vdolbinico.

Pripravili smo encimske konjugate za IgG, IgM in IgA, ter jih ločeno nanesti po 50 μl na vdolbinico. Po 30 minutah inkubacije pri sobni temperaturi smo plošče štirikrat sprali s pufrom PBS-0,05% Tw 20.

Raztopino substrata smo pripravili 5 minut pred nanosom tako, tako da smo 6 tablet NPP raztopili v 30 ml DEA (pH=9,8) pufri. Substrat smo na posamezne mikrotitrne plošče nanesti z nekoliko časovnega zamika, najprej na IgG, nato pa še na IgM in IgA ploščo in sicer po 100 μl substrata na vdolbinico. Upoštevati je bilo treba čas, potreben, da za določen razred Ig poteče reakcija ter dejstvo, da lahko naenkrat pomerimo le eno ploščo.

Ko je potekla reakcija in je prišlo do obarvanja, smo pomerili absorbanco pri 405 nm in referenčnem filtru 690 nm. Zabeležili smo čas inkubacije. Absorbance raztopin na mikrotitrskih ploščah so bile izmerjene v več časovnih točkah, s čimer smo spremljali potek encimske reakcije. Upoštevali smo tiste absorbance, pri katerih so vrednosti merjenih monoklonskih protiteles in internega standarda VA najboljše korelirale s predhodno določenimi referenčnimi vrednostmi.

Preglednica III: Shema za priprave standardov za umeritveno krivuljo. Vsako od dobljenih raztopin smo uporabili v naslednjem koraku, da smo dobili dvakrat nižjo koncentracijo.

IgG HCAL	PBS-0,05%Tw	Konc. HCAL
10 µl HCAL[2,2µg/ml]	210 µl	100 ng/ml
110 µl raztop. [100 ng/ml]	110 µl	50 ng/ml
110 µl raztop. [50 ng/ml]	110 µl	25 ng/ml
110 µl raztop. [25 ng/ml]	110 µl	12,5 ng/ml
110 µl raztop. [12,5 ng/ml]	110 µl	6,25 ng/ml
110 µl raztop. [6,25 ng/ml]	110 µl	3,12 ng/ml
IgM EY2C9	PBS-0,05%Tw	Konc. EY2C9
4 µl EY2C9L15,7µg/ml]	246 µl	500 ng/ml
125 µl raztop. [500 ng/ml]	125 µl	250 ng/ml
125 µl raztop. [250 ng/ml]	125 µl	125 ng/ml
125 µl raztop. [125 ng/ml]	125 µl	62,5 ng/ml
125 µl raztop. [62,5 ng/ml]	125 µl	31,25 ng/ml
125 µl raztop. [31,25 ng/ml]	125 µl	15,62 ng/ml
IgA [VA]	PBS-0,05%Tw	redčitev
4,6 µl VA	395,4 µl	1:100
200 µl raztop. [1:100]	200 µl	1:200
200 µl raztop. [1:200]	200 µl	1:400
200 µl raztop. [1:400]	200 µl	1:800
200 µl raztop. [1.800]	200 µl	1:1600
200 µl raztop. [1.1600]	200 µl	1:3200

3.10.2 Princip analize

Ob vsaki analizi smo na mikrotitrsko ploščico nanesti po 3 vzorce za analizo ozadje («slepi» vzorci), in sicer na različne lege na ploščici, da bi čim bolj izničili robni efekt. Vse vzorce, kontrole in standarde smo analizirali v dveh paralelkah in izmerjenim absorbancom izračunali koeficient variacije (CV). Vzorce, ki so imeli CV večji od 18 %, smo ponovno analizirali, medtem ko CV slepih vzorcev ni smel presežati 12 %. Pri vsaki analizi smo na podlagi meritev standardov z znanimi koncentracijami določili umeritveni krivuljo in

izračunali korekcijski faktor. Korekcijski faktor posamezne redčitve standarda mora biti po uveljavljenem postopku Laboratorija za imunologijo revmatizma v območju 0,80 -1,20 ter korekcijski faktor analize, ki ga predstavlja povprečje korekcijskih faktorjev redčitev standarda, v območju med 0,90 – 1,10. V kolikor bi bil faktor analize izven navedenega območja, analiza ne bi bila veljavna in bi jo bilo treba ponoviti, vendar se nam to ni zgodilo. Korigirane vrednosti absorbanc vzorcev smo dobili tako, da smo od izmerjenih absorbanc odšteli povprečje slepih vrednosti ter dobljeno vrednost pomnožili s korekcijskim faktorjem analize. Končne rezultate analiz smo s pomočjo enačbe umeritvene krivulje preračunali še v arbitrarne enote in titre.

CV podaja sipanje rezultatov in ga izračunamo kot razmerje med standardnim odklonom (SD) in aritmetično sredino (x) (enačba 3).

$$CV (\%) = (SD/ x) * 100$$

enačba 3

3.10.3 Statistična obdelava podatkov

Vse rezultate, ki smo jih dobili v okviru analiz, smo statistično obdelali z računalniškim programom Microsoft Excel 2007 in SPSS 17.0.

4 REZULTATI

4.1 Variabilnost znotraj analize

Ponovljivost znotraj analize smo podali s koeficientom variabilnosti dveh paralelnih izmerjenih absorbcanc vseh vzorcev, kontrol in standardov (MoAb in IS). Meritve, pri katerih je CV presegal 18 %, smo ponovno testirali. Ob upoštevanju vseh meritev je znašalo povprečje CV za IgG 3,7 %, za IgM 2,9 % ter za za IgA 3,1 % (Preglednica IV).

Preglednica IV: Variabilnost znotraj analize vseh meritev

Razred protiteles	Koeficient variabilnosti [%]			Število meritev
	Min	Max	Povprečje	
IgG	0,0	36,3	3,7	607
IgM	0,0	32,9	2,9	603
IgA	0,0	28,8	3,1	604

Če pa smo izločili meritve, pri katerih je bil CV večji od dovoljenih 18 % in ponovno izračunali koeficient variabilnosti, je bilo povprečje variabilnosti znotraj analize 3,3 %, 2,7 % in 3,0 % za IgG, IgM in IgA anti- β_2 -GPI (Preglednica V).

Preglednica V: Variabilnost znotraj analize brez meritev z vrednostjo CV > 18 %

Razred protiteles	Koeficient variabilnosti [%]			Število meritev
	Min	Max	Povprečje	
IgG	0,0	17,5	3,3	598
IgM	0,0	16,9	2,7	600
IgA	0,0	18,0	3,0	600

4.2 Medanalizna variabilnost

Medanalizno variabilnost smo določali na podlagi korigiranih absorbcanc internih standardov in pozitivnih kontrol (opisanih v poglavju 3.4). Analize so bile izvedene na več mikrotitrskih ploščah na katerih so bili analizirani interni standardi in kontrole. Na tak način smo zanje dobili več meritev za oceno medanalizne variabilnosti. Pri vsaki analizi smo testirali po tri oziroma štiri standarde ter nato za vsakega od njih izračunali CV. Za

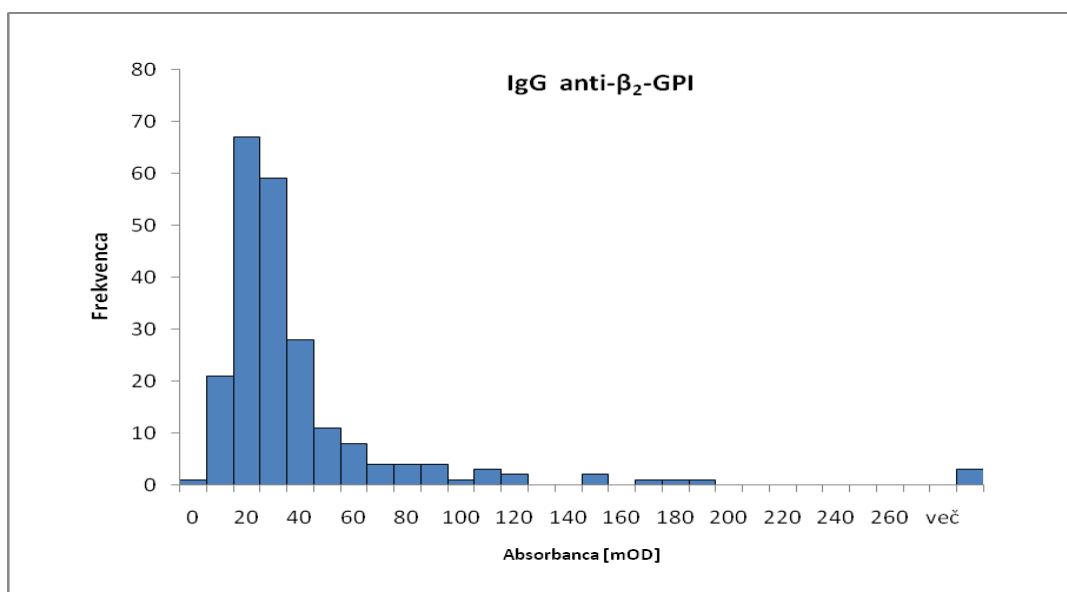
posamezen razred protiteles smo določili povprečje CV, ki znaša 19,3 % za IgG, 10,4 % za IgM ter 12,1 % za IgA anti- β_2 -GPI (Preglednica VIV).

Preglednica VI: Medanalizna variabilnost

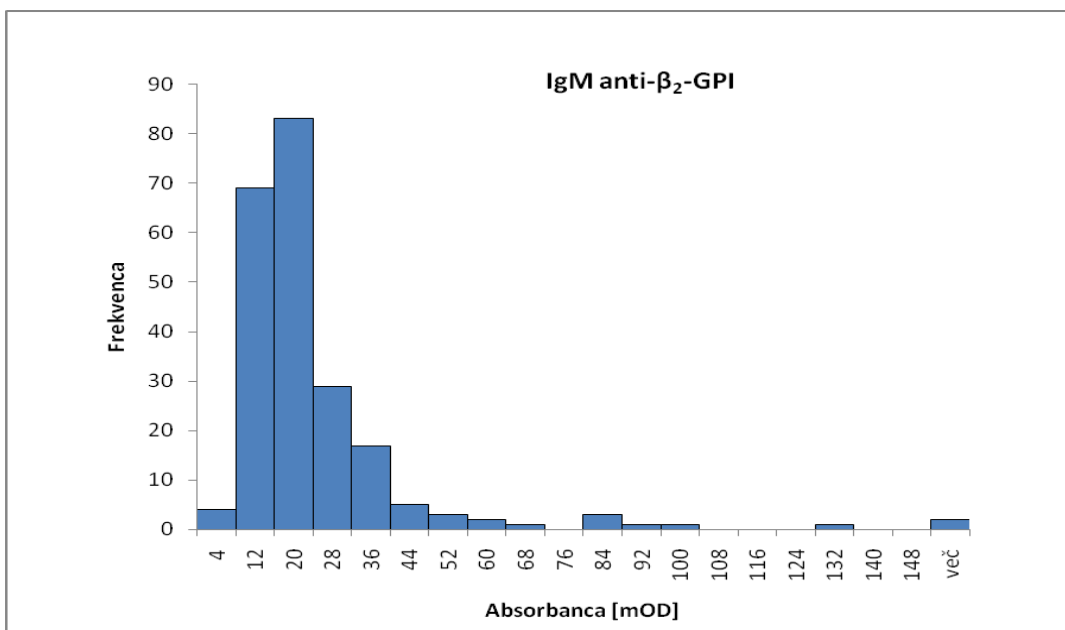
Razred protiteles	Standard	Število meritev	CV [%]	Povprečje CV [%]
IgG	SM	9	16,2	19,3
	P449	7	24,8	
	G820	10	19,4	
	POZ G	14	16,6	
IgM	P449	10	9,5	10,4
	G820	10	14,5	
	POZ M	14	7,2	
IgA	SM	9	7,1	12,1
	P449	10	11,1	
	POZ A	14	18,2	

4.3 Frekvenčna porazdelitev rezultatov pri krvodajalcih

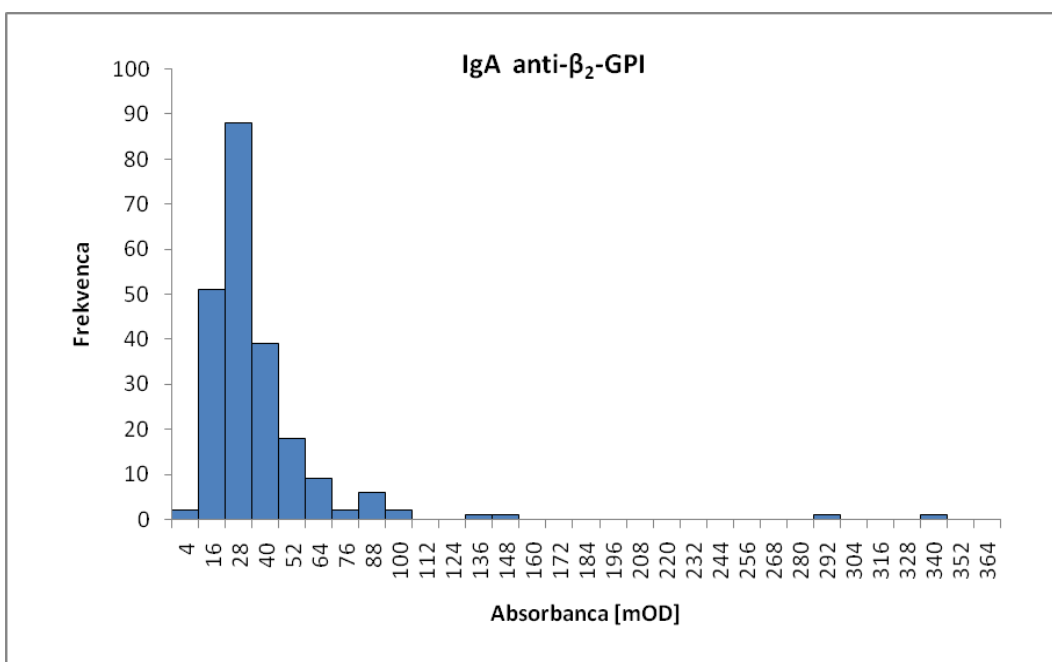
Frekvenčna porazdelitev vseh izmerjenih vrednosti pri populaciji krvodajalcev je rahlo desno asimetrična za vse razrede anti- β_2 -GPI. Pri vseh treh razredih protiteles opazimo pojavljanje t.i. osamelcev, to je vrednosti, ki izrazito odstopajo (Slika 3 za IgG, Slika 4 za IgM in Slika 5 za IgA).



Slika 3: Frekvenčna porazdelitev vseh izmerjenih vrednosti anti- β_2 -GPI razreda IgG pri populaciji 221 krvodajalcev



Slika 4: Frekvenčna porazdelitev vseh izmerjenih vrednosti anti-β₂-GPI razreda IgM pri populaciji 221 krvodajalcev



Slika 5: Frekvenčna porazdelitev vseh izmerjenih vrednosti anti-β₂-GPI razreda IgA pri populaciji 221 krvodajalcev

Porazdeljevanje vrednosti pri krvodajalcih smo preverili še s statističnimi parametri (Preglednica VII). Pri verjetnosti $p < 0,05$ Shapiro-Wilk in Kolmogorov-Smirnov testa, ter

na osnovi koeficientov sploščenosti in asimetrije lahko potrdimo, da se vrednosti ne porazdeljujejo normalno pri nobenem razredu protiteles.

Preglednica VII: Parametri porazdelitve absorbanca pri krvodajalcih

	Absorbanca [mOD]		
	IgG	IgM	IgA
Kolmogorov- Smirnov test	0,275	0,329	0,23
p	0,000	0,000	0,000
Shapiro- Wilk test	0,458	0,248	0,492
p	0,000	0,000	0,000
koeficient sploščenosti	47,518	132,567	47,003
koeficient asimetrije	5,974	10,668	5,991

4.4 Statistični podatki in opredelitev praznih vrednosti na podlagi rezultatov pri krvodajalcih

Pražne vrednosti smo določili na osnovi 99. percentila izmerjenih absorbanca 221 serumov krvodajalcev. Iz izmerjenih absorbanca smo pri vsaki analizi ločeno na podlagi enačbe umeritvene krivulje internih standardov izračunali arbitrarne enote in pripadajoči titer protiteles. Ker se pri rutinskem delu rezultati podajajo v titrih, smo tudi mi podali rezultate v titrnih enotah in zanje izračunali parametre statistike (Preglednica VIII). Pri vseh skupinah protiteles se pojavljajo ekstremne visoke vrednosti, t.i. osamelci, ki predstavljajo pozitiven rezultat. Vrednosti, ki so za več kot 5 SD odstopale od srednje vrednosti smo zato izločili in ponovno izračunali statistične podatke ter na podlagi 99. percentila določili pražne vrednosti, ki znašajo 3 titrne enote za IgG, 1 titrno enoto za IgM ter 2 titrni enoti za IgA razred protiteles (Preglednica VIII).

Preglednica VIII: Statistični podatki rezultatov krvodajalcev in prazne vrednosti

	IgG		IgM		IgA	
	TU (vsi)	TU (brez osamelcev)	TU (vsi)	TU (brez osamelcev)	TU (vsi)	TU (brez osamelcev)
Število vzorcev	221	219	221	220	221	220
Srednja vrednost	0,2	0,1	-0,2	-0,3	0,0	0,0
SD	1,2	0,6	0,8	0,3	0,6	0,5
Mediana	0	0	0	0	0	0
Minimum	0	0	0	0	0	0
Maksimum	13	4	10	3	6	5
Srednja vrednost + 2SD	2,6	1,4	1,3	0,4	1,2	0,9
Srednja vrednost + 3SD	3,7	2,0	2,1	0,7	1,8	1,4
99. percentil	6,0	3,0	1,0	1,0	2,0	2,0
Prazna vrednost	3		1		2	

4.5 Določanje anti- β_2 -GPI pri bolnikih z APS

Na prisotnost anti- β_2 -GPI smo testirali 45 serumov bolnikom, ki imajo postavljeno diagnozo APS. Mediane so bile 10, 0 in 1 titrnih enot (TU), minimumi 0 TU ter maksimumi 280, 56, 135 TU za imunoglobuline razredov IgG, IgM in IgA (Preglednica IX). Ob upoštevanju praznih vrednosti, ki smo jih postavili na podlagi 99. percentila, je bilo od 45 testiranih vzorcev 37 pozitivnih na IgG, 13 na IgM in 22 na IgA (Preglednica IX, X). 3 vzorci so bili negativni na vse razrede testiranih Ig.

Preglednica IX: Rezultati testiranja serumov bolnikov, ki imajo diagnosticiran APS. Vrednosti so podane v titernih enotah. Pozitivne vrednosti so odebeljene.

Vzorec	IgG [TU]	IgM [TU]	IgA [TU]	Vzorec	IgG [TU]	IgM [TU]	IgA [TU]
1	5	0	4	24	61	0	0
2	2	1	1	25	10	0	1
3	26	0	2	26	2	0	0
4	18	0	32	27	13	0	3
5	2	0	5	28	51	0	0
6	85	0	24	29	24	1	1
7	5	5	10	30	45	25	10
8	1	0	0	31	8	0	2
9	4	0	1	32	57	23	13
10	34	0	0	33	2	1	8
11	25	0	1	34	10	2	1
12	8	18	3	35	6	0	1
13	8	23	6	36	3	0	0
14	2	0	14	37	86	0	1
15	14	0	0	38	11	0	1
16	56	0	135	39	15	0	100
17	10	0	0	40	12	0	0
18	5	30	2	41	14	1	1
19	3	0	2	42	3	7	1
20	2	0	3	43	280	0	0
21	5	56	9	44	2	0	2
22	11	0	0	45	19	0	0
23	96	0	6	/	/	/	/

4.6 Določanje parametrov vrednotenja metode

Ob upoštevanju praznih vrednosti, ki smo jih določili na podlagi 99. percentila in predstavljajo mejo med normalnim in patološkim izvidom, smo rezultate vseh testiranih skupin opredelili kot pozitivne ali negativne za posamezni razred anti- β_2 -GPI. Od 45 bolnikov z APS je bilo pozitivnih 37 (82,2 %) na IgG, 13 (28,8 %) na IgM in 22 (48,9 %) na IgA oziroma 42 (93,3 %) na vsaj en razred Ig. Od skupno 453 kontrolnih oseb (krvodajalci in bolniki brez APS) je bilo na IgG pozitivnih 22 (4,9 %), na IgM 16 (3,5 %) ter na IgA 28 (6,2 %), oziroma 47 (10,4 %) na vsaj en razred Ig. Če pa so kontrolno skupino predstavljali le krvodajalci, je bilo od 221 oseb na IgG pozitivnih 8 (3,6 %), na IgM 6 (2,7 %) ter na IgA 4 (6,2 %), oziroma 13 (5,6 %) na vsaj en razred protiteles (Preglednica X).

Preglednica X: Prikaz pozitivnih in negativnih rezultatov pri posameznih testiranih skupinah ob upoštevanju novo določenih praznih vrednosti

	Število vseh	IgG (<i>p.v.</i> = 3)		IgM (<i>p.v.</i> = 1)		IgA (<i>p.v.</i> = 2)		Skupaj*	
		pozitivni	negativni	pozitivni	negativni	pozitivni	negativni	pozitivni	negativni
APS	45	37	8	13	32	22	23	42	3
RA	83	2	81	3	80	5	78	8	75
SLE	58	5	53	4	54	14	44	15	43
SjS	91	7	84	3	88	5	86	11	80
Krvodajalci	221	8	213	6	215	4	217	13	208
Krvodajalci+RA+SLE+SjS	453	22	431	16	437	28	425	47	406

* pozitivne vrednosti predstavljajo vzorci, pri katerih je bil vsaj eden od IgG, IgM ali IgA pozitiven, negativne pa tisti, pri katerih so bili rezultati za vse tri razrede protiteles negativni

Na enak način smo te rezultate opredelili še na podlagi praznih vrednosti, ki jih že vrsto let uporabljajo v Laboratoriju za imunologijo revmatizma v rutinski diagnostiki APS. Od 45 bolnikov z APS je bilo pozitivnih 44 (97,8 %) na IgG, 9 (20,0 %) na IgM in 22 (48,9 %) na IgA oziroma 44 (97,8 %) na vsaj en razred Ig. Od skupno 453 kontrolnih oseb (krvodajalci in bolniki brez APS) bilo na IgG pozitivnih 40 (8,8 %), na IgM 9 (2,0 %) ter na IgA 28 (6,2 %), oziroma 56 (12,4 %) na vsaj en razred protiteles (Preglednica XI).

Preglednica XI: Prikaz pozitivnih in negativnih rezultatov pri posameznih testiranih skupinah ob upoštevanju "starih" praznih vrednosti, ki se uporabljajo pri rutinskih diagnostičnih preiskavah v Laboratoriju za imunologijo revmatizma

	Število vseh	IgG (<i>p.v.</i> =2)		IgM (<i>p.v.</i> = 2)		IgA (<i>p.v.</i> = 2)		Skupaj*	
		pozitivni	negativni	pozitivni	negativni	pozitivni	negativni	pozitivni	negativni
APS	45	44	1	9	36	22	23	44	1
RA	83	6	77	2	81	5	78	10	73
SLE	58	12	46	4	54	14	44	17	41
SjS	91	9	82	1	90	5	86	12	79
Krvodajalci	221	13	208	2	219	4	217	17	204
Krvodajalci+RA+SLE+SjS	453	40	413	9	444	28	425	56	397

* pozitivne vrednosti predstavljajo vzorci, pri katerih je bil vsaj eden od IgG, IgM ali IgA pozitiven, negativne pa tisti, pri katerih so bili rezultati za vse tri razrede protiteles negativni

Za oba primera postavljenih praznih vrednosti smo izračunali diagnostično občutljivost in diagnostično specifičnost dobljenih rezultatov in primerjali, kako različno postavljena prazna vrednosti vpliva na diagnostično občutljivost oz specifičnost. Izračunane vrednosti so predstavljene v preglednicah XII in XIII.

Skupna diagnostična občutljivost za vse tri razrede je ob upoštevanju novo določenih praznih vrednosti za 4 odstotne točke nižja (93,3 % napram 97,8 %) (Preglednica XII) medtem ko je diagnostična specifičnost tako napram krvodajalcem kot tudi napram skupno krvodajalcem in bolnikom brez APS nekoliko višja (94,7 % napram 92,3 % oziroma 89,6 % napram 87,6 %) (Preglednica XIII).

Preglednica XII: Diagnostična občutljivost rezultatov ob upoštevanju novih in starih praznih vrednosti

Diagnostična občutljivost [%]							
IgG		IgM		IgA		Skupaj	
<i>nova p.v.</i> = 3	<i>stara p.v.</i> = 2	<i>nova p.v.</i> = 1	<i>stara p.v.</i> = 2	<i>nova p.v.</i> = 2	<i>stara p.v.</i> = 2	<i>nova p.v.</i>	<i>stara p.v.</i>
82,2	97,8	28,8	20,0	48,9	48,9	93,3	97,8

Preglednica XIII: Diagnostična specifičnost rezultatov ob upoštevanju novih in starih praznih vrednosti

	Diagnostična specifičnost [%]							
	IgG		IgM		IgA		Skupaj	
	<i>nova p.v.</i> = 3	<i>stara p.v.</i> = 2	<i>nova p.v.</i> = 1	<i>stara p.v.</i> = 2	<i>nova p.v.</i> = 2	<i>stara p.v.</i> = 2	<i>nova p.v.</i>	<i>stara p.v.</i>
Krvodajalci	96,4	94,1	97,3	99,1	98,2	98,2	94,7	92,3
Krvodajalci+ RA+SLE+SjS	95,1	91,2	96,5	98,0	93,8	93,8	89,6	87,6

5 RAZPRAVA

Encimsko imunsko metodo za določanje avtoprotiteles proti β_2 -GPI v Laboratoriju za imunologijo revmatizma uporabljajo v diagnostiki APS že vrsto let. Smernice za vrednotenje rezultatov metode so se v zadnjih letih spremenile, zato je bilo smiselno ponovno ovrednotiti uporabnost rezultatov, pridobljenih na hišni izvedbi metode za določanje anti- β_2 -GPI. V naši nalogi smo opredelili nekatere analitične parametre metode, saj je klinična uporabnost rezultatov v veliki meri odvisna od zanesljivosti in ponovljivosti metode, sicer pa same metode nismo vrednotili, saj je bila že predhodno ovrednotena. Za vrednotenje rezultatov je pomembno poznati, kako se izmerjene vrednosti preučevanih protiteles porazdeljujejo.

5.1 Variabilnost znotraj analize in med analizami

Natančnost oziroma ponovljivost je pomemben parameter vrednoteja metode, ki vpliva na pravilnost dobljenih rezultatov. Nanjo lahko vplivajo številni dejavniki, kot so temperatura, svetloba, pH pufrov, antigen, aktivnost encimov, delovanje merilnih aparatov, natančnost pri delu (npr. pri pripravi vzorcev in pipetiranju) in drugi. Na podlagi meritev dveh paralelk smo najprej določili sipanje rezultatov znotraj analize in dobili odlično ponovljivost. Povprečje CV je ob upoštevanju vseh meritev znašalo 3,7 % za IgG, 2,9 % za IgM ter 3,1 % za IgA. Če pa smo meritve, pri katerih je CV presegel dovoljenih 18 % izločili in upoštevali le veljavne meritve, so bile povprečne znotrajanalizne variabilnosti nekoliko nižje in sicer 3,3 %, 2,7 % in 3,0 % za IgG, IgM in IgA anti- β_2 -GPI, kar je primerljivo z rezultati, ki jih je dosegla Čučnik ter z analitičnimi cilji za kratkoročno nenatančnost za podobne analite (31). V primerjavi z 10 komercialnimi analiznimi kompleti, ki jih je v svoji študiji primerjal Reber s sodelavci, smo za IgG dosegli nižji povprečni CV od 9-ih komercialnih analiznih kompletov ter za IgM nižji povprečni CV od vseh testiranih analiznih kompletov (32). Evropski forum za aPL je leta 2004 predlagal 4 minimalne zahteve glede izvedbe metod ELISA za določanje aPL, ki predpisujejo izvajanje analiz v dveh paralelkah, medtem ko mednarodne smernice za testiranje aCL in anti- β_2 -GPI točnega priporočila ne navajajo, ampak naj bi odločitev temeljila na karakteristikah in izvedbi posameznega testa (33, 34).

Medanalizna variabilnost, ki smo jo določili na podlagi internih standardov in pozitivnih kontrol, je bila pričakovano slabša od znotraj analize, saj pri vseh analizah ne moremo zagotoviti popolnoma identičnih pogojev. Povprečje CV je znašalo med 10,4 % in 19,3%, kar pomeni višje vrednosti, kot jih je pri anti- β_2 -GPI ELISI določila Čučnik (31). Najvišji CV smo določili pri IgG, kar nakazuje na to, da je IgG razred najbolj podvržen razlikam med analizami. Kljub temu lahko zaključimo, da smo, ker gre za delo z biološkimi vzorci, dosegli zadovoljivo ponovljivost.

5.2 Določanje praznih vrednosti

Prazna vrednost je najnižja smiselna vrednost, ki še ima klinični pomen in razmejuje ravni anti- β_2 -GPI, ki so značilne za zdravo populacijo od patološko povišanih anti- β_2 -GPI pri bolnikih z APS. Dololočitev prazne vrednosti v veliki meri zavisi od izbire kontrolne skupine »zdrave« populacije, ki mora biti številčno zadostno velika, ter razpršenosti rezultatov. V skladu z minimalnimi zahtevami Evropskega foruma za aPL, naj bi za določanje praznih vrednosti testirali najmanj 50 vzorcev zdrave populacije (33), glede na novejšo mednarodno smernico za aCL in anti- β_2 -GPI testiranje pa 120 referenčnih vzorcev (34), kar smo tudi izpolnili, saj je naša kontrolna skupina vključevala 221 krvodajalcev. Prazne vrednosti lahko glede na predpostavko o načinu porazdelitve vrednosti določamo po dveh različnih principih. Če se vrednosti aPL krvodajalcev porazdeljujejo normalno, kot so ugotovili nekateri avtorji (31, 35), lahko prazne vrednosti določimo s pomočjo določenega standardnega odmika od srednje vrednosti. V kolikor pa porazdelitev ni normalna, je statistično primernejša uporaba percentilov, kakor velevajo tudi trenutno veljavni klasifikacijski kriteriji za določanje APS (7). V okviru naše naloge smo z grafično metodo in z ustreznimi testi najprej preverili porazdeljevanje vrednosti iz kontrolne skupine krvodajalcev ter zanje izračunali določene statistične parametre. Na podlagi Kolmogorov-Smirnov in Shapiro-Wilk testa smo na 95 % intervalu zaupanja hipotezo o normalni porazdelitvi zavrnil in tako potrdili, da se vrednosti porazdeljujejo nenormalno. Za končno določitev praznih vrednosti smo v skladu z mednarodnimi priporočili in veljavnimi klasifikacijskimi kriteriji uporabili 99. percentil ter rezultat podali v titrih enotah (TU) (7, 33). Za IgG razred avtoprotiteles je tako določena prazna vrednost znašala 6 TU, za IgM 1 TU ter za IgA razred 2 TU. Pri vseh treh razredih imunoglobulinov smo določili po eno izstopajočo, ekstremno visoko vrednost, ki je za več kot 5 SD odstopala od

srednje vrednosti. Diagnostično gledano, tako visoke vrednosti pri krvodajalcih predstavljajo pozitiven rezultat, zato smo jih na podlagi strokovne utemeljitve izločili in ponovno izračunali prazno vrednosti, ki se je pri IgG znižala na 3 TU, medtem ko izločanje osamelcev pri IgM in IgA ni vplivalo na prazno vrednost. Končne prazne vrednosti, določene na podlagi 99. percentila so torej znašale 3 TU za IgG, 1 TU za IgM ter 2 TU za IgA in se razlikujejo od praznih vrednosti, ki jih uporabljajo v Laboratoriju za imunologijo revmatizma v rutinski diagnostiki APS in so bile določene po starem pristopu z uporabo SD (prazna vrednost je enaka za vse tri razrede protiteles in znaša 2 TU).

Razlogov za osamelce pri krvodajalcih je lahko več, med drugim gre lahko za potencialnega bolnika z APS, pri katerem se klinični znaki še niso izrazili, saj se lahko pojavijo tudi v razmaku 5 let (7). Vzorce krvodajalcev, pri katerih odkrijemo ekstremno visoke vrednosti avtoprotiteles proti β_2 -GPI bi bilo smiselno analizirati še na prisotnost LA in ACL, saj sočasna pozitivnost na več testov dokazano bolje korelira s pojavljanjem tromboz in zapleti v nosečnosti (16, 7).

5.3 Diagnostična občutljivost in specifičnost

Ob upoštevanju praznih vrednosti, ki smo jih postavili na podlagi 99. percentila, smo najprej preverili pozitivnost vzorcev v skupini bolnikov z APS, pri čemer je bilo od 45 testiranih vzorcev 37 pozitivnih na IgG, 13 na IgM in 22 na IgA. Pričakovano je bilo največ vzorcev pozitivnih na IgG, medtem ko je v nasprotju z literaturnimi podatki, najmanj pozitivnih na IgM (manj kot na IgA) (17). Nato smo kot pozitivne oz. negativne opredelili še vzorce iz kontrolne skupine, kamor smo uvrstili krvodajalce in bolnike z drugimi avtoimunskimi sistemsko vezivnimi boleznimi (SLE, SjS in RA), kjer anti- β_2 -GPI ne pričakujemo ter izračunali diagnostično občutljivost in specifičnost. Enako smo ponovili ob upoštevanju praznih vrednosti, ki jih uporabljajo v laboratoriju pri diagnostiki APS. Pri IgA, kjer sta prazni vrednosti določeni po starem in novem principu enaki, ni razlik v pozitivnosti vzorcev, medtem ko je pri IgG in IgM število pozitivnih ustrezno manjše oziroma večje, glede na razlike v praznih vrednostih.

Največjo diagnostično občutljivost smo v obeh primerih določili pri IgG razredu protiteles, vendar je bila ta občutno višja pri stari prazni vrednosti in sicer 97,8 % napram 82,2 % pri novo postavljeni prazni vrednosti. Nova prazna vrednost je postavljena za 1 TU višje, zato smo določili manj pozitivnih rezultatov. Ne glede na to katero mejno vrednost smo

upoštevali, je bila diagnostična občutljivost najnižja pri IgM razredu protiteles; nekoliko višja je bila ob upoštevanju mejne vrednosti, določene na podlagi 99. percentila, ki je postavljena nižje v primerjavi s staro vrednostjo (28,8 % napram 20 %). Pri IgA razredu protiteles je bila diagnostična občutljivost, ne glede na predpostavljen način porazdeljevanja vrednosti pri krvodajalcih, enaka. Celokupno gledano je bila diagnostična občutljivost za vse tri razrede, ob upoštevanju novo določenih praznih vrednostih za 4 odstotne točke nižja (93,3 % napram 97,8 %), predvsem na račun razlik v diagnostični občutljivosti za IgG. Pri tem tvegamo, da določene rezultate pri bolnikih z APS napačno opredelimo kot negativne. Presenetljivo je, da smo za IgA razred določili višjo diagnostično občutljivost v primerjavi s IgM, saj naj bi bila IgA protitelesa najmanj pogosta (17). Do podobnih rezultatov je v raziskavi aCL prišla tudi Kacin, vendar moramo upoštevati tudi pomisleke o dejanski vrednosti te ugotovitve, saj izhajamo iz iste skupine bolnikov z APS, ki je številno skromno (36).

Diagnostična specifičnost zavisi od postavljene prazne vrednosti ter upoštevane kontrolne skupine. Ob višje postavljene prazni vrednosti dobimo boljšo diagnostično specifičnost, leta pa je višja tudi ob upoštevanju kontrolne skupine, ki vključuje le krvodajalce, saj se anti- β_2 -GPI pojavljajo tudi pri drugih avtoimunskih boleznih. Skupna diagnostična specifičnost tako napram krvodajalcem kot tudi napram skupno krvodajalcem in bolnikom brez APS je nekoliko višja (94,7 % napram 92,3 % oziroma 89,6 % napram 87,6 %) ob upoštevanju novo določenih praznih vrednostih.

Za anti- β_2 -GPI velja, da so zelo specifična in nekoliko manj občutljiva za APS, kar smo potrdili tudi v okviru naloge (37).

Kljub številnim poskusom standardizacije ELISA metod za določanje anti- β_2 -GPI in aPL na splošno in mednarodnim delavnicam na to temo, je primerljivost rezultatov med različnimi laboratoriji zaradi različnih izvedb še vedno slaba zaradi česar so si rezultati različnih študij velikokrat nasprotujoči. V okviru 13. mednarodnega kongresa so bila v letu 2012 revidirane mednarodne smernice za izvedbo ELISA za določanje anti- β_2 -GPI in aCL, ki podajajo priporočila glede uporabe vzorcev, antigenov, umeritvenih standardov, zahtevane natančnosti metod, izračuna praznih vrednosti in izražanja rezultatov (34). Ob upoštevanju teh priporočil, lahko v prihodnosti upamo na boljšo medlaboratorijsko primerljivost rezultatov.

6 SKLEP

V okviru diplomske naloge smo prišli do naslednjih sklepov:

- ELISA za določanje anti- β_2 -GPI, ki jo izvajajo v Laboratoriju za imunologijo revmatizma KO za revmatologijo UKC Ljubljana izkazuje dobro ponovljivost. Povprečje variabilnosti **znotraj analize** je znašalo 3,3 %, 2,7 % in 3,0 % za IgG, IgM in IgA anti- β_2 -GPI, povprečje variabilnosti **med analizami pa je** znašalo 19,3 % za IgG, 10,4 % za IgM ter 12,1 % za IgA anti- β_2 -GPI.
- Na podlagi testiranja serumov krvodajalcev s poudarkom na uporabi 99. percentila smo določili naslednje prazne vrednosti anti- β_2 -GPI: 3 TU za IgG, 1 TU za IgM ter 2 TU za IgA razred protiteles.
Pražne vrednosti se razlikujejo od tistih, ki jih uporabljajo pri rutinskem delu in so bile določene na podlagi predpostavke o normalni porazdelitvi z uporabo standardnih odmikov od srednje vrednosti. Le te znašajo 2 titra za vse tri tipe protiteles.
- Ob upoštevanju 99. percentile je diagnostična občutljivost znašala 82,2 %, 28,8 % ter 48,9 % za IgG, IgM ter IgA. Diagnostična specifičnost se je ob upoštevanju kontrolne skupine v katero so bili vključeni le krvodajalci za posamezen razred protiteles gibala med 96,4 % in 98,2 % ter med 93,8 % in 96,5 %. če so bili v kontrolo skupino vključeni tudi bolniki brez APS.
- Skupna diagnostična občutljivost za vse tri razrede je ob upoštevanju novo določenih praznih vrednostih za 4 odstotne točke **nižja** (93,3 % napram 97,8 %), diagnostična specifičnost tako napram krvodajalcem kot tudi napram skupno krvodajalcem in bolnikom brez APS pa je **nekoliko višja** (94,7 % napram 92,3 % oziroma 89,6 % napram 87,6 %). Nižja diagnostična občutljivost pomeni, da določimo več lažno negativnih rezultatih in zgrešimo bolnike z APS.

Na podlagi rezultatov diplomske naloge in upoštevanju še drugih argumentov glede racionalne laboratorijske in klinične diagnostike so strokovnjaki laboratorijske medicine in zdravniki specialisti sprejeli skupno odločitev, da bo Laboratorij za imunologijo revmatizma pri diagnostični uporabi metode še naprej upošteval predhodno dogovorjene prazne vrednosti, ki znašajo 2 titra anti- β_2 -GPI za vse razrede protiteles.

7 LITERATURA

1. D'Cruz DP. Antiphospholipid (Hughes) Syndrome: An Overview. V: Khamashta MA, Hughes Syndrome: Antiphospholipid Syndrome: Springer London, 2006;9–21.
2. Khamashta MA. Hughes Syndrome: History. V: Khamashta MA, Hughes Syndrome: Antiphospholipid Syndrome: Springer London, 2006; 3–8.
3. Harris EN, Pierangeli SS. Primary, secondary, and catastrophic antiphospholipid syndrome: what's in a name? *Semin Thromb Hemost.* 2008; 34(3): 219–26.
4. Asherson RA, Cervera R, Piette J-C, Shoenfeld Y. Milestones in the Antiphospholipid Syndrome BT - The Antiphospholipid Syndrome II. In Amsterdam: Elsevier Science; 2002; 3–9.
5. Asherson RA. The primary, secondary, catastrophic, and seronegative variants of the antiphospholipid syndrome: a personal history long in the making. *Semin Thromb Hemost.* 2008; 34(3): 227–35.
6. Rozman B, Kveder T. Merila in razvrstitev antifosfolipidnega sindroma = Criteria and classification of antiphospholipid syndrome. *Perinatološko-revmatološki Simp* 2003; 21–4.
7. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost.* 2006; 4(2): 295–306.
8. Božič B. 5. Pathogenesis of Antiphospholipid Syndrome. *JIFCC* [Internet dostop februar 2014]: <http://www.ifcc.org/ejifcc/vol15no3/>
9. Shoenfeld Y, Twig G, Katz U, Sherer Y. Autoantibody explosion in antiphospholipid syndrome. *J Autoimmun.* 2008; 30(1–2): 74–83.
10. Sène D, Piette J-C, Cacoub P. Antiphospholipid antibodies, antiphospholipid syndrome and infections. *Autoimmun Rev,* 2008; 7(4):2 72–7.
11. Miesbach W. Antiphospholipid antibodies and antiphospholipid syndrome in patients with malignancies: features, incidence, identification, and treatment. *Semin Thromb Hemost.* 2008; 34(3): 282–5.
12. Khamashta MA. Hughes syndrome : antiphospholipid syndrome. London: Springer; 2006; 3-8
13. Bouma B, de Groot PG, van den Elsen JM, Ravelli RB, Schouten A, Simmelink MJ,

- et al. Adhesion mechanism of human beta(2)-glycoprotein I to phospholipids based on its crystal structure. *EMBO J.* 1999; 18(19): 5166–74.
14. Yasuda S, Tatsuya A, Takao K. β 2-glycoprotein I and Anti- β 2-glycoprotein I Antibodies Khamashta, Munther A. In: Hughes syndrome : antiphospholipid syndrome. 2nd ed. London: Springer; 2006; 307–18.
 15. Miyakis S, Giannakopoulos B, Krilis SA. Beta 2 glycoprotein I--function in health and disease. *Thromb Res.* 2004; 114(5–6): 335–46.
 16. Pengo V, Banzato A, Bison E, Denas G, Padayattil Jose S, Ruffatti A. Antiphospholipid syndrome: critical analysis of the diagnostic path. *Lupus.* 2010; 19(4): 428–31.
 17. Bruschi A. The Significance of Anti-Beta-2-Glycoprotein I Antibodies in Antiphospholipid Syndrome. *Antibodies.* 2016; 5(2):16.
 18. Shovman O, Gilburd B, Barzilai O, Langevitz P, Shoenfeld Y. Novel insights into associations of antibodies against cardiolipin and beta2-glycoprotein I with clinical features of antiphospholipid syndrome. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2007 ; 32(2): 145–52.
 19. Praprotnik S, Božič B. A decrease in antiphospholipid antibodies before a thrombotic event. *Clin Rheumatol,* 1996; 15(3): 298–300.
 20. Kveder T, Božič B. Imunoserološke preiskave pri sistemskih boleznih vezivnega tkiva = Immunoserologic tests in systemic connective tissue diseases. *Perinatološko-revmatološki Simp 2003.* 2003; 61–9.
 21. Erkan D, Lockshin MD. Non-criteria manifestations of antiphospholipid syndrome. *Lupus.* 2010; 19(4): 424–7.
 22. Božič B, Mlinarič-Raščan I. *Imunologija v farmaciji : študijsko gradivo.* Ljubljana: Fakulteta za farmacijo; 2008.
 23. Vozelj M, Kotnik V, Lunder J. *Temelji imunologije.* Ljubljana: DZS; 2000; 112-113
 24. ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay. [Internet dostop marec 2016]: <https://exploreable.wordpress.com/2011/05/25/elisa-enzyme-linked-immunosorbent-assay>
 25. Kotnik V, Čurin-Šerbec V, Pretnar-Hartman K, Ihan A, Jeras M, Kopitar AN, et al. *Imunološki priročnik.* Ljubljana: Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Katedra za mikrobiologijo in imunologijo; 2010.
 26. Wild D. *The immunoassay handbook.* Third Edit. Amsterdam; Boston: Elsevier;

- 2005; 103-133
27. Čučnik S, Rozman B. Antifosfolipidna protitelesa pri trombozi, aterosklerozi in hipertenziji : magistrska naloga. Ljubljana: [S. Čučnik]; 2000.
 28. Benedejčič T, Božič B, Čučnik S. Vezava različno afinitetnih protiteles proti β 2-glikoproteinu I na antigen = Binding of anti- β 2-glycoprotein I antibodies with diverse affinity to antigen : diplomska naloga. Ljubljana: [T. Benedejčič]; 2010.
 29. IgG Sapporo Standard (HCAL) [Internet dostop julij 2016]: http://www.inovadx.com/PDF/di/508668_EN.pdf
 30. IgM Sapporo Standard [Internet dostop julij 2016]: http://www.inovadx.com/PDF/di/508673_EN.pdf
 31. Čučnik S, Ambrožič A, Božič B, Skitek M, Kveder T. Anti-beta 2-Glycoprotein I ELISA: methodology, determination of cut-off values in 434 healthy Caucasians and evaluation of monoclonal antibodies as possible international standards. Clin Chem Lab Med. 2000; 38(8): 777–83.
 32. Reber G, Tincani A, Sanmarco M, de Moerloose P, Boffa M-C. Variability of anti-beta2 glycoprotein I antibodies measurement by commercial assays. Thromb Haemost. 2005; 94(3): 665–72.
 33. Tincani A, Allegri F, Balestrieri G, Reber G, Sanmarco M, Meroni P, et al. Minimal requirements for antiphospholipid antibodies ELISAs proposed by the European Forum on antiphospholipid antibodies. Thromb Res. 2004; 114(5–6): 553–8.
 34. Lakos G, Favaloro EJ, Harris EN, Meroni PL, Tincani A, Wong RC, et al. International consensus guidelines on anticardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I testing: report from the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies. Arthritis Rheum. 2012; 64(1): 1–10.
 35. Božič B. Antifosfolipidna protitelesa pri sistemskem lupusu eritematozusu in pri globoki venski trombozi : magistrsko delo. Ljubljana; 1990.
 36. Kacin M, Božič B, Kveder T. Ovrednotenje encimsko imunske metode za določanje antikardiolipinskih protiteles = Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for determination of anticardiolipin antibodies : diplomska naloga. Ljubljana: [M. Kacin]; 2008.
 37. Favaloro EJ, Wong RCW. The antiphospholipid syndrome: a large elephant with many parts or an elusive chameleon disguised by many colours? Auto- Immun highlights. 2010; 1(1): 5–14.