

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LARA SMOLE  
MAGISTRSKA NALOGA  
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LARA SMOLE

**POSTAVITEV IN OVREDNOTENJE ENCIMSKO IMUNSKE METODE ZA  
DETEKCIJO INFLIKSIMABA**

**DEVELOPMENT AND VALIDATION OF AN ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT  
ASSAY TO DETECT INFLIXIMAB**

Ljubljana, 2017

Magistrsko delo sem opravljala v Laboratoriju za imunologijo revmatizma Kliničnega oddelka za revmatologijo, Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana pod mentorstvom doc. dr. Saše Čučnik.

**Zahvala:**

Iskrena hvala moji mentorici, doc. dr. Saši Čučnik ter vsem sodelavcem v Laboratoriju za imunologijo revmatizma, za vse nasvete in pomoč pri izdelavi magistrske naloge. Še posebej bi se rada zahvalila Mancii Ogrič, za ves vložen trud in strokovne nasvete pri opravljanju eksperimentalnega dela. Hvala tudi vsem domačim in prijateljem za podporo tekom celotnega študija.

**Izjava:**

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice doc. dr. Saše Čučnik.

Lara Smole

## VSEBINA

<b>POVZETEK.....</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>5</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV .....</b>	<b>7</b>
<b>1. UVOD.....</b>	<b>8</b>
1.1 KRONIČNE VNETNE BOLEZNI.....	8
1.2 CITOKINI.....	8
1.2.1 Citokinski receptorji.....	9
1.3 TNF- $\alpha$ .....	9
1.4 ZDRAVLJENJE VNETNIH REVMATIČNIH BOLEZNI.....	10
1.4.1 Biološka zdravila .....	10
1.4.2 Monoklonska protitelesa .....	11
1.4.3 Terapevtska monoklonska protitelesa .....	12
1.4.4 Zaviralci TNF- $\alpha$ .....	12
1.4.5 Infliksimab .....	13
1.5 NEŽELENI UČINKI PRI ZDRAVLJENJU Z ZAVIRALCI TNF- $\alpha$ .....	13
1.5.1 Klinični neželeni stranski učinki .....	13
1.5.2 Primarna rezistenca.....	14
1.5.3 Sekundarna odpoved.....	14
1.6 KLINIČNA UPORABNOST DOLOČANJA KONCENTRACIJ BIOLOŠKEGA ZDRAVILA .....	15
1.6.1 Encimsko imunski testi na trdnem nosilcu .....	17
1.7 OPREDELITEV PARAMETROV VREDNOTENJA METOD IN REZULTATOV .....	19
1.7.1 Natančnost analizne metode .....	19
1.7.2 Točnost analizne metode.....	20
1.7.3 Meja zaznavnosti.....	20
1.7.4 Meja kvantifikacije.....	20
1.7.5 Analizna specifičnost .....	20
1.7.6 Linearnost.....	21
<b>2. NAMEN DELA .....</b>	<b>22</b>
<b>3. MATERIALI IN METODE.....</b>	<b>23</b>
3.1 MATERIALI.....	23
3.1.1 Kemikalije .....	23
3.1.2 Pufri in raztopine .....	23
3.1.3 Sekundarna protitelesa .....	24
3.1.4 Analizni komplet apDia.....	24

3.1.5	<i>Biološki vzorci</i> .....	24
3.1.6	<i>Kontrolni material</i> .....	25
3.1.7	<i>Standardi</i> .....	25
3.1.8	<i>Antigen</i> .....	26
3.1.9	<i>Mikrotitrske ploščice</i> .....	26
3.1.10	<i>Aparature in pribor</i> .....	26
3.2	<b>METODE</b> .....	27
3.2.1	<i>Metoda določanja koncentracije IFX v serumu bolnikov z analiznim kompletom apDia IFX-ELISA</i> .....	27
3.2.2	<i>Hišna metoda ELISA za določanje koncentracije IFX v serumu bolnikov</i> .....	27
3.3	<b>ENAČBE ZA RAČUNANJE PARAMETROV ZA VREDNOTENJE METODE IN REZULTATOV</b>	28
3.4	<b>STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV</b> .....	29
<b>4.</b>	<b>REZULTATI</b> .....	<b>31</b>
4.1	<b>ANALIZNE LASTNOSTI HIŠNE IFX-ELISA</b> .....	31
4.1.1	<i>Znotraj-analizna natančnost</i> .....	31
4.1.2	<i>Med-analizna natančnost</i> .....	32
4.1.3	<i>Točnost- pravilnost metode ovrednotena z metodo dodatka</i> .....	33
4.1.4	<i>Analizna občutljivost</i> .....	35
4.1.5	<i>Analizna specifičnost</i> .....	35
4.1.6	<i>Linearnost</i> .....	36
4.2	<b>PRIMERJAVA REZULTATOV HIŠNE IFX-ELISA Z REZULTATI ANALIZNEGA KOMPLETA APDIA</b> .....	37
4.2.1	<i>Pearsonov koeficient korelacije</i> .....	37
4.2.3	<i>Koeficient ICC</i> .....	40
4.2.4	<i>Pravilnost uvrščanja v določeno skupino</i> .....	40
<b>5.</b>	<b>RAZPRAVA</b> .....	<b>43</b>
5.1	<b>OVREDNOTENJE HIŠNE IFX-ELISA</b> .....	43
5.2	<b>PRIMERJAVA REZULTATOV HIŠNE IFX-ELISA Z APDIA IFX-ELISA</b> .....	46
<b>6.</b>	<b>SKLEP</b> .....	<b>51</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURA</b> .....	<b>52</b>

## POVZETEK

Vnetje je osrednji proces kroničnih vnetnih bolezni, kjer pomembno vlogo v patogenezi igra citokin, dejavnik tumorske nekroze- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Protivnetna biološka zdravila so večinoma terapevtska monoklonska protitelesa, med katere uvrščamo zaviralce TNF- $\alpha$ , ki nevtralizirajo prosti citokin in preprečijo njegovo vezavo na receptor. Infliksimab (IFX) je primer zaviralca TNF- $\alpha$ , ki je himerno, mišje-človeško monoklonsko protitelo. Sprva so biološka zdravila veljala za zelo varna in učinkovita, sčasoma pa so odkrili neželene učinke povezane z njimi, predvsem pojav primarne rezistence in sekundarne odpovedi. Pomembno je stalno spremljanje koncentracij biološke učinkovine pri posameznem bolniku, saj lahko le tako ustrezno prilagodimo terapijo. Najpogosteje uporabljena tehnika za detekcijo zaviralcev TNF- $\alpha$  je encimsko-immunska metoda na trdnem nosilcu (ELISA).

Namen magistrske naloge je postavitve in ovrednotenje hišne ELISA za detekcijo IFX z uporabo dveh različnih detekcijskih protiteles in primerjava rezultatov dobljenih z analiznim kompletom apDia.

Dobro postavljena in ovrednotena metoda je osnovni pogoj za nadaljnje vrednotenje rezultatov, zato smo posamezno metodo najprej ovrednotili. Pri izračunu znotraj-analizne in med-analizne natančnosti obeh hišnih IFX-ELISA je bil koeficient variabilnosti (KV%) pod mejo 20 %. Točnost je bila pri uporabi sekundarnega protitelesa, usmerjenega proti IFX in konjugiranega s hrenovo peroksidazo v mejah 80 – 120 %, pri uporabi proti človeškemu IgG usmerjenega sekundarnega protitelesa konjugiranega z alkalno fosfatazo pa  $120,1 \pm 11,2$  %. Pri vrednotenju linearnosti smo dobili vse rezultate v mejah 80 – 120 %. Različica hišne metode z uporabo sekundarnega protitelesa, usmerjenega proti IFX in konjugiranega s hrenovo peroksidazo je analizno specifična. Pri primerjavi rezultatov hišne metode z analiznim kompletom apDia smo dosegli zelo dobro ponovljivost ( $r$  med 0,90 in 0,99 pri  $p < 0,001$ ). Povprečno smo dobili pri obeh različicah hišne metode nekoliko višje koncentracije kot pri apDia IFX-ELISA. Pri uporabi anti-IFX sekundarnega protitelesa konjugiranega s hrenovo peroksidazo smo dosegli 100 % pravilnost uvrščanja negativnih bolnikov.

Glede na rezultate lahko zaključimo, da sta obe različici hišne IFX-ELISA primerljivi z rezultati analiznega kompleta apDia. Obe sta uporabni za detekcijo IFX, z vidika analize specifičnosti in pravilnosti uvrščanja negativnih rezultatov pa je boljša različica hišne IFX-

ELISA, ki uporablja specifično, anti-IFX sekundarno protitelo konjugirano s hrenovo peroksidazo.

**Ključne besede:** vnetne bolezni, dejavnik tumorske nekroze- $\alpha$ , infliksimab, encimsko-immunska metoda na trdnem nosilcu

## ABSTRACT

Inflammation is the main process of chronic inflammatory diseases where cytokine, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) plays an important role in pathogenesis. Anti-inflammatory biological drugs are mostly therapeutic monoclonal antibodies. This group includes TNF- $\alpha$  inhibitors that neutralize free cytokine and prevent its binding to the receptor. Infliximab (IFX) is an example of TNF- $\alpha$  inhibitor that is a chimeric, mouse/human monoclonal antibody. At first, biological drugs were believed to be very safe and effective, but over time, side effects were shown- for example primary and secondary response failure. It is important to monitor the levels of biological drug constantly, as this is the only way to adjust the therapy for the individual patient. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is the most commonly used technique for the detection of TNF- $\alpha$  inhibitors.

The purpose of thesis is to develop and evaluate an *in-house* IFX-ELISA, using two different detection antibodies and to compare *in-house* ELISAs with the apDia IFX-ELISA kit.

A well-established and evaluated method is the basis for further assessment of the results, so we first evaluated each method. In case of intra-assay and inter-assay precision the coefficient of variation (CV%) was lower than 20% for both variants of *in-house* IFX-ELISA. In case of anti-IFX secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase used in *in-house* ELISA recovery was between 80 - 120%. When we used secondary antibody directed against human IgG conjugated with alkaline phosphatase recovery was  $120,1\% \pm 11,2\%$ . For linearity, the results we obtained were all within the limits of 80 - 120%. The variant of *in-house* IFX-ELISA in which we used anti-IFX secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase is analytically specific. Comparison with apDia IFX-ELISA kit yielded very good repeatability ( $r$  between 0.90 and 0.99,  $p < 0,001$ ). In both versions of the *in-house* method, on average we obtained a slightly higher concentration than apDia IFX-ELISA. When using the anti-IFX secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase 100% accuracy of classification of negative patients was achieved.

In conclusion, both variants of an *in-house* IFX-ELISA give comparable results to apDia IFX-ELISA kit. Both are useful for detection of IFX, but in terms of analytical specificity and accuracy of negative results classification, the variant with specific anti-IFX secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase is better.



**Key words:** immunoinflammatory diseases, tumor necrosis factor- $\alpha$ , infliximab, enzyme-linked immunosorbent assay.

## SEZNAM OKRAJŠAV

ADA – protitelesa proti biološki učinkovini

AP – alkalna fosfataza

BSA – goveji serumski albumin

ELISA – encimsko-immunska metoda na trdnem nosilcu

HRP – hrenova peroksidaza

ICC – koeficient povezanosti med razredi

IFX – infliksimab

Ig – imunoglobulin

KV – koeficient variabilnosti

LOD – meja določljivosti

LOQ – meja kvantifikacije

NK – naravne celice ubijalke

PBS – s fosfatom pufrana fiziološka raztopina

RF – revmatoidni faktor

RSD – relativna standardna deviacija

SD – standardna deviacija

Sekundarno anti-IgG<sup>AP</sup> – sekundarno proti človeškem IgG usmerjeno protitelo konjugirano z AP

Sekundarno anti-IFX<sup>HRP</sup> – sekundarno proti IFX usmerjeno protitelo konjugirano s HRP

TNF- $\alpha$  – dejavnik tumorske nekroze alfa

## **1. UVOD**

### **1.1 KRONIČNE VNETNE BOLEZNI**

Ena od temeljnih lastnosti imunskega sistema je njegova zmožnost ločevanja med lastnim in tujim. Odziv na vdor tujega je akutno vnetje, ki ga sprožijo citokini, kemokini in lokalno aktivirani sistem komplementa. Citokini pomembno sodelujejo pri naravni in specifični imunosti. Če je njihovo izločanje preveliko, to lahko povzroči patološka stanja. Kronično vnetje povzročijo virusi, bakterije, antigeni iz okolja, pri avtoimunskih boleznih pa avtoantigeni. Stalno vnetje izčrpava imunski sistem in povzroča okvare tkiv, kjer dolgoživi makrofagi in monociti vzdržujejo vnetni proces. Vnetje je pomembno področje biomedicinskih raziskav, saj je primarni vzrok za nastanek mnogih zdravstvenih motenj, tudi avtoimunskih boleznih, med njimi vnetnih revmatičnih boleznih ter kroničnih vnetnih črevesnih boleznih. Je tudi del patologije drugih kroničnih boleznih, kot so debelost, sladkorna bolezen (in druge metabolne bolezni), določene oblike raka, Parkinsonova bolezen in druge (1).

### **1.2 CITOKINI**

Citokini so skupina topnih proteinov ali glikoproteinov z majhno molekulsko maso (pod 30 kD), ki sodijo v družino strukturno zelo sorodnih proteinov, imenovanih hemopoetini. Družina citokinov obsega rastne faktorje, interlevkine, interferone in kemokine, ki posredujejo zapletene interakcije med imunokompetentnimi celicami. Citokini delujejo lokalno, večinoma avtokrino in parakrino (na celico, ki jih izloča oziroma na sosednje celice), v redkih primerih pa tudi na bolj oddaljene celice. Med fiziološke odzive, pri katerih so udeleženi citokini, sodi razvoj imunskega odziva, sprožitev vnetja, uravnavanje hemopoeze, uravnavanje celičnega razmnoževanja in diferenciacije ter celjenje ran. Izločanje citokinov sproži aktivacija imunokompetentne celice z antigenom, kateri sledi visoko afinitetna vezava na specifične celične receptorje, kjer v zelo majhnih koncentracijah sprožijo signal, ki se prenese v notranjost celice. Delujejo lahko sinergistično ali antagonistično, medtem ko imajo na različne tarče različne biološke učinke. Vir citokinov, ki nadalje aktivirajo celotno mrežo sodelujočih celic, so predvsem makrofagi in celice T pomagalk. Poznavanje celotne mreže citokinov, delujočih na imunokompetentne celice, je vodilo k razvoju bioloških zdravil, ki blokirajo specifične molekule in imunske odgovore (2-4).

### *1.2.1 Citokinski receptorji*

Receptorji za citokine se med seboj zelo razlikujejo. Razdelimo jih lahko v pet družin: receptorji imunoglobulinske superdružine, receptorji za citokine razreda I (družina hemopoetinskih receptorjev), receptorji za citokine razreda II (interferonski receptorji), družina receptorjev TNF in družina kemokinskih receptorjev. Večina citokinskih receptorjev je heterodimernih, sestavljenih iz podenote specifične za citokin in podenote, ki prevaja signal (2).

### **1.3 TNF- $\alpha$**

Dejavnik tumorske nekroze- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) je citokin z molekulsko maso 17 kD, ki ga izločajo številne celice, med njimi makrofagi, monociti, celice T, naravne celice ubijalke, kot odgovor na aktivacijo s strani bakterij, virusov, drugih citokinov in imunskih kompleksov. TNF- $\alpha$  je vnetni citokin, ki ima pleiotropen učinek na različne celične tarče. Je primarni citokin, ki aktivira makrofage in sproži sproščanje drugih, sekundarnih vnetnih citokinov, uravnava apoptozo limfocitov in drugih celic ter sodeluje pri migraciji celic. Pri nizkih koncentracijah pride do aktivacije makrofagov, ki sproščajo endogene pirogene in vnetne prostaglandine, ki povečajo fagocitozo in kemotakso nevtrofilcev, žilne endotelijske celice pa začnejo izražati površinske adhezijske molekule, kar vodi do kopičenja levkocitov v vnetišču. Pri izločenih višjih koncentracijah, TNF- $\alpha$  vstopi v krvni obtok, deluje endokrino in kot endogeni pirogen v termoregulacijskem območju hipotalamusa. TNF- $\alpha$  povzroči poškodbe tkiva, intravaskularno koagulacijo in septični šok. Z delovanjem na hepatocite poveča izločanje nekaterih proteinov akutne faze, zavira delitev matičnih celic v kostem mozgu, kronična izpostavljenost pa povzroči limfopenijo in imunsko pomanjkljivost. TNF receptorje izražajo vsi celični tipi. Receptor tipa II, p75, je izražen pretežno na mieloidnih celicah (nevtrofilci, monociti), najdemo pa ga tudi na limfocitih. Receptor tipa I, p55, pa večina celic izraža konstitutivno v majhnih količinah (endotelijske celice, fibroblasti). TNF- $\alpha$  ima ključno vlogo pri nastanku revmatoidnega artritisa, kjer sinovijski makrofagi izločajo velike količine TNF- $\alpha$  in interleukina-2, ki reagirajo z receptorji na fibroblastih. TNF- $\alpha$  ima pomembno vlogo tudi pri patogenezi spondiloartritisov in kroničnih vnetnih črevesnih boleznih (2, 3, 5, 6, 7).

## 1.4 ZDRAVLJENJE VNETHIH REVMATIČNIH BOLEZNI

Ker je za vnetne revmatične bolezni značilno vzdrževanje vnetja, ki lahko privede do trajne okvare tkiv in organov, je cilj zdravljenja doseči remisijo bolezni, upočasnitev ali preprečitev njenega napredovanja oz. ohranjanje ali izboljšanje funkcije tkiv. To lahko dosežemo samo z uvedbo sodobnega terapijskega pristopa, kjer se zdravljenje prilagaja posameznemu bolniku glede na oceno aktivnosti bolezni. Za zdravljenje se uporablja: nesteroidne antirevmatike, ki lajšajo simptome in ne vplivajo na sam potek bolezni, glukokortikoide kot premostitev v aktivni fazi bolezni, temeljna zdravila kot so metotreksat, leflunamid, sulfasalazin, ciklosporin, antimalarike in biološka zdravila ter podobna biološka zdravila (8, 10).

### 1.4.1 Biološka zdravila

Razvoj bioloških zdravil se je začel z uvedbo tehnologije rekombinantne DNA, z avtomatiziranjem peptidne sinteze in proizvodnjo monoklonskih protiteles. Na osnovi razdelitve Evropske agencije za zdravila delimo biološka zdravila v pet osnovnih skupin:

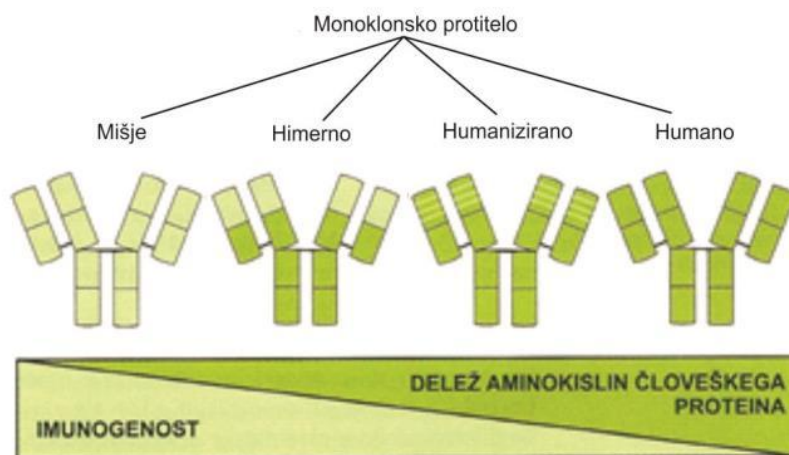
1. Zdravila pridobljena z izolacijo iz rastlin, živali ali človeka, kamor umeščamo tudi kri in krvne proizvode ter klasična cepiva;
2. Skupina bioloških zdravil pridobljenih s pomočjo klasične fermentorske tehnologije;
3. Biološka zdravila pridobljena s sintezo;
4. Genska zdravila;
5. Rekombinantne biološke učinkovine ali biotehnoška zdravila.

Rekombinantna biotehnoška zdravila predstavljajo največji delež bioloških zdravil na trgu. Osnova rekombinantne tehnologije je vgrajevanje gena za določeno učinkovino v gostiteljsko celico. V to skupino uvrščamo rekombinantne hormone, rekombinantne encime, rekombinantne dejavnike strjevanja krvi, sodobna rekombinantna cepiva, največji delež pa predstavljajo rekombinantna monoklonska protitelesa. Največ bioloških zdravil je na voljo za zdravljenje rakavih obolenj, infekcijskih in avtoimunskih bolezni. Od leta 2006 se na tržišču pojavljajo tudi podobna biološka zdravila, to so zdravila, ki predstavljajo alternativo originalnim biološkim zdravilom. Izkazovati morajo primerljivo kakovost, varnost in učinkovitost z inovativnim biološkim zdravilom (1, 11).

#### *1.4.2 Monoklonska protitelesa*

Monoklonska protitelesa so produkt tehnologije rekombinantne DNA in jih lahko proizvedemo v laboratoriju. So enakega izotipa in specifičnosti. Metoda pridobivanja specifičnih monoklonskih protiteles je metoda s hibridizacijo celic, ki temelji na zlitju med normalno protitelesa izdelujočo celico B in mielomsko celico. Celica B je nosilka informacije o specifičnosti protiteles, mielomska celica pa je tovarna za njihovo neomejeno proizvodnjo. Zlitje se lahko doseže s pomočjo polietilenglikola ali z inkubiranjem suspenzije dveh celic z inaktiviranim virusom Sendai. Nastane celica z dvema jedroma, heterokariont, ki se po več delitvah združita. Nastalo celico imenujemo hibridom. Sledi gojenje celic na gojišču, ki vsebuje hipoksantin-aminopterin-timidin, kjer preživijo le hibridne celice, homozigotne starševske celice pa ne. Klone protitelesa izdelujočih hibridomov se preskusi na želeno specifičnost s pomočjo encimsko-immunske metode na trdnem nosilcu (ELISA) ali radioimmunskega testa. Ta metoda je osnova za pridobivanje mišjih monoklonskih protiteles, ki pa imajo v človeškem organizmu manjšo biološko uporabnost, hiter očistek, so zelo imunogena in povzročijo protitelesni odziv. Nastali kompleksi med mišjimi in človeškimi protitelesi lahko povzročijo resne, tudi smrtne alergične reakcije. Zaradi vse večje potrebe po monoklonskih protitelesih, ki bi izražala manj nevarnih stranskih učinkov, so ta začeli preoblikovati s pomočjo rekombinantne tehnologije DNA. Himerna protitelesa sestavlja variabilna regija, ki izvira iz mišje DNA in določa specifičnost protitelesa ter konstantna regija, ki izvira iz človeške DNA (60 - 70 %) in določa izotip protitelesa, hkrati pa opravlja biološke efektorske funkcije, vezane na konstantno regijo. Himerna protitelesa imajo manjšo imunogenost kot mišja, še manjša pa je imunogenost humaniziranih monoklonskih protiteles, kjer iz mišje DNA izhaja samo hipervariabilna regija, torej okrog 15 %. Za pripravo popolnoma človeških monoklonskih protiteles sta najbolj razširjeni metoda fagnega prikaza z uporabo fagnih knjižnic in uporaba transgenih miši. Miš ima lahko namesto mišjih vključene človeške gene za težko in lahko verigo protiteles. Možna je tudi vsaditev človeških bezgavk in priželjca mutiranim sevom miši brez lastnih limfocitov, imajo ti sevi človeške limfocite B in T. Po imunizaciji se osami aktivirane limfocite B in se jih uporabi za pripravo človeških monoklonskih protiteles. Možno je tudi gojenje limfocitov B ob prisotnosti Epstein-Barr virusa in antigena, kjer se nekateri od limfocitov B preoblikujejo tako, da pridobijo nesmrtnost in trajno sposobnost izdelovanja specifičnih protiteles. Popolnoma človeška monoklonska

protitelesa imajo zanemarljivo imunogenost, saj je molekula v celoti sestavljena iz aminokislin človeškega proteina (1, 11).



**Slika 1: Imunogenost monoklonskih protiteles glede na delež aminokislin človeškega proteina (1)**

#### 1.4.3 Terapevtska monoklonska protitelesa

Terapevtska monoklonska protitelesa predstavljajo najhitreje rastočo skupino novih bioloških zdravil z dovoljenjem za promet, predvsem popolnoma človeška protitelesa, ki izkazujejo nižjo stopnjo imunogenosti. Pojavljajo se tudi protitelesa mišjega in ovčjega izvora, himerna in humanizirana, pridobljena s tehnologijo rekombinantne DNA, fragmenti protiteles, s toksinom konjugirana protitelesa, protitelesa označena z radionuklidi in protitelesa pridobljena s tehniko fagnega prikaza. S spremembo molekul na genskem nivoju se pojavljajo fuzijski proteini in monoklonska protitelesa druge in tretje generacije. Glavna terapevtska področja monoklonskih protiteles so okužbe, rakava, srčno-žilna, avtoimunska obolenja in presaditve. Ključno je, da omogočajo ciljno zdravljenje, saj specifično prepoznajo vezavno mesto. Mehanizem delovanja je blokada tarčnega antigena, lahko pa prispevajo tudi k njegovemu uničenju (1, 11).

#### 1.4.4 Zaviralci TNF- $\alpha$ .

Zaviralci TNF- $\alpha$  nevtralizirajo prosti TNF- $\alpha$  in preprečijo njegovo interakcijo s TNF receptorji ter inducirajo apoptozo mononuklearnih vnetnih celic. Prvi zaviralec TNF- $\alpha$ , ki

se je uporabljal v klinične namene, je bil etanercept, človeški TNF- $\alpha$  receptor-Fc rekombinantni fuzijski protein, ki se je pokazal kot učinkovit pri zdravljenju revmatoidnega artritisa in Crohnove bolezni. Kasneje pa so na trg prišla terapevtska monoklonska protitelesa, zaviralci TNF- $\alpha$ : infliksimab, golimumab, certolizumab in adalimumab (6, 10, 13).

#### 1.4.5 Infliksimab

Infliksimab (IFX) je himerno mišje-človeško monoklonsko protitelo, ki se z veliko afiniteto veže na topne (monomer 17 kD in trimer 51 kD) in transmembranske oblike TNF- $\alpha$ . Ne veže se na limfotoksin (TNF- $\beta$ ). Sestavljeno je iz približno 25 % mišjih in približno 75 % človeških aminokislinskih zaporedij. Uporabo IFX, kot prvega monoklonskega protitelesa, je FDA (angl. Food and Drug Administration) odobrila že leta 1998. Terapevtske indikacije za uporabo IFX so: revmatoidni artritis (v kombinaciji z metotreksatom za zmanjšanje znakov in simptomov ter izboljšanje funkcije sklepov), Crohnova bolezen, ulcerozni kolitis, ankilozirajoči spondiloartritis, psoriatični artritis in psoriaza. Z biološkimi testi so pokazali, da zdravilo zavira delovanje TNF- $\alpha$  v *in vitro* sistemu, *in vivo* pa pri človeku tvori stabilne komplekse s taistim citokinom, kar pomeni izgubo aktivnosti TNF- $\alpha$  (11, 14).

### 1.5 NEŽELENI UČINKI PRI ZDRAVLJENJU Z ZAVIRALCI TNF- $\alpha$

#### 1.5.1 Klinični neželeni stranski učinki

Najpogostejši stranski učinki pri zdravljenju se pojavijo na mestu vboda. Po prvih nekaj odmerkih lahko nastopi akutni klinični sindrom sprostitve citokinov iz aktiviranih limfocitov ali monocitov. Značilna je vročina, mrzlica, glavobol, slabost, diareja, bolečine v mišicah in sklepih, splošna oslabelelost, lahko pa pride tudi do kardiovaskularnih zapletov. Opazili so tudi vpliv terapevtskih monoklonskih protiteles na centralni živčni sistem, nevrološke zaplete in povečano obolevnost za oportunističnimi okužbami, predvsem tuberkulozo, kar je posledica zmanjšane koncentracije TNF- $\alpha$ . Močno je povečano tveganje za nastanek limfomov in drugih rakavih obolenj. Povečano je tveganje za reaktivacijo latentne, kronične okužbe. Pogoste so tudi okužbe zgornjih dihal in sečil. Nastanejo lahko preobčutljivostne reakcije, ki so posledica nastanka imunskih



kompleksov. Monoklonska protitelesa so kontraindicirana med nosečnostjo in dojenjem, ker prehajajo skozi placento in materino mleko (11).

### *1.5.2 Primarna rezistenca*

Pri zdravljenju z zaviralci TNF- $\alpha$  se pri približno tretjini bolnikov pojavlja primarna rezistenca. Kaže se kot pomanjkanje izboljšanja kliničnih znakov ob uvedbi terapije. V nekaterih primerih lahko primarno rezistenco razložimo z zmanjšano biološko uporabnostjo zaradi slabe compliance bolnika. Navadno sledi povečanje odmerka ali skrajšanje odmernih intervalov, kar pa ni učinkovito v vseh primerih, lahko se celo poveča možnost nastanka nepopravljivih poškodb tkiva. Razlogi, zaradi katerih pride do primarne rezistence, še niso povsem jasni, verjetno pa so povezani s farmakokinetiko in farmakodinamiko ter odvisni od tega, kolikšno vlogo pri patogenosti igra TNF- $\alpha$  pri posamezniku (13).

### *1.5.3 Sekundarna odpoved*

Sekundarna odpoved, ki se pojavi kar pri polovici bolnikov, se razvije po določenem času zdravljenja z zaviralci TNF- $\alpha$ , običajno po nekaj mesecih, medtem ko je začetni odziv na terapijo dober. V nekaterih primerih je odpoved lahko povezana z razlikami v farmakokinetiki in farmakodinamiki med posamezniki, glavni razlog za sekundarno odpoved pa je imunogenost bioloških zdravil. Pojavi se lahko tudi pri uporabi zaviralcev TNF- $\alpha$ , ki imajo popolnoma človeška aminokislinska ali nukleotidna zaporedja. V tem primeru lahko pride do porušanja native oblike proteina pri izdelavi, formulaciji, transportu ali nepravilnem shranjevanju. Izpostavijo se hidrofobne aminokisliline, ki povzročijo nastanek specifičnih protiteles proti biološkemu zdravilu (ADA) in zmanjšajo njegovo delovanje. Do sekundarne odpovedi lahko prav tako privede stalna prisotnost zaviralca TNF- $\alpha$ , vpliv pa ima tudi velikost same molekule. Nevtralizacijska ADA nevtralizirajo antagonistično aktivnost zaviralcev TNF- $\alpha$ . Če pride do nastanka imunskih kompleksov med ADA in zaviralcem TNF- $\alpha$ , se lahko pojavijo resni stranski učinki, ki so posledica odlaganja teh kompleksov v tkivih, na primer infuzijska reakcija, serumska bolezen, bronhospazem in Arthusova reakcija. Poleg nevtralizacijskih poznamo tudi ne-nevtralizacijska ADA, ki lahko posredno zmanjšajo terapevtsko učinkovitost zaviralcev TNF- $\alpha$ , zaradi njihovega vpliva na biološko razpoložljivost, nimajo pa neposrednega

vpliva na delovanje zdravila. Dejavniki, ki vplivajo na razvoj imunogenosti, so povezani z zdravljenjem (odmerek in trajanje zdravljenja, način dajanja zdravila, menjava zdravil in izpostavljenost drugim zdravilom), z zdravilom (spremembe v sekvenci, glikozilacija, prisotnost kontaminantov in s produktom povezanih nečistot, pogoji shranjevanja in rokovanja) in z bolnikom (genetska predispozicija, spremljajoče bolezni in/ali zdravila ter bolnikov imunski status). Sočasno jemanje temeljnih zdravil zmanjša imunogenost bioloških zdravil, zaradi njihovega imunosupresivnega učinka, saj je v vnetih tkivih manjša produkcija TNF- $\alpha$  (11, 13, 15, 17).

## **1.6 KLINIČNA UPORABNOST DOLOČANJA KONCENTRACIJ BIOLOŠKEGA ZDRAVILA**

Zdravljenje z zaviralci TNF- $\alpha$  je povezano s kliničnimi in patofiziološkimi izidi tako na začetku kot tudi med terapijo. Merjenje koncentracij biološke učinkovine in morebitnih ADA je tako uporabno orodje, ko govorimo o tarčnem zdravljenju in optimizaciji terapije, da bi bila ta čim bolj prilagojena posameznemu bolniku (bolniku prijazna medicina). Prav tako so optimizirani stroški zdravljenja. Brez podatkov o koncentracijah ADA je namreč najpogostejša odločitev zvišanje odmerka oziroma skrajšanje odmernega intervala, ki pa ima številne slabosti. Bolnik, ki ima sicer terapevtske vrednosti biološke učinkovine, a še vedno prisotne simptome bolezni, se na terapijo ne odziva, zvišan odmerek pa pripomore k nadaljnjim poškodbam tkiva in nastanku novih stranskih učinkov. V primeru, ko so že prisotna ADA, pogosto traja mesece, da se pokažejo simptomi bolezni. Če jih torej določimo že prej, lahko ustrezno ukrepamo brez hujših posledic za bolnika. Zelo pomembno je redno spremljanje serumskih koncentracij biološke učinkovine ter koncentracije ADA. Na podlagi teh informacij so možne sledeče prilagoditve zdravljenja:

- **Kadar ima bolnik nizko koncentracijo biološkega zdravila in ADA niso prisotna**

Zdravnik lahko poveča odmerek oziroma zmanjša odmerne intervale. Razlog za nizko koncentracijo zdravila je lahko nižja biološka uporabnost, zaradi lokalnega injiciranja in/ali zmanjšan razpolovni čas pri večji aktivnosti bolezni.

- **Kadar ima bolnik visoko koncentracijo biološkega zdravila in ADA niso prisotna**

Ob aktivni obliki bolezni mora zdravnik zamenjati terapevtsko skupino bioloških zdravil, ker v tem primeru TNF- $\alpha$  ne igra ključne vloge v patogenezi bolezni.

- **V primeru nizke koncentracije biološke učinkovine ob prisotnosti ADA**

Potrebna je menjava zdravila znotraj skupine zaviralcev TNF- $\alpha$ . Biološka učinkovina je v kompleksu z ADA, kar ji onemogoča dostop do mesta vnetja ali vezavo na TNF- $\alpha$ .

- **Kadar ima bolnik visoke vrednosti biološkega zdravila in ADA**

Možna je prisotnost ne-nevtralizacijskih ADA. Potrebna je ponovna določitev obeh koncentracij (16).

**Preglednica I: Prilagoditev zdravljenja v primeru visokih/nizkih koncentracij zaviralca TNF- $\alpha$  ob prisotnosti/odsotnosti ADA**

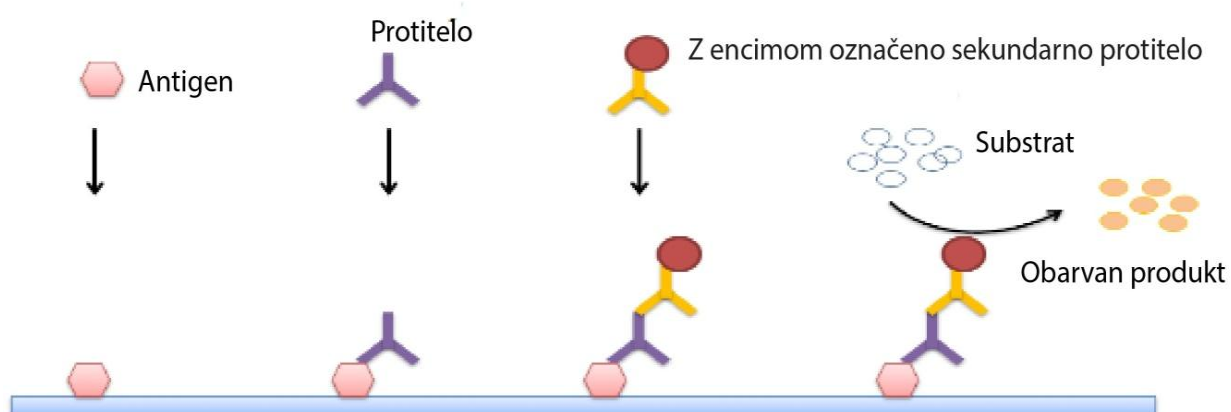
	<b>Protitelesa proti zaviralcu TNF-<math>\alpha</math></b>	
<b>Zaviralec TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>Odsotna</b>	<b>Prisotna</b>
<b>Nizka koncentracija</b>	Nižja biološka uporabnost ↓ povečanje odmerka/skrajšanje odmernega intervala	Imunogenost ↓ zamenjava z drugim zaviralcem TNF- $\alpha$
<b>Visoka koncentracija</b>	TNF- $\alpha$ ne igra ključne vloge v patogenezi bolezni ↓ zamenjava terapevtske skupine bioloških zdravil pri bolnikih z aktivno boleznijo	Ne-nevtralizacijska ADA? ↓ ponovna določitev koncentracij biološkega zdravila in ADA

Najpogosteje uporabljene tehnike za določanje koncentracije zaviralcev TNF- $\alpha$  so ELISA, in sicer sendvič ELISA in indirektna ELISA. Pri merjenju koncentracije ADA pa se uporabljata predvsem premostitvena ELISA (bELISA - ang. bridging ELISA) in radioimunska tehnika (18).

### 1.6.1 Encimsko imunski testi na trdnem nosilcu

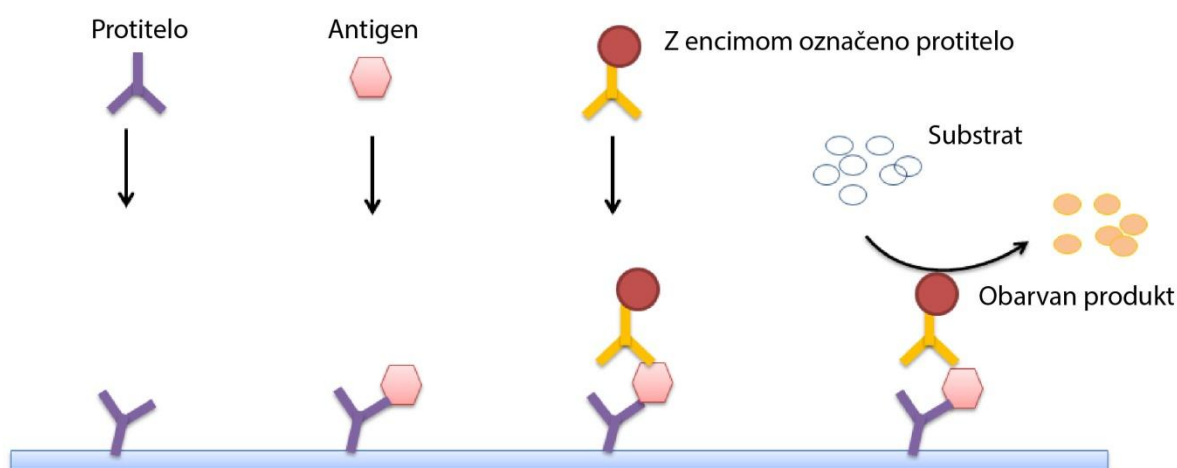
Osnova ELISA je reakcija med antigenom in protitelesom, ki vključuje številne nekovalentne interakcije (vodikove vezi, ionske vezi, hidrofobne interakcije, van der Waalove sile) med antigensko determinanto in komplementarnost določujočimi regijami molekule protitelesa. Te interakcije so šibke in delujejo na zelo kratke razdalje. Močna vez nastane samo ob tesnem stiku antigena s protitelesom, zato so imunske reakcije zelo specifične. Metode ELISA se uporabljajo za kvantitativno določitev protiteles (indirektna ELISA) ali kvantitativno določitev antigenov, ki imajo več epitopov (sendvič ELISA).

Pri indirektni ELISA (Slika 2) serumski vzorec s primarnim protitelesom (terapevtsko monoklonsko protitelo) inkubiramo v mikrotitrski jamici, prekriti z antigenom in pustimo, da poteče reakcija. Nato speremo nevezana protitelesa in dodamo z encimom konjugirano sekundarno protitelo, ki se veže s primarnim protitelesom. Sledi spiranje nevezanih sekundarnih protiteles, dodatek substrata za vezani encim in ustavitvene raztopine. Obarvan produkt reakcije merimo spektrofotometrično. Indirektna ELISA ima visoko specifičnost, občutljivost, je enostavna za izvedbo in cenovno ugodna. Prav tako omogoča različne načine detekcije, saj je na voljo širok spekter različnih protiteles (usmerjena proti človeški IgG verigi ali specifična protitelesa proti terapevtskim monoklonskim protitelesom) in encimov za detekcijo (alkalna fosfataza (AP) in hrenova peroksidaza (HRP)).



**Slika 2: Indirektna ELISA (19)**

Antigene, ki imajo več epitopov kvantitativno določamo s sendvič ELISA (Slika 3). V mikrotitrski jamici imobiliziramo protitelo, specifično za enega od epitopov na določevanem antigenu. Po spiranju nevezanih protiteles dodamo vzorec, ki vsebuje antigen. Ko poteče reakcija, speremo nevezan antigen in dodamo drugo protitelo, specifično za drug epitop našega antigena, ki je konjugirano z encimom. Po spiranju nevezanih protiteles dodamo substrat in ustavitveno raztopino ter spektrofotometrično izmerimo obarvan produkt reakcije. Sendvič ELISA ima zaradi uporabe dveh specifičnih protiteles visoko specifičnost. Metoda velja tudi za zelo občutljivo, fleksibilno in je cenovno ugodna.



**Slika 3: Sendvič ELISA (20)**

Pri obeh metodah ELISA moramo pripraviti umeritveno krivuljo z znanimi koncentracijami protitelesa oziroma antigena, iz katere razberemo neznan koncentracijo le-teh v vzorcu. ELISA je najpogosteje uporabljana metoda pri določanju koncentracije zaviralcev TNF- $\alpha$ , ker velja za uporabnikom prijazno metodo. Kljub temu pa je analiza podatkov kompleksna in zahteva dobro validacijo in standardizacijo, z opredelitvijo vseh parametrov vrednotenja metod in rezultatov (2, 18).

## 1.7 OPREDELITEV PARAMETROV VREDNOTENJA METOD IN REZULTATOV

Cilj kateregakoli analitskega merjenja je pridobitev doslednih, zanesljivih in točnih rezultatov, kar dosežemo s pomočjo validirane analitske metode. Pri razvoju in validaciji metode moramo najprej opredeliti namen, optimizirati in standardizirati metodo, ovrednotiti natančnost, točnost, analizno občutljivost (mejo zaznavnosti, mejo kvantifikacije), analizno specifičnost, klinično pomembno koncentracijsko območje in linearnost. Optimizacija je postopek, pri katerem ovrednotimo in prilagodimo fizikalne, kemične in biološke parametre, da zagotovimo optimalno delovanje metode. Priporočljivo je določiti vsaj tri dobro definirane vzorce, od visoko pozitivnega do negativnega, ki nam kasneje služijo kot kontrole, po vsaj dveh metodah, ki se razlikujejo od metode, ki jo vrednotimo. Kadar je metoda predvidena za rutinsko uporabo v več različnih laboratorijih, je nujna tudi njena standardizacija. Opisati je potrebno vsako uporabljeno kemikalijo, raztopino in reagent, potrebno opremo, njene specifikacije ter kalibracijo. Validacijo metode potrebujemo za potrditev njenega namena. Sledi diagnostično vrednotenje dobljenih rezultatov, ki so v pomoč pri presejanju, diagnostiki in spremljanju bolezni, kjer imata ključno vlogo diagnostična občutljivost ter diagnostična specifičnost (22-26).

### 1.7.1 Natančnost analizne metode

Natančnost analizne metode je definirana s sipanjem rezultatov pri vrsti meritev opravljenih na istem vzorcu pod predpisanimi pogoji. Nanaša se na velikost razlik med posameznimi rezultati in manjše kot so razlike, natančnejša je metoda. Podamo jo s pomočjo relativnega standardnega odmika (SD) oziroma koeficienta variabilnosti (KV), ki je kvocient med SD in aritmetično sredino. KV izrazimo v odstotkih. Znotraj-analizna natančnost (ponovljivost) je večkratna ponovitev meritve istega vzorca znotraj ene analize. Med-analizno natančnost (vmesna natančnost) pa podaja ponovljivost med analizami v daljšem časovnem obdobju na istih vzorcih. Analize so izvedene ob različnih dnevih. Uprava ZDA za hrano in zdravila določa, da mora biti  $KV < 20 \%$ , kar zagotavlja skladnost rezultatov pri uporabi analiznih metod v različnih časovnih obdobjih (22, 27, 31).

### *1.7.2 Točnost analizne metode*

Točnost je definirana kot stopnja ujemanja med dejansko ali sprejeto, referenčno vrednostjo in izmerjeno vrednostjo. Je merilo pravilnosti metode. Eden od načinov določitve točnosti je primerjava rezultatov dane metode z rezultati referenčne metode, lahko pa tudi primerjamo meritev vzorca znane koncentracije s pravo vrednostjo. Točnost računamo s pomočjo metode dodatka. Serumski ali plazemski vzorci lahko vsebujejo moteče snovi, ki vplivajo na zmožnost zaznave analita. Pravilnost z metodo dodatka ovrednotimo s pomočjo znane količine vzorca v različnih vzorčnih medijih. Vrednosti morajo biti med 80 in 120 %, da je vpliv različnih medijev minimalen, rezultati pa točni. Podatek o točnosti nam služi pri odkrivanju sistemskih napak (22, 27, 28).

### *1.7.3 Meja zaznavnosti*

Analizna občutljivost se podaja kot najmanjša koncentracija analita, ki jo še lahko razločimo od negativne vrednosti (meja zaznavnosti, LOD). Je najmanjša sprememba koncentracije analita, ki jo v določenem koncentracijskem območju še lahko zaznamo. Zaznava zelo majhnih koncentracij pomeni, da je analizna občutljivost zelo visoka in obratno. V praktičnem smislu je analizna občutljivost naklon kalibracijske krivulje (23, 29, 31).

### *1.7.4 Meja kvantifikacije*

Meja kvantifikacije (LOQ) je najmanjša količina analita v vzorcu, ki jo lahko kvantitativno določimo z ustrežno točnostjo in natančnostjo. Uporablja se pri določevanju zelo majhnih količin analita, nečistot ter produktov razgradnje (23).

### *1.7.5 Analizna specifičnost*

Analizna specifičnost je sposobnost metode, da meri točno določen analit v vzorcu, kljub prisotnosti ostalih snovi. Če analizna metoda ni specifična, pride do navzkrižne reaktivnosti z analitu sorodnimi snovmi, kar vodi do lažno pozitivnih rezultatov (23, 29, 31).

### *1.7.6 Linearnost*

Linearnost analize metode je njena sposobnost, da v določenem območju poda rezultate linearno proporcionalno koncentraciji analita v vzorcu. Dokažemo jo neposredno z redčenjem vzorca. Linearnost nam poda informacijo o natančnosti rezultatov za vzorce pri različnih stopnjah redčenja. Kadar je v območju 80 – 120 % pričakovane koncentracije pri dani redčitvi, je linearnost dobra (22, 31).



## 2. NAMEN DELA

V patogenezi mnogih vnetnih bolezni ima ključno vlogo TNF- $\alpha$ , zato se pri zdravljenju uporabljajo zaviralci tega citokina, kar privede do zmanjšanja aktivnosti bolezni ali remisije. Pri uporabi le-teh pa so se pokazali številni neželeni učinki, med katerimi je najresnejši pojav imunogenosti, ki je najpogostejši vzrok sekundarne odpovedi. Za varno, učinkovito in kakovostno, bolniku prilagojeno terapijo, je pomembno redno spremljanje koncentracije biološkega zdravila. Koncept bolniku prijazne medicine na področju zaviralcev TNF- $\alpha$  je uporabljen le občasno, kar pa ni presenetljivo, saj za približno polovico pacientov z revmatoidnim artritisom ni predpisanih nadaljnjih smernic zdravljenja, če zdravljenje z zaviralci TNF- $\alpha$  ni uspešno (13).

### **Namen magistrske naloge je:**

1. Oblikovanje, postavitve in izvedba dveh različic hišne ELISA za določanje koncentracije IFX (IFX-ELISA) z uporabo sekundarnega proti IgG usmerjenega protitelesa označenega z AP (sekundarno anti-IgG<sup>AP</sup>) in specifičnega sekundarnega protitelesa usmerjenega proti IFX označenega s HRP (sekundarno anti-IFX<sup>HRP</sup>).
2. Ovrednotenje dveh različic hišne IFX-ELISA (znotraj-analizna natančnost, med-analizna natančnost, točnost, specifičnost, LOD in LOQ, linearnost).
3. Primerjava rezultatov dveh različic hišne IFX-ELISA z analiznim kompletom apDia za določanje koncentracije IFX.

### 3. MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Kemikalije

- Goveji serumski albumin (BSA), Sigma, St. Louis, ZDA
- Para-nitrofenil-fosfat 5 mg tablete (pNPP), Sigma Chemical, St. Louis, ZDA
- 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin (TMB), Thermo Scientific, Massachusetts, ZDA
- Dietanolamin (DEA) ( $\text{NH}(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH})_2$ ) analitske čistoče, Sigma, St. Louis, ZDA
- Magnezijev klorid heksahidrat ( $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ) analitske čistoče, Kemika, Zagreb, Hrvaška
- Natrijev azid ( $\text{NaN}_3$ ) analitske čistoče, Merck, Darmstadt, Nemčija
- Natrijev klorid ( $\text{NaCl}$ ) analitske čistoče, Merck, Darmstadt, Nemčija
- Dinatrijev hidrogenfosfat dihidrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) analitske čistoče, Merck, Darmstadt, Nemčija
- Kalijev klorid ( $\text{KCl}$ ) analitske čistoče, Merck, Darmstadt, Nemčija
- Kalijev dihidrogenfosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) analitske čistoče, Merck, Darmstadt, Nemčija
- Klorovodikova kislina ( $\text{HCl}$ ) analitske čistoče, Kemika, Zagreb, Hrvaška
- Tween 20, Sigma, St. Louis, ZDA
- Natrijev hidroksid ( $\text{NaOH}$ ) analitske čistoče, Kemika, Zagreb, Hrvaška
- 2M žveplova kislina ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) analitske čistoče, Merck, Darmstadt, Nemčija

##### 3.1.2 Pufri in raztopine

- Dietanolaminski pufer (DEA); pH=9,8
  - ◇ Dietanolamin 970 mmol/L
  - ◇ Magnezijev klorid 0,49 mmol/L
  - ◇ Natrijev azid 3,1 mmol/L
- S fosfatom pufrana fiziološka raztopina (PBS); pH=7,4
  - ◇ Natrijev klorid 137 mmol/L
  - ◇ Kalijev klorid 2,68 mmol/L

◇ Dinatrijev hidrogenfosfat dihidrat 6,46 mmol/L

◇ Kalijev dihidrogenfosfat 1,47 mmol/L

- PBS z 0,05 % Tween 20 (PBS-0,05% tw20)- spiralni pufer; pH=7,4

◇ Natrijev klorid 137 mmol/L

◇ Kalijev klorid 2,68 mmol/L

◇ Dinatrijev hidrogenfosfat dihidrat 6,46 mmol/L

◇ Kalijev dihidrogenfosfat 1,47 mmol/L

◇ Umerimo pH in dodamo 5 mL Tween 20

- 1 % BSA/PBS

◇ BSA 0,6 g

◇ PBS do 60 g

- 0,1 % BSA/PBS

◇ BSA 0,02 g

◇ PBS do 20 g

### 3.1.3 Sekundarna protitelesa

- Afinitetno prečiščena kunčja protitelesa anti-IgG<sup>AP</sup>, Accurate Chemical&Scientific Corporation (ACSC), Westbury, ZDA.
- Afinitetno prečiščena anti-IFX<sup>HRP</sup>, Bio-Rad Laboratories Inc., ZDA.

### 3.1.4 Analizni komplet apDia

- Analizni komplet Infliximab ELISA apDia b.v.b.a., Belgija

### 3.1.5 Biološki vzorci

Uporabljali smo vzorce bolnikov na terapiji z IFX, ki so bili poslani na določanje koncentracij IFX v Laboratorij za imunologijo revmatizma. Shranjeni so bili v zamrzovalniku na -20 °C do dneva analize. V primerjavo z apDia IFX-ELISA smo vključili 90 vzorcev, od tega 53 moških in 37 ženskih vzorcev bolnikov z vnetnimi revmatičnimi in kroničnimi vnetnimi črevesnimi boleznimi. Z Remicade<sup>®</sup> se je zdravilo 15

bolnikov, s podobnim biološkim zdravilom, Remsimo<sup>TM</sup>, pa 35, za ostale nimamo podatka. Razlogi za kontrolo serumskih koncentracij IFX so bili zelo različni. V enem od primerov je šlo za prvo aplikacijo zdravila, trikrat je šlo za testiranje po indukciji oziroma ponovni indukciji, imeli smo tudi en primer alergične reakcije. Pri 11-ih bolnikih je prišlo do popuščanja terapije, 35 jih je bilo poslanih na redno kontrolo, pri ostalih pa ni bilo navedenega razloga za testiranje. Analizirali smo tudi 15 vzorcev zdravih krvodajalcev za izračun LOD in LOQ, 5 vzorcev bolnikov, ki so imeli pozitiven rezultat pri določanju adalimumaba in 5 vzorcev s pozitivnim revmatoidnim faktorjem (RF) za dokaz analizne specifičnosti. Magistrska naloga je potekala v okviru raziskovalnega programa Sistemske avtoimunske bolezni, za katerega je bilo pridobljeno mnenje Komisije za medicinsko etiko.

### *3.1.6 Kontrolni material*

Za kontrole smo pri hišni IFX-ELISA uporabili izbrane serume bolnikov. Uporabili smo tri kontrole:

- Serum bolnika z negativnim rezultatom (pod 0,5 µg/mL)
- Serum bolnika s srednje pozitivnim rezultatom (od 1 µg/mL do 3 µg/mL)
- Serum bolnika z visoko pozitivnim rezultatom (od 7 µg/mL do 9 µg/mL)

Analizni komplet apDia vsebuje dve pozitivni kontroli, pripravljene za uporabo (uporabni 2 meseca pri shranjevanju na 2 – 8 °C):

- Pozitivna kontrola 1, ki vsebuje 30 ng/mL IFX
- Pozitivna kontrola 2, ki vsebuje 70 ng/mL IFX

### *3.1.7 Standardi*

Za pripravo umeritvene krivulje smo kot standard IFX pri hišni metodi uporabili Remsimo<sup>TM</sup> (100 mg prašek za pripravo raztopine za infundiranje IFX), Celltrion, Koreja. Pripravili smo raztopino s koncentracijo 12 µg/mL in jo redčili 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600.

Analizni komplet apDia vsebuje 6 raztopin standardov, pripravljenih za uporabo:

- Standard 0: 0 ng/mL
- Standard 5: 5 ng/mL

- Standard 10: 10 ng/mL
- Standard 20: 20 ng/mL
- Standard 60: 60 ng/mL
- Standard 120: 120 ng/mL

### 3.1.8 *Antigen*

Rekombinantni človeški TNF- $\alpha$  sterilno filtriran in liofiliziran, vir je E.coli (Peprtech, ZDA). Shranjen je bil na -80 °C.

- Priprava TNF- $\alpha$ :

Originalno embalažo TNF- $\alpha$  (100  $\mu$ g) smo najprej centrifugirali, dodali 100  $\mu$ L destilirane vode in raztapljali 2 uri na sobni temperaturi. Nato smo dodali 900  $\mu$ L pufra (0,1 % BSA/PBS). Končna koncentracija je bila 100  $\mu$ g/mL (34).

### 3.1.9 *Mikrotitrne ploščice*

Pri hišni metodi smo uporabljali visoko vezavne polistirenske Nunc MaxiSorp mikrotitrne ploščice, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, ZDA.

Analizni komplet apDia uporablja mikrotitrne ploščice z vezanim človeškim TNF- $\alpha$ .

### 3.1.10 *Aparature in pribor*

- Droben laboratorijski material: pipete, več kanalne pipete, nastavki za pipete, stojalo za epruvete, plastične kadičke, steklovina (erlenmajerice, bučke, merilni valji, čaše, stekleničke...), staničevina, magneti, spatule, čolnički za tehtanje, kapalke...
- Analitska tehnica, Mettler Toledo type PM2500, Mettler Toledo AG, Greifensee, Švica
- Rotacijsko mešalo, Spectrafuge 24D, Labnet International, ZDA
- pH meter, Mettler Toledo SevenEasy, Ohio, ZDA
- Spektrofotometerski čitalec mikrotitrskih ploščic, Tecan Rainbow, Thermo SLT, Avstrija
- Mešalo Vortex 2 genie, Scientific Industries, ZDA
- Magnetno mešalo IKA RCT basic safety control, IKA, Staufen, Švica

- Spiralknik za mikrotitrne ploščice 405 LS microplate washer, BioTek Instruments Inc., Highland Park, ZDA

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Metoda določanja koncentracije IFX v serumu bolnikov z analiznim kompletom apDia IFX-ELISA

Analizni komplet apDia smo pred začetkom analize ogreli na sobno temperaturo (20°C - 25°C), vse reagente pa je bilo potrebno pred uporabo nežno premešati z obračanjem stekleničke (brez penjenja). Potrebna je bila tudi priprava spiralnega pufra, ki je koncentriran in pri višjih temperaturah lahko tudi moten po izgledu. Razredčen je stabilen 1 mesec na +2 - +8 °C.

Vzorci smo pripravili tako, da smo 5 µL vzorca redčili 1:100 s pufrom za redčenje vzorcev. Vzorce, standarde in kontrole smo na mikrotitrsko ploščico nanegli v dvojniku, 100 µL/odprtino in ploščico prelepili z zaščitno folijo ter inkubirali pri temperaturi 37 °C (±2 °C) 60 minut (±2 minuti). Sledilo je spiranje s spiralnim pufrom 3 x 300 µL/odprtino, po spiranju je bilo potrebno ploščico dobro osušiti na staničevini. Nato smo nanegli 100 µL/odprtino sekundarnega protitelesa (specifično monoklonsko protitelo usmerjeno proti IFX, klon 6B7 označeno s HRP) ter mikrotitrsko ploščico ponovno prelepili z zaščitno folijo in inkubirali pri temperaturi 37 °C (±2 °C) 30 minut (±2 minuti). Spirali smo po enakem postopku in nanegli substrat TMB, 100 µL/odprtino. Ploščico smo inkubirali v temi na 37 °C (±2 °C) 10 minut (±1 minuta) in nato nanegli 50 µL/odprtino reagenta za ustavitev reakcije. Absorbanco smo izmerili pri valovni dolžini 450 nm znotraj časovnega intervala 30 minut, čitalnik pa smo vključili vsaj 15 minut pred merjenjem (32, 33).

### 3.2.2 Hišna metoda ELISA za določanje koncentracije IFX v serumu bolnikov

Na polistirensko mikrotitrsko ploščico Nunc MaxiSorp smo nanegli 100 µL TNF-α (0,3 µg/mL v PBS)/odprtino, jo pokrili in inkubirali čez noč na 4°C. Sledilo je spiranje s spiralnim pufrom (PBS/0,05 % Tween 20) s spiralcem 1 x 300 µL/odprtino, nanos blokade 200 µL/odprtino (1 % BSA/PBS) in inkubacija na sobni temperaturi 120 minut. Medtem smo pripravili vzorce, standarde in kontrole. Vzorce in kontrole smo redčili 1:100 (5 µL vzorca, kontrole) v 1 % BSA/PBS. Po štirikratnem spiranju s 300 µL spiralnega

pufra smo vzorce, standarde in kontrole nanesli v paraleli, 100  $\mu\text{L}$ /odprtino in mikrotitrsko ploščico prelepili z zaščitno folijo ter inkubirali 120 minut pri temperaturi 37 °C ( $\pm 2$  °C). Ponovno smo štirikrat spirali in nanesli konjugat.

- Konjugat je bil pri prvi različici hišne IFX-ELISA sekundarno anti-IgG<sup>AP</sup>. Nanesli smo ga 100  $\mu\text{L}$ /odprtino. Konjugat je bil redčen 1:5000 v PBS/1 % BSA. Sledila je inkubacija na sobni temperaturi 60 minut in ponovno štirikratno spiranje s 300  $\mu\text{L}$ /odprtino spiralnega pufra. Nato smo nanesli 100  $\mu\text{L}$ /odprtino substrata pNPP v DEA pufri s končno koncentracijo 1 g/L. Potem smo ploščico nekaj minut inkubirali na sobni temperaturi in nato izmerili absorbanco pri valovni dolžini 405 nm. Čitalnik smo vključili 15 minut pred merjenjem.
- Konjugat pri drugi različici hišne IFX-ELISA je bilo specifično sekundarno anti-IFX<sup>HRP</sup> s koncentracijo 1,5  $\mu\text{g/mL}$ . Nanesli smo ga 100  $\mu\text{L}$ /odprtino. Nato je sledila inkubacija na sobni temperaturi 60 minut ter štirikratno spiranje s 300  $\mu\text{L}$ /odprtino spiralnega pufra. Potem smo dodali 100  $\mu\text{L}$ /odprtino substrata TMB, ploščico nekaj minut inkubirali na sobni temperaturi in izmerili absorbanco pri valovni dolžini 450 nm. Čitalnik smo vključili 15 minut pred merjenjem.

### 3.3 ENAČBE ZA RAČUNANJE PARAMETROV ZA VREDNOTENJE METODE IN REZULTATOV

Hišno IFX-ELISA smo ovrednotili z analizo natančnostjo (znotraj in med-analizna natančnost), analizo specifičnostjo, analizo točnostjo (metoda dodatka), linearnostjo in analizo občutljivostjo. Vrednosti zgoraj naštetih parametrov pa smo izračunali s pomočjo naslednjih enačb (35-37):

- *Enačba 1:* Analizna natančnost:  $KV(\%) = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100$        $SD = \sqrt{\frac{\sum f(x-\bar{x})^2}{n-1}}$
- *Enačba 2:* Analizna točnost: Delež pravilnosti (%) =  $\frac{\text{izmerjena vrednost} \times 100}{\text{pričakovana vrednost}}$
- *Enačba 3:* Meja zaznavnosti:  $LOD = \bar{x} + 3 \times SD$
- *Enačba 4:* Meja kvantifikacije:  $LOQ = \bar{x} + 10 \times SD$

### 3.4 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Vse podatke smo statistično obdelali s programi Microsoft Excel 2007, GraphPad in SPSS.

S pomočjo metode linearne korelacije smo določili regresijsko premico, ki proučuje kako dobro sta povezani količini na osi x in y. Primerjali smo rezultate pridobljene s hišno IFX-ELISA pri uporabi dveh različnih sekundarnih protiteles z rezultati pridobljenimi z analiznim kompletom apDia. Pri primerjavi rezultatov hišne IFX-ELISA z analiznim kompletom apDia smo računali koeficient korelacije po Pearsonu, ki se uporablja kadar so podatki normalno porazdeljeni in lahko zavzema vrednosti med -1 in 1. Pri prvi gre za maksimalno negativno, pri drugi pa maksimalno pozitivno korelacijo dveh spremenljivk, vrednost 0 pa pomeni, da spremenljivki nista medsebojno povezani. Pozitivno povezanost med spremenljivkama vrednotimo po naslednjem sistemu (35, 37):

- Ni povezanosti ( $r = 0,00$ )
- Neznatna povezanost ( $r = 0,01 - 0,19$ )
- Šibka povezanost ( $r = 0,20 - 0,39$ )
- Zmerna povezanost ( $r = 0,40 - 0,69$ )
- Močna povezanost ( $r = 0,70 - 0,89$ )
- Zelo močna povezanost ( $r = 0,90 - 0,99$ )
- Popolna povezanost ( $r = 1,00$ )

Pearsonov koeficient računamo s pomočjo naslednje enačbe:

- *Enačba 5:* Pearsonov koeficient:  $r = \frac{\sum(x-\bar{x})(y-\bar{y})}{\sqrt{\sum(x-\bar{x})^2 \sum(y-\bar{y})^2}}$

Koeficient povezanosti med razredi ICC (intraclass correlation coefficient) uporabljamo pri kvantitativnih meritvah na podatkih, ki so organizirani v razrede. Opisuje, kako močno so povezani podatki znotraj razreda.

Koeficient kappa (Cohenov kappa koeficient) opisuje skladnost med meritvami in zaseda vrednosti med 0,00 in 1,00.



Koeficient ICC smo uporabili za merjenje zanesljivosti rezultatov pri primerjavi hišne IFX-ELISA z analiznim kompletom apDia, koeficient kappa pa za merjenje ponovljivosti pri primerjavi hišne metode (uporaba dveh različnih, različno konjugiranih sekundarnih protiteles) z analiznim kompletom apDia. Pri vrednotenju ujemanja smo pri obeh koeficientih upoštevali 95% interval zaupanja (za statistično pomembno smo privzeli vrednost  $p < 0,05$ ) in naslednjo lestvico ujemanja po Landisu in Kochu (1977) (38-40):

- Slabo ujemanje (pod 0,00)
- Rahlo ujemanje (0,00 - 0,20)
- Zmerno ujemanje (0,21 - 0,40)
- Dobro ujemanje (0,41 - 0,60)
- Odlično ujemanje (0,61 - 0,80)
- Popolno ujemanje (0,81 - 1,00)

## 4. REZULTATI

### 4.1 ANALIZNE LASTNOSTI HIŠNE IFX-ELISA

#### 4.1.1 Znotraj-analizna natančnost

Tri preiskovane vzorce smo nanesti na mikrotitrsko ploščico v dvojniku na štiri različna mesta, izmerili absorbance ter variabilnost podali s KV (%). Dovoljena meja pri metodi je bila 20 %.

- Znotraj-analizna natančnost pri uporabi sekundarnega anti-IgG<sup>AP</sup> je bila 6,6 %, kar prikazuje preglednica II.
- Znotraj-analizna natančnost pri uporabi sekundarnega anti-IFX<sup>HRP</sup> je bila 10,8 %, kar prikazuje preglednica III.

**Preglednica II: Znotraj-analizna natančnost hišne IFX-ELISA pri uporabi sekundarnega anti-IgG<sup>AP</sup>**

Vzorec	Povprečna izmerjena koncentracija (µg/mL)	Standardna deviacija (SD)	Natančnost (KV%)
1	1,11	0,076	6,8
2	2,50	0,198	7,9
3	8,58	0,429	5,0
<b>Povprečje</b>		0,234	<b>6,6</b>

**Preglednica III: Znotraj-analizna natančnost hišne IFX-ELISA pri uporabi sekundarnega anti-IFX<sup>HRP</sup>**

Vzorec	Povprečna izmerjena koncentracija (µg/mL)	Standardna deviacija (SD)	Natančnost (KV%)
1	1,04	0,150	14,4
2	1,87	0,214	11,4
3	7,97	0,535	6,7
<b>Povprečje</b>		0,300	<b>10,8</b>

*4.1.2 Med-analizna natančnost*

Ponovljivost med analizami smo določili na podlagi izmerjenih absorbanc dveh pozitivnih kontrol iz katerih smo izračunali KV(%). Za pozitivno kontrolo 1 smo izbrali serum bolnika s srednje pozitivnim rezultatom (koncentracija IFX med 1 µg/mL in 3 µg/mL), za pozitivno kontrolo 2 pa serum bolnika z visoko pozitivnim rezultatom (koncentracija IFX med 7 µg/mL in 9 µg/mL).

- Med-analizna natančnost pri uporabi sekundarnega anti-IgG<sup>AP</sup>:

Koeficient variacije je znašal za pozitivno kontrolo 1 13,8 %, za pozitivno kontrolo 2 pa 16,8 %. Povprečna med-analizna natančnost za obe kontroli je znašala 15,3 %, kar je prikazano v preglednici IV.

- Med-analizna natančnost pri uporabi sekundarnega anti-IFX<sup>HRP</sup>:

Koeficient variacije za pozitivno kontrolo 1 je znašal 15,3 %, za pozitivno kontrolo 2 pa 11,7 %. Povprečna med-analizna natančnost za obe kontroli je znašala 13,5 %. Rezultati so prikazani v preglednici V.

**Preglednica IV: Med-analizna natančnost hišne IFX-ELISA pri uporabi anti-IgG<sup>AP</sup>**

	<b>Povprečna koncentracija (µg/mL)</b>	<b>Standardna deviacija (SD)</b>	<b>Natančnost (KV%)</b>
poz 1	2,79	0,38	<b>13,8</b>
poz 2	7,88	1,33	<b>16,8</b>
<b>povprečje</b>		0,86	<b>15,3</b>

**Preglednica V: Med-analizna natančnost hišne IFX-ELISA pri uporabi sekundarnega anti-IFX<sup>HRP</sup>**

	<b>Povprečna koncentracija (µg/mL)</b>	<b>Standardna deviacija (SD)</b>	<b>Natančnost (KV%)</b>
poz 1	1,69	0,26	<b>15,3</b>
poz 2	7,41	0,87	<b>11,7</b>
<b>povprečje</b>		0,57	<b>13,5</b>

#### *4.1.3 Točnost- pravilnost metode ovrednotena z metodo dodatka*

Za dokazovanje točnosti smo izbrali tri vzorce, katerih koncentracija je bila pod LOQ. Dodali smo jim znani koncentraciji IFX in sicer 5 µg/mL in 10 µg/mL. Za vsako od teh koncentracij smo na podlagi vseh treh izmerjenih vrednosti izračunali delež pravilnosti in SD ter ju podali v odstotkih.

- Točnost pri uporabi sekundarnega anti-IgG<sup>AP</sup> :

Izbrana vzorca in kontrola so imeli negativne koncentracije IFX. Povprečen delež pravilnosti  $\pm$  SD pri dodatku koncentracije 5  $\mu\text{g/mL}$  je bil  $120,2 \pm 11,2$  %, pri dodatku 10  $\mu\text{g/mL}$  pa  $92,9 \pm 2,8$  %, kar je prikazano v preglednici VI.

- Točnost pri uporabi sekundarnega anti-IFX<sup>HRP</sup>:

Izbrana vzorca in kontrola so imeli negativne koncentracije IFX. Povprečen delež pravilnosti  $\pm$  SD pri dodatku koncentracije 5  $\mu\text{g/mL}$  je bil  $98,6 \pm 4,3$  %, pri dodatku 10  $\mu\text{g/mL}$  pa  $104,4 \pm 12,3$  %, kar prikazuje preglednica VII.

**Preglednica VI: Pravilnost hišne IFX-ELISA določena z metodo dodatka pri uporabi sekundarnega anti-IgG<sup>AP</sup>**

Vzorec	Brez dodatka ( $\mu\text{g/mL}$ )	Dodatek 5 $\mu\text{g/mL}$ IFX ( $\mu\text{g/mL}$ )	Delež pravilnosti (%)	Dodatek 10 $\mu\text{g/mL}$ IFX ( $\mu\text{g/mL}$ )	Delež pravilnosti (%)
Kontrola	0,00	6,01	120,2	9,60	96,0
Vzorec 1	0,14	5,45	109,0	9,05	90,5
Vzorec 2	0,07	6,56	131,2	9,22	92,2
<b>Delež pravilnosti (%) +/- SD(%)</b>			<b>120,1 +/- 11,2</b>		<b>92,9 +/- 2,8</b>

**Preglednica VII: Pravilnost hišne IFX-ELISA določena z metodo dodatka pri uporabi sekundarnega anti-IFX<sup>HRP</sup>**

<b>Vzorec</b>	<b>Brez dodatka (µg/kmL)</b>	<b>Dodatek 5 µg/mL IFX (µg/mL)</b>	<b>Delež pravilnosti (%)</b>	<b>Dodatek 10 µg/mL IFX (µg/mL)</b>	<b>Delež pravilnosti (%)</b>
Kontrola	0,10	4,92	98,4	9,39	93,9
Vzorec 1	0,01	4,72	94,4	10,13	101,3
Vzorec 2	0,10	5,15	103,0	11,79	117,9
<b>Delež pravilnosti (%)±SD(%)</b>			<b>98,6 ± 4,3</b>		<b>104,4 ± 12,3</b>

*4.1.4 Analizna občutljivost*

Analizno občutljivost smo ovrednotili z LOD in LOQ.

Analizna občutljivost je bila pri uporabi sekundarnega anti-IgG<sup>AP</sup> določena na vzorcih desetih zdravih krvodajalcev. LOD je bila 0,18 µg/mL, LOQ pa 0,48 µg/mL. Pri določanju analizne občutljivosti z uporabo sekundarnega anti-IFX<sup>HRP</sup> je bila LOD 0,17 µg/mL in LOQ 0,31 µg/mL. Testiranje smo opravili na petnajstih vzorcih zdravih krvodajalcev.

*4.1.5 Analizna specifičnost*

Z obema različicama hišne IFX ELISA smo testirali 5 vzorcev bolnikov na terapiji z adalimumabom in 5 RF pozitivnih vzorcev. Metoda z uporabo sekundarnega anti-IgG<sup>AP</sup> ni specifična, saj smo dobili pozitivne vrednosti serumskih koncentracij pri vzorcih bolnikov na terapiji z adalimumabom. RF pozitivni vzorci so bili negativni. Metoda z uporabo sekundarnega anti-IFX<sup>HRP</sup> je specifična, saj so bili rezultati na vzorcih bolnikov na terapiji z adalimumabom in RF pozitivnimi vzorci pod LOQ.

#### 4.1.6 Linearnost

Pri testu linearnosti hišne metode smo pripravili redčitve vzorca od 1:100 do 1:6400. Redčili smo z 1 % BSA/PBS. Izmerili smo koncentracijo pri vsaki redčitvi in jo pomnožili s faktorjem redčenja ter na podlagi pričakovane vrednosti določili delež pravilnosti (%). Rezultati, ki smo jih dobili pri testu s sekundarnim anti-IgG<sup>AP</sup> so prikazani v preglednici VIII, rezultati dobljeni s sekundarnim anti-IFX<sup>HRP</sup> pa v preglednici IX.

**Preglednica VIII: Linearnost hišne IFX-ELISA pri uporabi sekundarnega anti-IgG<sup>AP</sup>**

<b>Faktor redčitve</b>	<b>Izmerjena konc. (µg/mL)*faktor redčitve</b>	<b>Pričakovane vrednosti (µg/mL)</b>	<b>Delež pravilnosti (%)</b>
<b>1:100</b>	10,94	10,94	<b>100</b>
<b>1:200</b>	10,98	10,94	<b>100,4</b>
<b>1:400</b>	10,50	10,94	<b>96,0</b>
<b>1:800</b>	9,78	10,94	<b>89,4</b>
<b>1:1600</b>	10,79	10,94	<b>98,7</b>
<b>1:3200</b>	10,74	10,94	<b>98,2</b>
<b>1:6400</b>	10,41	10,94	<b>95,2</b>

**Preglednica IX: Linearnost hišne IFX-ELISA pri uporabi sekundarnega anti-IFX<sup>HRP</sup>**

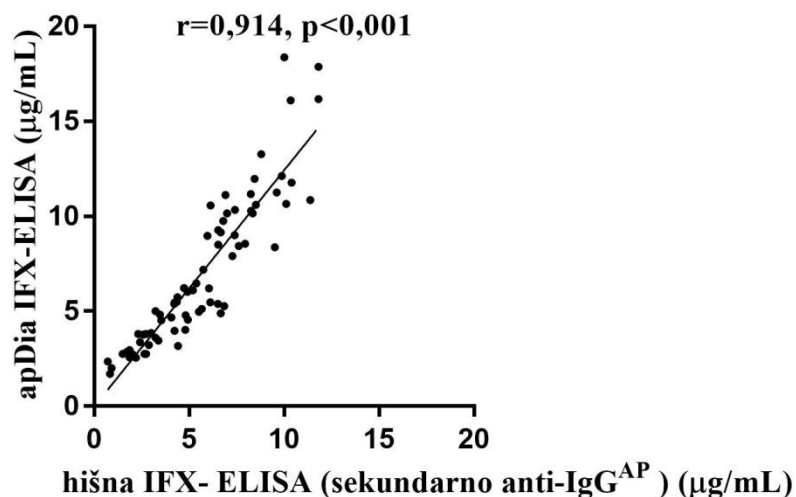
<b>Faktor redčitve</b>	<b>Izmerjena konc. (µg/mL)*faktor redčitve</b>	<b>Pričakovana koncentracija (µg/mL)</b>	<b>Delež pravilnosti (%)</b>
<b>1:50</b>	23,61	23,61	<b>100</b>
<b>1:100</b>	24,15	23,61	<b>102,3</b>
<b>1:200</b>	22,20	23,61	<b>94,0</b>
<b>1:400</b>	20,27	23,61	<b>85,85</b>
<b>1:800</b>	20,51	23,61	<b>86,87</b>
<b>1:1600</b>	24,95	23,61	<b>105,7</b>
<b>1:3200</b>	27,93	23,61	<b>118,3</b>

**4.2 PRIMERJAVA REZULTATOV HIŠNE IFX-ELISA Z REZULTATI ANALIZNEGA KOMPLETA apDia**

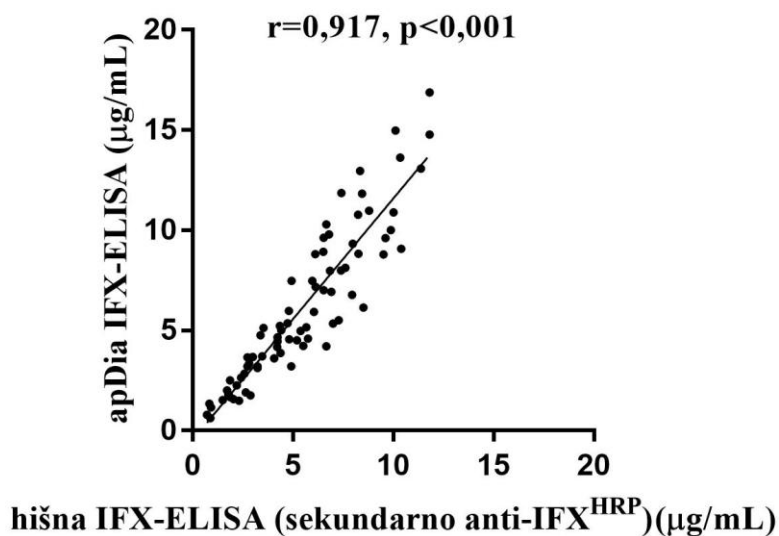
*4.2.1 Pearsonov koeficient korelacije*

Primerjali smo rezultate vseh analiziranih vzorcev na kompletu apDia z rezultati, ki smo jih na istih vzorcih dobili s pomočjo dveh različic hišne IFX-ELISA. Izračunali smo Pearsonov koeficient korelacije, ker so bili podatki normalno porazdeljeni. Pri primerjavi s hišno metodo z uporabo nespecifičnega sekundarnega anti-IgG<sup>AP</sup> je bil Pearsonov koeficient 0,914 ( $p < 0,001$ ), pri primerjavi s hišno metodo, kjer je bilo sekundarno protitelo specifično anti-IFX<sup>HRP</sup> pa 0,917 ( $p < 0,001$ ). Rezultati so prikazani na slikah 4 in 5.





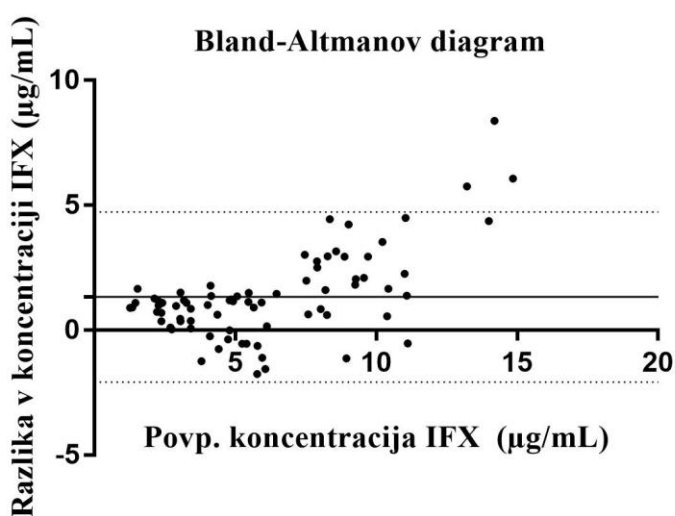
**Slika 4:** Korelacija med rezultati analiznega kompleta apDia in rezultati hišne metode z uporabo sekundarnega anti-IgG<sup>AP</sup>. Osi predstavljajo koncentracijo IFX podano v µg/mL. *Enačba 6:* enačba regresijske premice:  $y = 1,243x - 0,007$



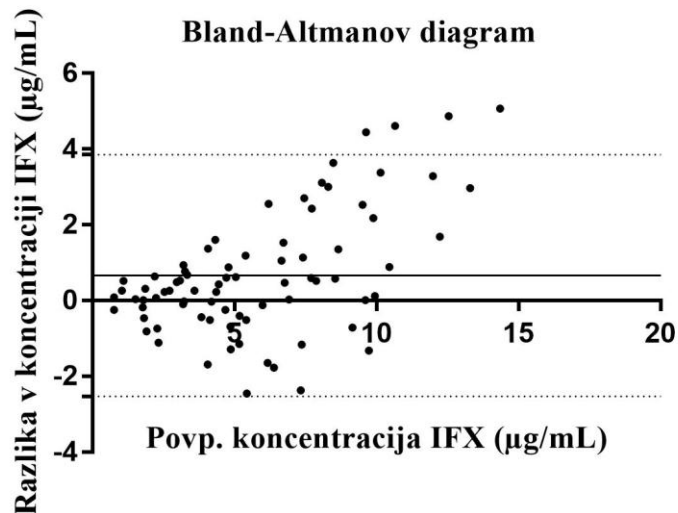
**Slika 5:** Korelacija med rezultati analiznega kompleta apDia in rezultati hišne metode z uporabo sekundarnega anti-IFX<sup>HRP</sup>. Osi predstavljajo koncentracijo IFX podano v µg/mL. *Enačba 7:* enačba regresijske premice:  $y = 1,204x - 0,457$

#### 4.2.2 Povprečna razlika v koncentraciji med rezultati

Izračunali smo povprečno razliko v koncentraciji med rezultati obeh metod. Pove nam kolikšna je povprečna razlika med meritvami koncentracije izvedenih s hišno IFX-ELISA proti apDia IFX-ELISA. Povprečna razlika v koncentraciji je pri primerjavi hišne IFX-ELISA, kjer smo uporabili sekundarno anti-IgG<sup>AP</sup> znašala 1,33  $\mu\text{g/mL}$  (95 % interval zaupanja -2,082 - 4,733). Pri uporabi sekundarnega anti-IFX<sup>HRP</sup> je bila povprečna razlika 0,66  $\mu\text{g/mL}$  (95% interval zaupanja -2,527 - 3,850). Rezultati so prikazani v obliki Bland-Altmanovega diagrama na slikah 6 in 7.



**Slika 6: Bland-Altmanov diagram povprečne razlike v koncentraciji med rezultati pridobljenimi z analiznim kompletom apDia in hišno IFX-ELISA z uporabo sekundarnega anti-IgG<sup>AP</sup>.** Na grafu je povprečna razlika ponazorjena s polno črto. Os x prikazuje povprečno koncentracijo IFX obeh metod v  $\mu\text{g/mL}$ , os y pa razlike v izmerjeni koncentraciji pri hišni IFX-ELISA glede na apDia IFX-ELISA ( $\mu\text{g/mL}$ ). Pikčasti črti ponazarjata 95 % interval zaupanja.



**Slika 7: Bland-Altmanov diagram povprečne razlike v koncentraciji med rezultati pridobljenimi z analiznim kompletom apDia in hišno IFX-ELISA z uporabo sekundarnega anti-IFX<sup>HRP</sup>. Povprečna razlika je ponazorjena s črto. Os x prikazuje povprečno koncentracijo IFX obeh metod v µg/mL, os y pa razlike v izmerjeni koncentraciji pri hišni IFX-ELISA glede na apDia IFX-ELISA (µg/mL). Pikčasti črti ponazarjata 95 % interval zaupanja.**

#### 4.2.3 Koeficient ICC

Koeficient ICC je pri primerjavi rezultatov dobljenih s pomočjo analiznega kompleta apDia s hišno IFX-ELISA z uporabo sekundarnega anti-IgG<sup>AP</sup> zasedel vrednost 0,873 (95 % interval zaupanja 0,808 - 0,917). Pri primerjavi rezultatov apDia IFX-ELISA s hišno IFX-ELISA z uporabo sekundarnega anti-IFX<sup>HRP</sup> je bila vrednost ICC koeficienta 0,884 (95 % interval zaupanja 0,824 - 0,924).

#### 4.2.4 Pravilnost uvrščanja v določeno skupino

Glede na serumsko koncentracijo IFX smo bolnike razvrstili v 4 skupine, v skladu s priporočili (41,42): koncentracija pod 0,50 µg/mL, med 0,50 in 3,00 µg/mL, med 3,00 in 7,00 µg/mL in nad 7,00 µg/mL. Preverili smo, kolikšen je odstotek ujemanja pri tej razvrstitvi med rezultati apDia IFX-ELISA in hišno IFX-ELISA, torej pravilnost uvrščanja v skupine. Pri primerjavi s hišno metodo s sekundarnim anti-IgG<sup>AP</sup> je bilo ujemanje 79 %, pri primerjavi s hišno metodo s sekundarnim anti-IFX<sup>HRP</sup> pa 80 %. Rezultati so prikazani v

preglednicah X in XI, ki prikazujeta koliko od skupno 90 vzorcev bolnikov se razvrsti v določeno skupino pri posamezni metodi in koliko vzorcev se pri razvrščanju ujema.

**Preglednica X: Pravilnost uvrščanja v določeno skupino pri hišni IFX-ELISA z uporabo sekundarnega anti-IgG<sup>AP</sup> glede na apDia IFX-ELISA**

		apDia IFX ELISA (µg/mL)				Število vzorcev
		<0.50	0.50-3.00	3.00-7.00	>7.00	
Hišna IFX ELISA (µg/mL)	<0.50	7	0	0	0	7
	0.50-3.00	2	13	0	0	15
	3.00-7.00	0	8	26	0	34
	>7.00	0	0	9	25	34
Število vzorcev		9	21	35	25	90

**Preglednica XI: Pravilnost uvrščanja v določeno skupino pri hišni IFX-ELISA z uporabo anti-IFX<sup>HRP</sup> glede na apDia IFX-ELISA**

		apDia IFX ELISA (µg/mL)				Število vzorcev
		<0.50	0.50-3.00	3.00-7.00	>7.00	
Hišna IFX ELISA (µg/mL)	<0.50	9	0	0	0	9
	0.50-3.00	0	16	0	0	16
	3.00-7.00	0	5	25	3	33
	>7.00	0	0	10	22	32
Število vzorcev		9	21	35	25	90

Pri primerjavi apDia IFX-ELISA s hišno IFX-ELISA je v primeru uporabe sekundarnega anti-IgG<sup>AP</sup> koeficient kappa znašal 0,794 (95 % interval zaupanja 0,706 - 0,881), pri uporabi sekundarnega anti-IFX<sup>HRP</sup> pa 0,808 (95 % interval zaupanja 0,721 - 0,895).

## 5. RAZPRAVA

Zdravljenje vnetnih revmatičnih in kroničnih vnetnih črevesnih bolezni še vedno ni optimizirano, zato v veliko primerih ni učinkovito, velika je tudi nevarnost za nastanek neželenih stranskih učinkov. Spremljanje koncentracije biološkega zdravila daje koristne informacije, ki so ključne pri prilagoditvi terapije posamezniku, ob pravem času, kar je temelj bolniku prijazne medicine. Obstajajo različne metode za merjenje koncentracije IFX v serumu, ki pa se med seboj razlikujejo v občutljivosti in specifičnosti. Prav tako ni na voljo referenčne metode na katero bi se lahko oprli pri postavitvi hišne metode. Analizni kompleti so zelo dragi, hišna metoda pa nam, poleg tega, da je cenejša, omogoča tudi boljši nadzor nad reagenti, neodvisnost od dobaviteljev in večjo fleksibilnost. Pri postavitvi metode je zelo pomembno, da daje dolgoročno primerljive rezultate, zato smo hišno metodo za detekcijo IFX najprej ovrednotili, nato pa rezultate primerjali z rezultati dobljenimi s pomočjo analiznega kompleta apDia. Pokazali smo, da je hišna IFX-ELISA natančna, točna, linearna, v primeru uporabe sekundarnega anti-IFX<sup>HRP</sup> pa tudi specifična. Rezultati, ki smo jih dobili pri primerjavi z apDia IFX-ELISA kažejo na močno povezanost metod, dokazali pa so tudi njihovo ponovljivost in zanesljivost.

### 5.1 OVREDNOTENJE HIŠNE IFX-ELISA

Ovrednotili smo natančnost hišne IFX-ELISA. Pri izračunu znotraj-analizne natančnosti smo upoštevali 20 % KV. Pri obeh različicah hišne IFX-ELISA smo dosegli dobro natančnost znotraj analize. Povprečne variabilnosti je v prvem primeru znašalo 6,6 % (sekundarno anti-IgG<sup>AP</sup>), v drugem pa 10,8 % (sekundarno anti-IFX<sup>HRP</sup>), torej lahko za hišno IFX-ELISA metodo trdimo, da je natančna. Znotraj-analizno ponovljivost pri analiznem kompletu apDia, s katerim smo nadalje primerjali našo metodo, so določili na 21 vzorcih. Povprečen KV je znašal 5,5 %. Vrednosti so podane v protokolu analiznega kompleta.

Med-analizno variabilnost smo izračunali na podlagi izmerjenih koncentracij dveh pozitivnih kontrol. Prva kontrola je bil srednje pozitiven (1-3 µg/mL), druga pa visoko pozitiven vzorec bolnika (7-9 µg/mL) na terapiji z IFX. Pri vsaki meritvi smo tema kontrolama določili koncentracijo in izračunali KV% med paralelkami. Povprečni KV% mora biti pod 20 %, da dosežemo dobro med-analizno natančnost. Povprečni KV% izračunan na podlagi vseh analiz, ki smo jih ocenili kot uspešne, je bil za pozitivno kontrolo 1 13,8 %, za pozitivno kontrolo 2 pa 16,8 %, pri hišni metodi z uporabo

sekundarnega anti-IgG<sup>AP</sup>. Povprečen KV% za obe kontroli je znašal 15,3 %. Pri uporabi sekundarnega anti-IFX<sup>HRP</sup> je znašal ta odstotek za pozitivno kontrolo 1 15,3 %, za pozitivno kontrolo 2 11,7 %, povprečen KV% za obe kontroli pa 13,5 %. Pri med-analizni ponovljivosti je odstotek nekoliko višji, saj je težko pri vsaki analizi ustvariti popolnoma enake pogoje. Razlikuje se lahko temperatura, čas inkubacije, priprava pufra za redčenje in spiralnega pufra. Opazimo lahko, da ni bistvenih razlik pri uporabi različnih sekundarnih protiteles. Pri obeh različicah hišne IFX-ELISA smo dosegli primerljivo natančnost, s KV% pod 20 %. Med-analizno ponovljivost pri analiznem kompletu apDia so določili na 15 vzorcih pri petih meritvah. Povprečni KV je znašal 5,8 %. Te podatke najdemo v protokolu analiznega kompleta.

Točnost hišne metode smo opredelili s pomočjo metode dodatka. Za dokazovanje točnosti smo izbrali dva vzorca in kontrolo s koncentracijo pod LOQ. Vsakemu od njih smo dodajali znano koncentracijo IFX in izmerili njeno končno vrednost. Dodani koncentraciji sta bili 5 µg/mL in 10 µg/mL. Izračunali smo pričakovano vrednost, delež pravilnosti in SD. Povprečna vrednost deleža pravilnosti mora zasesti vrednosti med 80 in 120 %. Povprečna vrednost deleža pravilnosti ± SD za sekundarno anti-IgG<sup>AP</sup> pri dodatku 5 µg/mL je znašala 120,1 ± 11,2 %. To je nad priporočeno mejo 120 %, zato točnosti ne moremo potrditi. Pri dodatku 10 µg/mL je 92,9 ± 2,8 %, kar je znotraj meja in lahko rečemo, da je metoda točna. Pri uporabi sekundarnega anti-IFX<sup>HRP</sup> smo ob dodatku 5 µg/mL analita dobili vrednost deleža pravilnosti ± SD 98,6 ± 4,3 % ter pri dodatku 10 µg/mL vrednost 104,4 ± 12,3 %. Rezultati se nahajajo znotraj določenega območja.

Ovrednotili smo tudi analizno občutljivost in sicer s pomočjo LOD in LOQ na vzorcih seruma zdravih krvodajalcev. Pomembno je, da je LOQ ustrezno nizka, da omogoča ustrezno klinično ovrednotenje rezultatov.

Pri vsaki analizi smo določili vrednost slepemu vzorcu, ki smo mu dodali vse elemente razen seruma. Na mikrotitrsko ploščico smo ga v dvojniku nanesti na dve različni mesti. Služil je kot ozadje. Povprečje meritev slepega vzorca smo odšteli vsem absorbancom vzorcev, standardov in kontrol. Vedno smo analizirali tudi negativno kontrolo. To je bil negativen vzorec bolnika, s serumsko koncentracijo pod 0,50 µg/mL. Standarde smo pri izvedbi hišne metode pripravili z redčenjem zdravila Remsima<sup>TM</sup>, ki vsebuje IFX in ima podano koncentracijo. Na podlagi izmerjenih koncentracij standardov smo izrisali

umeritveno krivuljo. LOD in LOQ pri hišni metodi s sekundarnim anti-IgG<sup>AP</sup> sta zasedli vrednosti 0,18 µg/mL in 0,48 µg/mL, izračunani pa sta bili iz nabora vzorcev desetih zdravih krvodajalcev. Pri uporabi sekundarnega anti-IFX<sup>HR</sup> je bila LOD 0,17 µg/mL in LOQ 0,31 µg/mL, določeni na podlagi vzorcev petnajstih zdravih krvodajalcev. LOQ je v obeh primerih dovolj nizka, da omogoča ustrezno klinično ovrednotenje rezultatov. LOD pri analiznem kompletu apDia je nižja od 1 ng/mL, pri redčitvi 1:100 to ustreza 0,1 µg/mL. Te podatke lahko najdemo v protokolu analiznega kompleta.

Izmerjene koncentracije vzorcev bolnikov smo razdelili v štiri skupine, pri čemer so v prvo skupino spadali vzorci s koncentracijo nižjo od 0,50 µg/mL, kar pomeni, da je hišna IFX-ELISA ustrezno občutljiva, saj v obeh različicah zazna nižje koncentracije.

Preverili smo tudi analizo specifičnost s testiranjem vzorcev bolnikov na terapiji z adalimumabom in testiranjem vzorcev bolnikov s pozitivnim RF. Specifična metoda je zagotovilo, da ne bo prišlo do reakcije s snovmi v serumu, ki jih ne ugotavljamo, ampak samo z določevano komponento, v našem primeru z IFX. Ugotovili smo, da je hišna IFX-ELISA, pri kateri smo uporabili sekundarno anti-IgG<sup>AP</sup> nespecifična, saj je do reakcije prišlo pri vzorcih bolnikov na terapiji z IFX, kot tudi pri vzorcih bolnikov na terapiji z adalimumabom. Do reakcije je prišlo, ker je adalimumab rekombinantno človeško monoklonsko protitelo IgG1. Pri bolnikih s pozitivnim RF, ki niso na terapiji z IFX smo dobili negativen rezultat. Metoda z uporabo sekundarnega anti-IFX<sup>HRP</sup> pa je analizo specifična, saj je prišlo do reakcije le pri bolnikih na terapiji z IFX. Od obeh različic hišne metode je torej slednja bolj uporabna, saj daje rezultate le, če je v serumu prisoten IFX. Na analiznem kompletu apDia so preskušali analizo specifičnost za IFX na 72-ih vzorcih seruma zdravih krvodajalcev. Ta je bila 100 %, saj do reakcije ni prišlo pri nobenem od vzorcev, ki niso vsebovali IFX. Preverili so tudi morebitne druge interference na 30 vzorcih; vzorci, ki vsebujejo proti mišjim protitelesom usmerjena človeška protitelesa, pozitivni, lipemični vzorci, vzorci s povišanim bilirubinom, s povišanim holesterolom, hemolizirani vzorci in vzorci, odvzeti v času prvega meseca nosečnosti. Z opazovanimi faktorji ni bilo zaznane interakcije. Ti podatki o specifičnosti apDia IFX-ELISA so navedeni v protokolu analiznega kompleta.

Določili smo tudi linearnost hišne IFX-ELISA. Linearnost analizne metode je pomembna, saj nam pove natančnost metode pri različnih stopnjah redčenja analita. Pripravili smo



redčitve z 1 % BSA/PBS pufrom in sicer: 1:50 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 in 1:6400. Pri vsaki redčitvi smo izmerili koncentracijo in jo pomnožili s faktorjem redčitve. S pomočjo pričakovane vrednosti smo nato izračunali delež pravilnosti v odstotkih. Delež pravilnosti mora zasesti vrednosti med 80 in 120 %. Rezultati pri uporabi obeh sekundarnih protiteles so bili znotraj tega območja. Ker ni bilo odstopanj, lahko pri obeh različicah potrdimo linearnost hišne IFX-ELISA.

## **5.2 PRIMERJAVA REZULTATOV HIŠNE IFX-ELISA Z apDia IFX-ELISA**

Rezultate, ki smo jih dobili s hišno IFX-ELISA smo primerjali z rezultati, ki smo jih dobili s pomočjo analiznega kompleta apDia, ki je bil razvit v sodelovanju z univerzo v Leuvenu. ApDia IFX-ELISA uporablja visoko specifično monoklonsko protitelo usmerjeno proti IFX, klon 6B7. Pri vsaki analizi apDia IFX-ELISA smo preverili ustreznost izvedene ELISA, upoštevati pa smo morali spodaj našteje kriterije, da je bila analiza zanesljiva, rezultati pa veljavni.

- Standard 120 (120 ng/mL) mora imeti  $OD_{450} > 1,400$ .
- Standard 0 (0 ng/mL) mora imeti  $OD_{450} < 0,080$ .
- Pozitivna kontrola 1 mora biti znotraj predpisanega območja: 2 - 4  $\mu\text{g/mL}$ .
- Pozitivna kontrola 2 mora biti znotraj predpisanega območja: 5 - 10  $\mu\text{g/mL}$ .

V primeru, da pogoji niso bili izpolnjeni, smo morali test ponoviti. Če ima standard 0  $OD_{450} > 0,080$ , je spiranje nezadostno, test pa je bilo potrebno ponoviti z večjim številom spiranj ali daljšim časom spiranja.

Merjenje serumskih koncentracij IFX je zelo pomembno, saj morajo biti te zadostne za farmakološki učinek zdravila. Koncentracijo IFX določamo v vzorcu bolnika, ki ga vzamemo tik pred sledečim odmerkom zdravila in če je ta dovolj visoka, je navadno povezana z dobrim odzivom bolnika na zdravljenje. Pomembna je tudi določitev koncentracije ADA, kadar je koncentracija IFX nizka oz. se pri rednih kontrolah niža, da lahko pravočasno zaznamo sekundarno odpoved in terapijo ustrezno prilagodimo posamezniku. Za primerjavo rezultatov, ki jih daje hišna metoda za detekcijo IFX v serumu bolnika, smo izbrali analizni komplet apDia.

Moč povezanosti dveh spremenljivk smo določili s Pearsonovim koeficientom korelacije. Uporablja se, kadar so rezultati normalno porazdeljeni. V našem primeru pove, kako dobro se rezultati, ki smo jih dobili pri izvedbi hišne IFX-ELISA, ujemajo z rezultati dobljenimi pri izvedbi apDia IFX-ELISA. Ko smo pri hišni metodi uporabili sekundarno anti-IgG<sup>AP</sup>, je bil Pearsonov koeficient korelacije  $r = 0,914$  ( $p < 0,001$ ). P vrednost nam pove kolikšna je statistična značilnost povezave dveh spremenljivk. V našem primeru je  $p < 0,001$ , kar pomeni, da lahko z zelo veliko gotovostjo posplošimo rezultate z vzorca na populacijo (33). Ko smo uporabili sekundarno anti-IFX<sup>HRP</sup>, je bil Pearsonov koeficient  $r = 0,917$  ( $p < 0,001$ ). Ker  $r$  v obeh primerih zaseda vrednost med 0,90 in 0,99, velja zelo močna povezanost med spremenljivkama. Iz tega podatka lahko vidimo, da daje hišna IFX-ELISA zelo primerljive rezultate glede na apDia IFX-ELISA. V protokolu analiznega kompleta se nahaja tudi podatek o primerjavi rezultatov apDia IFX-ELISA z IFX-ELISA, ki je bila razvita na univerzi v Luevenu in na osnovi katere je bil razvit analizen komplet apDia IFX-ELISA za detekcijo IFX. Izračunan Pearsonov koeficient korelacije je bil med 0,95 in 0,97.

Za vsak vzorec smo določili tudi koliko se izmerjena koncentracija s hišno metodo razlikuje s podatkom o koncentraciji, ki smo ga dobili s pomočjo apDia IFX-ELISA. Na koncu smo izračunali povprečno razliko v koncentraciji pri obeh variantah hišne metode glede na apDia IFX-ELISA. Upoštevali smo 95 % interval zaupanja, kar pomeni, da se v tem območju z 95 % verjetnostjo nahaja ocenjevani parameter. Stopnja tveganja je 5 %. Povprečna razlika v koncentraciji hišne IFX-ELISA z uporabo sekundarnega anti-IgG<sup>AP</sup> glede na apDia IFX-ELISA je bila 1,33  $\mu\text{g/mL}$  (95 % interval zaupanja -2,082 - 4,733). Večinoma ta razlika ni bila terapevtsko pomembna, je pa prišlo v nekaterih primerih do razvrstitve določenega bolnika v različno skupino pri hišni metodi in pri apDia IFX-ELISA. Odstotek pri katerem se pojavljajo razlike smo ovrednotili v nadaljevanju naloge. Pri hišni metodi, ki je vključevala sekundarno anti-IFX<sup>HRP</sup>, je bila povprečna razlika v koncentraciji glede na apDia IFX-ELISA 0,66  $\mu\text{g/mL}$  (95 % interval zaupanja -2,527 - 3,850). Tudi pri tej primerjavi je v podobnem odstotku prišlo do razvrščanja bolnikov v drugo skupino glede na apDia IFX-ELISA. V povprečju daje hišna metoda za navedeno koncentracijo višje rezultate od analiznega kompleta apDia.

Izračunali smo tudi ICC koeficient, pri katerem smo prav tako upoštevali 95 % interval zaupanja, za statistično pomembno vrednost smo privzeli  $p < 0,05$ . Pri primerjavi hišne IFX-

ELISA s sekundarnim anti-IgG<sup>AP</sup> z apDia IFX-ELISA je bila vrednost ICC koeficienta 0,873 (95 % interval zaupanja 0,808 - 0,917). Pri uporabi sekundarnega anti-IFX<sup>HRP</sup> pa je bil določen ICC koeficient 0,884 (95 % interval zaupanja 0,824 - 0,924). V obeh primerih gre za popolno ujemanje oziroma skladnost rezultatov, glede na lestvico po Landisu in Kochu. Torej lahko trdimo, da so rezultati, ki smo jih dobili pri primerjavi metod, popolnoma zanesljivi.

Nazadnje smo določili tudi pravilnost uvrščanja v štiri skupine. Prvo so sestavljali bolniki s serumsko koncentracijo IFX nižjo od 0,50 µg/mL (negativni vzorci), drugo tisti, s koncentracijo med 0,50 in 3,00 µg/mL, v tretjo smo umestili bolnike s koncentracijo med 3,00 in 7,00 µg/mL in v četrto tiste, ki so imeli serumsko koncentracijo biološkega zdravila nad 7,00 µg/mL. Razdelitev v skupine je pomembna, ker zajame določeno območje koncentracije v kateri se nahaja posamezen vzorec. Pogoji detekcije IFX namreč niso vedno popolnoma enaki, zato se tudi pojavlja variabilnost med analizami. Skozi čas lahko spremljamo, ali je določen bolnik kljub tem nihanjem še zmeraj znotraj iste skupine ali ne. V slednjem primeru je potrebna prilagoditev terapije. Serumsko koncentracija, ki mora biti dosežena, da zdravljenje kroničnih vnetnih črevesnih bolezni opredelimo kot uspešno, je med 3,00 in 7,00 µg/mL. Pri nižjih koncentracijah oziroma negativnem rezultatu (1., 2. skupina) je velika možnost nastanka ADA, zato je zelo pomembna pravilna umestitev bolnikov zlasti v prvo skupino. Pri primerjavi apDia IFX-ELISA s hišno IFX-ELISA (sekundarno anti-IgG<sup>AP</sup>) smo analizirali 90 vzorcev. V prvo skupino (serumska koncentracija IFX <0,50 µg/mL) smo na podlagi apDia IFX-ELISA razvrstili 9 vzorcev, pri hišni metodi pa 7 vzorcev, kar pomeni, da sta bila dva vzorca uvrščena v drugo skupino (serumska koncentracija IFX med 0,50 in 3,00 µg/mL). V drugo skupino je bilo na podlagi apDia IFX-ELISA razvrščenih 21 vzorcev, pri hišni IFX-ELISA pa 15, od tega dva vzorca, ki bi morala glede na apDia IFX-ELISA spadati v prvo skupino. Osem vzorcev, ki jih je apDia IFX-ELISA razvrstila v to skupino, je tako pri hišni IFX-ELISA padlo v tretjo skupino (serumska koncentracija IFX med 3,00 in 7,00 µg/mL), ki je obsegala 34 vzorcev bolnikov. Pri testiranju z analiznim kompletom apDia je bilo v to skupino razvrščenih 35 vzorcev. Lahko vidimo, da je hišna IFX-ELISA v zadnjo, četrto skupino (serumska koncentracija IFX nad 7,00 µg/mL) razvrstila 9 vzorcev, ki bi morali biti v tretji skupini. V slednjo skupino je tako apDia IFX-ELISA umestila 25 vzorcev, hišna IFX-ELISA pa 34 vzorcev. Na podlagi zgornjih rezultatov je pravilnost uvrščanja bolnika v eno od štirih

skupin pri hišni IFX-ELISA z uporabo sekundarnega anti-IgG<sup>HRP</sup> 79 % glede na apDia IFX-ELISA.

Tudi pri primerjavi hišne metode z uporabo sekundarnega anti-IFX<sup>HRP</sup> z apDia IFX-ELISA smo analizirali 90 vzorcev. V prvo skupino (pod 0,50 µg/mL) smo tako v primeru hišne IFX-ELISA metode kot tudi apDia IFX-ELISA metode umestili 9 vzorcev bolnikov. To pomeni, da je pravilnost uvrščanja v prvo skupino 100 %. Pri teh bolnikih je rezultat detekcije IFX v serumu negativen, to pomeni, da so potrebni nadaljnji testi za detekcijo ADA. Da hišna metoda pravilno uvrsti bolnike v prvo skupino, je pomembno tudi z ekonomskega vidika, da bolniki niso na dragi, a neučinkoviti terapiji. Na podlagi testiranja s hišno IFX-ELISA je bilo v drugi skupini 16 vzorcev, pri testiranju z analiznim kompletom apDia pa 21. Lahko vidimo, da je bilo 5 vzorcev pri hišni metodi razvrščenih v višje koncentracijsko območje, torej v tretjo skupino. V tej skupini je bilo sicer 33 vzorcev, pri apDia IFX-ELISA pa 35. Ker bi glede na apDia IFX ELISA moralo 5 vzorcev spadati v tretjo skupino, je 7 vzorcev, ki naj bi glede na analizni komplet apDia spadali v tretjo skupino pri hišni metodi, znotraj četrte skupine. V zadnji skupini je pri hišni IFX-ELISA 7 vzorcev, pri apDia IFX-ELISA pa 25. Pravilnost uvrščanja v štiri vnaprej določene skupine serumskih koncentracij IFX je bila pri hišni metodi z uporabo sekundarnega anti-IFX<sup>HRP</sup> 80 % glede na apDia IFX-ELISA.

Pri obeh različicah hišne metode je odstotek pravilnosti uvrščanja bolnika v določeno skupino glede na apDia IFX-ELISA visok in zelo podoben. Različna razvrstitev bolnikov med metodami se je pojavila predvsem pri bolnikih, ki so imeli serumsko koncentracijo IFX blizu meje med različnimi skupinami. Kot lahko vidimo iz rezultatov povprečne razlike v koncentraciji med hišno IFX-ELISA in apDia IFX-ELISA, daje hišna IFX-ELISA nekoliko višje rezultate. Preko štirih skupin serumskih koncentracij IFX formiranih v okviru te magistrske naloge lahko vidimo, koliko bolnikov ima zelo nizko koncentracijo IFX, pod 0,50 µg/mL, kjer je velika verjetnost nastanka ADA, posebno če ne gre za začetni odmerek zdravila ampak redno kontrolo. Zato je zelo pomembna pravilnost uvrščanja v prvo skupino, ki je bila 100 % pri hišni IFX-ELISA, kjer smo uporabili sekundarno anti-IFX<sup>HRP</sup>.

Pri izračunu Kappa koeficienta smo upoštevali 95 % interval zaupanja. Kappa koeficient je merilo ponovljivosti pri primerjavi dveh metod. Dobili smo naslednja rezultata: 0,794

(95 % interval zaupanja 0,706 - 0,881) pri uporabi sekundarnega anti-IgG<sup>AP</sup> in 0,808 (95% interval zaupanja 0,721 - 0,895) pri uporabi specifičnega, sekundarnega anti-IFX<sup>HRP</sup>. Glede na lestvico po Landisu in Kochu lahko vidimo, da smo v obeh primerih dosegli odlično ujemanje, torej odlično ponovljivost.

## 6. SKLEP

Po analizi laboratorijskega dela smo pri magistrski nalogi prišli do naslednjih sklepov:

- Hišna metoda na trdnem nosilcu pri uporabi dveh različnih sekundarnih protiteles je natančna (KV pod 20 %).
- Hišna IFX-ELISA, kjer smo uporabili sekundarno anti-IFX<sup>HRP</sup>, je analizno specifična.
- Analizna točnost opredeljena z metodo dodatka je bila pri uporabi obeh detekcijskih protiteles med 80 % in 120 % (delež pravilnosti), razen v primeru dodatka 5 µg/mL pri hišni metodi s sekundarnim anti-IgG<sup>AP</sup>, kjer je preseгла to mejo. V tem primeru je bil povprečni delež pravilnosti ± SD enak 120,1 ± 11,2 %.
- Potrdili smo linearnost hišne metode pri uporabi dveh različnih sekundarnih protiteles. Delež pravilnosti je bil znotraj meja 80 – 120 %.
- Obe različici hišne IFX-ELISA sta ustrezno občutljivi.
- Pri primerjavi obeh različic hišne IFX-ELISA z rezultati apDia IFX-ELISA znaša Pearsonov koeficient med 0,90 in 0,99 ( $p < 0,001$ ), kar pomeni zelo močno povezanost med spremenljivkama.
- V povprečju daje hišna metoda pri kateri smo uporabili sekundarno anti-IgG<sup>AP</sup> za 1,33 µg/mL višje rezultate glede na rezultate dobljene z analiznim kompletom apDia. Hišna metoda pri kateri smo uporabili specifično sekundarno anti-IFX<sup>HRP</sup>, daje v povprečju za 0,66 µg/mL višje rezultate.
- Glede na koeficient ICC so dobljeni rezultati primerjav popolnoma zanesljivi, glede na koeficient Kappa pa odlično ponovljivi.
- Pravilnost uvrščanja bolnika v eno od štirih skupin glede na serumsko koncentracijo IFX je bila pri hišni metodi z uporabo sekundarnega anti-IgG<sup>AP</sup> 79 % glede na apDia IFX-ELISA, pri hišni metodi z uporabo specifičnega sekundarnega anti-IFX<sup>HRP</sup> pa 80 %. Pravilnost uvrščanja v prvo skupino (pod 0,50 µg/mL) je bila pri slednji 100 %, kar je zelo pomembno, saj je pri negativnih vzorcih potrebna nadaljnja določitev ADA.
- Hišna metoda IFX-ELISA z uporabo specifičnega sekundarnega anti-IFX<sup>HRP</sup>, ki se ga uporablja kot detekcijski sistem, je bolj primerna za detekcijo IFX z vidika analitske specifičnosti, saj onemogoča detekcijo adalimumaba.

## 7. LITERATURA

1. Štrukelj B, Kos J, Jeras M, Kocbek P, Bratkovič T, Premuš Marušič A, Laptoš T: Biološka zdravila; Spletni učbenik za študente farmacije, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2015: 7-15, 31-51
2. Vozelj M: Temelji imunologije, Državna založba Slovenije, Ljubljana, 2000: 47-120, 239-258
3. Flaherty K. D: Immunology for pharmacy, Elsevier Mosby, Missouri, 2012: 70-86, 102-109, 181-188
4. Kleiner G, Marcuzzi A, Zanin V, Monasta L, Zauli G: Cytokine levels in the serum of healthy subjects, Mediators of Inflammation, ID 434010, v.2013, 2013: 1-6
5. Plevy ES, Landers LC, Prehn J, Carramanzana MN, Deem LR, Shealy D, Targan RS: A role for TNF- $\alpha$  and mucosal T helper-1 cytokines in the pathogenesis of Crohn's disease, J Immunol, 1997, 159: 6276-6282.
6. Weinberg JM, Buchholz R: TNF-alpha inhibitors, Birkhäuser Verlag, Basel, 2006: 1-8, 65-82, 115-128
7. Tartaglia LA, Weber RF, Figari IS, Reynolds C, Palladino MA, Goeddel D: The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, 88(20): 9292-9296
8. Košnik M: Interna medicina, 1. izdaja, Državna založba Slovenije, Ljubljana, 1993: 879- 946
9. de Lange KM, Barrett JC: Understanding inflammatory bowel disease via immunogenetics, J Autoimmun, 2015, 64: 91-100
10. Ogrič M, Praprotnik S, Sodin-Šemrl S, Čučnik S: Imunogenost zaviralcev tumor nekrotizirajočega dejavnika – alfa: nevarnost ali priložnost na področju vnetnih revmatičnih bolezni?, Farmaceutski vestnik, 2016, 67: 405-411
11. Štrukelj B, Kos J: Biološka zdravila: od gena do učinkovine, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana 2007: 4-24, 532-578
12. Wild D: The Immunoassay handbook, Third edition, Elsevier, 2005: 103-119, 144-154
13. Bendtzen K: Anti-TNF- $\alpha$  biotherapies: perspectives for evidence-based personalized medicine, Immunotherapy, 2012, 4(11): 1167-1179
14. [http://www.ema.europa.eu/docs/sl\\_SI/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000240/WC500050888.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/sl_SI/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000240/WC500050888.pdf) (25.9.2017)

15. Castele VN: Assays for measurement of TNF antagonists in practice, *Frontline Gastroenterol*, 2016, 0: 1-7
16. Bendtzen K: Immunogenicity od anti-TNF- $\alpha$  biotherapies: I. Individualized medicine based on immunopharmacological evidence, *Front Immunol*, 2015, 6: 152
17. Bendtzen K: Immunogenicity of anti-TNF- $\alpha$  biotherapies: II. Clinical relevance of method used for anti-drug antibody detection, *Front Immunol*, 2016, 6: 109
18. Ogrič M, Terčelj M, Praprotnik S, Tomšič M, Božič B, Sodin-Šemrl S, Čučnik S: Detection of adalimumab and anti-adalimumab antibodies in patients with rheumatoid arthritis: a comprehensive overview of methodology pitfalls and benefits, *Immunologic research*, 2017, 65: 172-185
19. <http://www.sinobiological.com/indirect-elisa.html> (30.11.2017)
20. <http://www.sinobiological.com/sandwich-elisa.html> (30.11.2017)
21. Steenholdt C: Use of infliximab and anti-infliximab antibody measurements to evaluate and optimize efficacy and safety of infliximab maintenance therapy in Chron's disease, *Dan Med J*, 2013, 60(4): B4616
22. Huber L: Validation of analytical methods, Agilent Technologies, Germany, 2010: 4-40
23. Jacobsen RH: Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases, OIE Terrestrial Manual, 2017: 1-17
24. Andreasson U, Perret-Liaudet A, van Waalwijk van Doorn LJC, Blennow K, Chiasserini D, Engelborghs S, Fladby T, Genc S, Kruse N, Kuiperij HB, Kulic L, Lewczuk P, Mollenhauer B, Mroczko B, Parnetti L, Vanmechelen E, Verbeek MM, Winbald B, Zetterberg H, Koel-Simmelink M, Teunissen CE: A practical guide to immunoassay method validation, *Front Neurol*, 2015, 6:179
25. ICH Q2A Guideline, Validation of analytical methods definitions and terminology. ICH Guidelines 2005, 68-70
26. ICH Q2B Guideline, Validation of analytical procedures methodology. ICH Guidelines, 2005, 71-76
27. Kotnik V: Imunološki priročnik, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani – Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Ljubljana, 2010: 120-140
28. Johnson R: Assessment of bias with emphasis on method comparison, *Clin Biochem Rev*, 2008, 29: 37-42



29. Saah J. A, Hoover R. D: »Sensitivity« and »specificity« reconsidered: the meaning of these terms in analytical and diagnostic settings, *Ann Intern Med*, 1997, 126: 91-94
30. Thompson M, Ellison L. R. S, Wood R: Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis, *Pure Appl Chem*, 2002, 74(5): 835-855
31. <https://www.thermofisher.com/ng/en/home/life-science/protein-biology/protein-assays-analysis/elisa/elisa-kits/elisa-validation-quality-testing.html>(20.9.2017)
32. [http://www.apdiagroup.com/files/ifu/710001\\_IFU\\_IFX\\_96T-vs05-15.pdf](http://www.apdiagroup.com/files/ifu/710001_IFU_IFX_96T-vs05-15.pdf) (25.9.2017)
33. ApDia infliximab ELISA, ref.: 710001, EN ISO 13485, 2012
34. <https://www.peprotech.com/recombinant-human-tnf-> (25.9.2017)
35. Adamič Š: Temelji biostatistike, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani – Inštitut za biomedicinsko informatiko, Ljubljana, 1995: 116-120
36. Dowdy S, Wearden S, Chilko D: *Statistics for Research*, Third edition, John Wiley&Sons Inc., Hoboken, 2004: 211-223, 238-250
37. van Emden HF: *Statistics for terrified biologists*, Blackwell Publishing, 2008: 238-266
38. Fleiss JL, Cohen J: The equivalence of weighted kappa and the intraclass correlation coefficient as measures of reliability, *Educ Psychol Meas*, 1973, 33: 613-619
39. Bland JM, Altman DG: A note on the use of the intraclass correlation coefficient in the evaluation of agreement between two methods of measurement, *Comput Biol Med*, 1990, 20: 337-340
40. McHugh ML: Interrater reliability: the kappa statistic, *Biochem Med*, 2012, 22(3): 276-282
41. Steenholdt C, Bendtzen K, Brynskov J, Thomsen OØ, Ainsworth MA: Measurement of infliximab and anti-infliximab antibody levels can help distinguish maintenance versus loss of response, *Gastroenterol Hepatol (NY)*, 2012, 8(2): 131-134
42. Castele NV, Ferrante M, Van Assche G, Ballet V, Compennolle G, Van Steen K, Simoens S, Rutgeerts P, Gills A, Vermeire S: Trough concentrations of infliximab guide dosing for patients with inflammatory bowel disease, *Gastroenterol*, 2015, 148: 1320-1329