

## VSEBINA

<b>POVZETEK</b> .....	<b>4</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>5</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV</b> .....	<b>7</b>
<b>1 UVOD</b> .....	<b>8</b>
1.1 PROTITELESA.....	8
1.1.1 <i>Specifičnost vezave antigen-protitelo</i> .....	9
1.1.2 <i>Avtoimunski odziv</i> .....	9
1.2 ANTIFOSFOLIPIDNI SINDROM IN ANTIFOSFOLIPIDNA PROTITELESA ....	9
1.2.1 <i>Patofiziološka vloga aPL</i> .....	12
1.3 PROTROMBIN .....	12
1.4 ANTIPROTROMBINSKA PROTITELESA .....	13
1.5 IMUNSKI TESTI NA TRDNEM NOSILCU .....	16
1.5.1 <i>Encimsko imunski testi na trdnem nosilcu</i> .....	16
1.6 OPREDELITEV PARAMETROV VREDNOTENJA METOD IN REZULTATOV .....	17
1.7 PRAŽNE VREDNOSTI .....	19
<b>2 NAMEN DELA</b> .....	<b>20</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE</b> .....	<b>21</b>
3.1 HUMANI VZORCI .....	21
3.2 STANDARDI .....	21
3.2.1 <i>Interni standardi</i> .....	21
3.3 ANTIGEN .....	22
3.4 MIKROTITRSKE PLOŠČE.....	22
3.5 KEMIKALIJE .....	22
3.6 PUFRI IN RAZTOPINE.....	24
3.7 APARATURE IN PRIBOR.....	25
3.8 IMUNSKÉ METODE NA TRDNEM NOSILCU .....	26
3.8.1 <i>Modificirana metoda ELISA za določanje aPS/PT (aPS/PT ELISA)</i> .....	26

3.8.2	<i>Osnovna metoda ELISA za določanje aPT-A (aPT-A ELISA)</i> .....	26
3.9	ENAČBE ZA RAČUNANJE PARAMETROV VREDNOTENJA METODE IN REZULTATOV .....	27
3.10	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV .....	27
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b> .....	<b>29</b>
4.1	VARIABILNOST ZNOTRAJ ANALIZE .....	29
4.2	VARIABILNOST MED ANALIZAMI .....	30
4.3	STANDARDNA KRIVULJA .....	31
4.4	DOLOČANJE PRAŽNIH VREDNOSTI .....	31
4.4.1	<i>Frekvenčna porazdelitev vseh izmerjenih vrednosti pri zdravi populaciji</i> .....	32
4.4.2	<i>Statistični podatki izmerjenih absorbanc in pripadajočih arbitrarnih enot pri zdravi populaciji</i> .....	33
4.5	DOLOČANJE PROTITELES PROTI PROTROMBINU PRI RAZLIČNIH SKUPINAH BOLNIKOVA .....	35
4.5.1	<i>Antifosfolipidni sindrom</i> .....	35
4.5.2	<i>Sistemski lupus eritematosus</i> .....	35
4.5.3	<i>Revmatoidni artritis</i> .....	36
4.5.4	<i>Sjögrenov sindrom</i> .....	36
4.6	PREVALENCA PROTITELES PROTI PROTROMBINU PRI RAZLIČNIH SKUPINAH BOLNIKOVA .....	37
4.6.1	<i>Prevalenca aPS/PT</i> .....	37
4.6.2	<i>Prevalenca aPT-A</i> .....	38
4.7	PRIMERJAVA METODE APS/PT Z METODO APT-A .....	38
4.7.1	<i>Parametri vrednotenja rezultatov posamezne metode: diagnostična občutljivost in specifičnost, pozitivna in negativna napovedana vrednost</i> .....	38
4.7.2	<i>Korelacija rezultatov metod aPS/PT in aPT-A</i> .....	40
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA</b> .....	<b>42</b>
5.1	VREDNOTENJE METODE .....	42
5.1.1	<i>Variabilnost znotraj analize in med analizami</i> .....	42
5.2	DOLOČANJE PRAŽNIH VREDNOSTI .....	43

5.3	PREVALENCA PROTITELES PROTI PROTROMBINU PRI RAZLIČNIH SKUPINAH BOLNIKOV .....	46
5.4	DIAGNOSTIČNA OBČUTLJIVOST IN SPECIFIČNOST .....	47
5.4.1	<i>Ocena pozitivne in negativne napovedane vrednosti .....</i>	<i>47</i>
5.4.2	<i>Korelacija metod aPS/PT in aPT-A.....</i>	<i>48</i>
<b>6</b>	<b>SKLEP .....</b>	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>50</b>

## POVZETEK

Protitelesa proti protrombinu (aPT) spadajo v skupino antifosfolipidnih protiteles (aPL). aPL so heterogena družina protiteles, ki so povezana z arterijskimi in venskimi trombozami ter izgubami plodu. Kombinacijo vsaj ene od teh bolezenskih manifestacij in povišane ravni aPL, določenih kot antikardiolipinska protitelesa (aCL), lupusni antikoagulantni (LA) in protitelesa proti  $\beta_2$ -glikoproteinu I ( $\alpha\beta_2$ GPI) v krvi imenujemo antifosfolipidni sindrom (APS). V zadnjem času se povečuje zanimanje za aPT kot potencialne kazalce za APS, vendar zanje še ni veljavne standardizirane metode.

Namen diplomske naloge je primerjava dveh encimsko imunskih metod in ugotavljanje klinične uporabnosti dobljenih rezultatov. Pri prvi metodi smo za antigen uporabili protrombin vezan na mikrotitrsko ploščico z visoko afiniteto vezave (aPT-A ELISA), pri drugi metodi je antigen predstavljal kompleks fosfatidilserin-protrombin (aPS/PT ELISA).

Dobro postavljena in izvedena metoda je osnovni pogoj za nadaljnje vrednotenje rezultatov, zato smo posamezno metodo najprej ovrednotili. Pri obeh metodah smo dosegli ustrezno ponovljivost za oba razreda protiteles – variabilnost med analizami je med 7% in 13%. Na osnovi 99. percentila izmerjenih absorbanca krvodajalcev smo določili prazne vrednosti za IgG in IgM aPS/PT in aPT-A. Za lažjo interpretacijo pozitivnih rezultatov smo prazne vrednosti z matematično korekcijo poenotili, tako da so vsi rezultati višji od 5 arbitrarnih enot predstavljali pozitiven rezultat.

Testirali smo bolnike z različnimi avtoimunskimi boleznimi in potrdili, da so aPS/PT in aPT-A statistično značilno pogosteje prisotna pri bolnikih z APS v primerjavi z drugimi skupinami bolnikov in zdravimi krvodajalci ( $p < 0,01$ ). Protitelesa aPT, določena z aPS/PT ELISA ali aPT-A ELISA, smo dokazali pri 59,6% bolnikih z APS. Pomembno je, da je bila prevalenca aPS/PT (58,6%) znatno višja v primerjavi z aPT-A (25,3%) pri bolnikih z APS. Diagnostična specifičnost je pri obeh metodah primerljiva, medtem ko so občutljivost ter pozitivna in negativna napovedna vrednost veliko boljše pri metodi aPS/PT. Pokazali smo tudi, da bi občutljivejša aPS/PT metoda lahko uspešno nadomestila metodo aPT-A, in da z obema metodama ne določamo domnevno različnih populacij protiteles.

Na podlagi naših rezultatov lahko povzamemo, da je metoda aPS/PT v primerjavi z metodo aPT-A primernejša in daje uporabne rezultate za diagnostiko APS.

## **ABSTRACT**

Antiprothrombin antibodies (aPT) belong to the group of antiphospholipid antibodies (aPL). The aPL constitute a heterogeneous family of antibodies, which are associated with arterial and venous thromboses and recurrent fetal losses. Combination of at least one of these pathological manifestations and elevated levels of aPL, detected as anticardiolipin antibodies (aCL), lupus anticoagulant (LA) and antibodies against  $\beta_2$ -glycoprotein I (a $\beta_2$ GPI) in the blood is called antiphospholipid syndrome (APS). The interest in the aPT as potential indicators of APS has been increasing, but there is no valid standardized test yet for the detection of aPT.

The thesis is intended to compare two enzyme immunoassays, and to determine the clinical significance of the results obtained thereof. In the first method, prothrombin was used as the antigen and was bound to a high-binding microtiter plate (aPT-A ELISA), while in the second, the antigen was represented by a fosfstidilserin-prothrombin complex (aPS/PT ELISA).

As a well-placed and executed method is a prerequisite for further evaluation of the results, evaluation of each method was carried out initially. For both methods, a satisfactory reproducibility was achieved for both classes of antibodies - variability analysis is between 7% and 13%. Absorbances of healthy blood donors were measured, and – based on the 99th percentile – cut off values for IgG and IgM aPS/PT and aPT-A were determined. To facilitate interpretation of the positive results, cut-off values were unified using mathematical correction, so that any result higher than 5 arbitrary units represents a positive result.

We tested patients with various autoimmune diseases and confirmed that statistically the aPS/PT and aPT-A are significantly more frequently present in patients with APS compared with other groups of patients and healthy blood donors ( $p < 0,01$ ). The aPT determined by the aPS/PT ELISA or aPT-A ELISA, were identified in 59,6% of patients with APS. It is important that the prevalence of aPS/PT (58,6%) is significantly higher compared with the aPT-A (25,3%) in patients with APS. The diagnostic specificity of results, obtained by either method is comparable, while the aPS/PT method gives results of better diagnostic sensitivity and positive and negative predictive values. We also showed

that the more sensitive aPS/PT method could successfully replace the aPT-A method, and that the methods does not determine two allegedly different populations of antibodies.

Based on our results we can conclude that the aPS/PT method, as compared to the aPT-A one, is more suitable and gives more useful results for the diagnosis of the APS.

## SEZNAM OKRAJŠAV

a $\beta_2$ GPI - protitelesa proti  $\beta_2$ -glikoproteinu I

aCL - protitelesa proti kardiolinu

aCL/ $\beta_2$ GPI-ELISA - encimsko imunska metoda, pri katerih določamo od  $\beta_2$ GPI odvisna aCL

aPL - antifosfolipidna protitelesa

aPS/PT - od fosfatidilserina odvisna protitelesa proti protrombinu

aPT - antiprotrombinska protitelesa

aPT-A - antiprotrombinska protitelesa, usmerjena proti samemu protrombinu

APS - antifosfolipidni sindrom

AUG - arbitrarne enote za IgG

AUM - arbitrarne enote za IgM

BSA - goveji serumski albumin

$\beta_2$ GPI -  $\beta_2$ -glikoprotein I

CV - koeficient variabilnosti

DEA - dietanolaminski pufer

ELISA - encimsko imunska metoda na trdnem nosilcu

IgG - imunoglobulini razreda G

IgM - imunoglobulini razreda M

LA - lupusni antikoagulant

RA - revmatoidni artritis

SD - standardni odklon

SjS - Sjögrenov sindrom

SLE - sistemski lupus eritematozus

TBS - s Tris (3-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiol) pufrana fiziološka raztopina

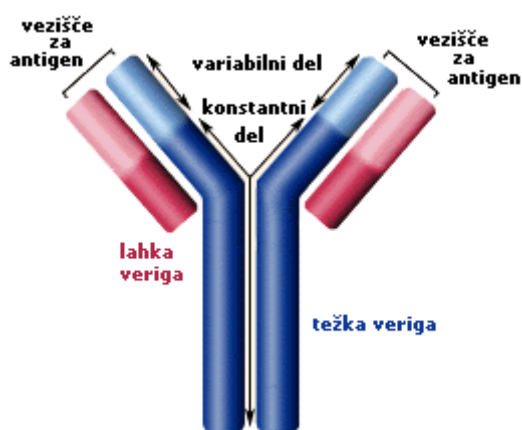
PBS - fosfatno pufrana slanica

# 1 UVOD

## 1.1 PROTITELESA

Protitelesa, imenovana tudi imunoglobulini, so pomemben sestavni del imunskega sistema. So glikoproteini, ki ščitijo organizem pred tujki, saj so se sposobni vezati na tujke in s tem preprečiti njihovo škodljivo delovanje. Tujke predstavljajo povzročitelji bolezni, nelastne beljakovine ali druge molekule, ki jih organizem prepozna kot potencialno nevarne. Imunoglobulini so prisotni tako na površini limfocitov B, kjer so receptorji za specifične antigene ali kot krožeča protitelesa v krvi ter limfni tekočini. Učinkujejo na več načinov: vežejo se na različne celice imunskega sistema, preprečujejo prehajanje virusov v celice, nevtralizirajo bakterijske toksine in aktivirajo komplement (1).

Protitelesa se sintetizirajo v belih krvnih celicah imenovanih limfociti B. Osnovna monomerna molekula protitelesa je sestavljena iz štirih polipeptidov, in sicer iz dveh identičnih lahkih in dveh identičnih težkih verig (Slika 1). Te so med seboj povezane s kovalentnimi disulfidnimi vezmi in razporejene v obliki črke Y. Poznamo 2 tipa lahkih ( $\lambda$ ,  $\kappa$ ) in 5 tipov težkih verig ( $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  in  $\mu$ ). Glede na tip težke verige razvrstimo imunoglobuline v 5 razredov: IgG z verigo  $\gamma$ , IgM z verigo  $\mu$ , IgA z verigo  $\alpha$ , IgD z verigo  $\delta$  in IgE z veriga  $\epsilon$ . Na vsaki verigi ločimo konstantni in variabilni del. Variabilni del sestavlja približno 110 aminokislin, nahaja se na koncu vsake lahke in težke verige ter predstavlja vezišče za antigen. Tu je aminokislinsko zaporedje najbolj spremenljivo



Slika 1: Zgradba osnovne monomerne molekule protitelesa

in zaradi svoje raznolikosti omogoča imunskemu sistemu sintezo protiteles za katerikoli antigen in s tem specifično vezavo protitelesa samo na določen antigen. Poleg variabilnega dela ima vsaka veriga še konstantni del, ki se razlikuje pri različnih razredih protiteles (2).

Osnovno molekulo protitelesa je s papainom mogoče razcepiti v tri približno enake fragmente. Dva od teh sta identična ( $F_{ab}$  fragmenta) in predstavljata vezišče za antigen, saj se v tem delu nahaja variabilni del. Tretji fragment, imenovan  $F_c$ , se ne more vezati z antigenom, ima pa efektorske funkcije, ki so značilne za posamezen razred protiteles (2).



### *1.1.1 SPECIFIČNOST VEZAVE ANTIGEN-PROTITELO*

Protitelesa se z antigeni vežejo preko različnih nekovalentnih vezi (vodikove, elektrostatske, Van der Waalsove in hidrofobne interakcije). Vezišče antigena imenujemo epitop, vezišče protitelesa pa paratop. Jakost vezave enega epitopa s pripadajočim paratopom imenujemo afiniteta. Osnovna monomerna enota protiteles (2 lahki in 2 težki verigi) ima dve enaki vezišči, zato se lahko protitelo hkrati veže na dve antigenski determinanti. Jakost vseh vezi med protitelesom in antigenom pa opredeljuje pojem avidnost. Paratopi prepoznavajo celotno trodimenzionalno strukturo epitopov in razlikujejo že v majhnih spremembah aminokislinskega zaporedja antigenov, naboja, optične konfiguracije in sterične konformacije. Zaradi tega se protitelesa vežejo le na tiste antigene, s katerimi se najbolj skladajo, kar je bistven razlog za visoko specifičnost protiteles (1).

### *1.1.2 AVTOIMUNSKI ODZIV*

Avtoimunost je reakcija imunskega sistema proti lastnemu organizmu, ki je posledica porušenja mehanizmov, ki vzdržujejo neodzivnost do telesu lastnih antigenov. Pride do imunskega odziva na lastne antigene, nastajati začnejo avtoprotitelesa. Majhne količine avtoprotiteles nastajajo tudi v normalnih razmerah med imunskim odzivom, vendar so ta navadno šibko afinitetna in ne povzročajo okvar tkiva. Zato avtoimunske odzive še ne pomeni avtoimunske bolezni. Avtoimunske bolezni nastanejo šele, ko avtoimunske reakcije povzročijo patološko okvaro tkiva, do katere pa pride, če nastane velika količina močno afinitetnih protiteles (2, 3).

## 1.2 ANTIFOSFOLIPIDNI SINDROM IN ANTIFOSFOLIPIDNA PROTITELESA

Antifosfolipidni sindrom (APS) je avtoimunska motnja, ki je bila prvič opisana leta 1983 (4). Označujejo jo mednarodno sprejeti klinični in laboratorijski kriteriji (5, 6). Med klinične kriterije spadajo žilne tromboze (arterij, ven ali malega žilja v katerem koli organu) ter nosečniški zapleti (nepojasnjene smrti fetusa, prezgodnja rojstva, nerazložljivi zaporedni spontani splavi). Laboratorijski kriterij vključuje prisotnost antifosfolipidnih protiteles (aPL), določenih kot protitelesa proti kardiolipinu (aCL), lupusni antikoagulant (LA) ali protitelesa proti  $\beta_2$ -glikoproteinu I ( $\alpha\beta_2$ GPI), ki morajo biti pozitivna vsaj dvakrat

zapored, v razmaku več kot 12 tednov. Za postavitev diagnoze APS zadošča prisotnost vsaj enega kliničnega in vsaj enega laboratorijskega kriterija (5, 6).

Pri bolnikih z APS so poleg karakterističnih kliničnih motenj, ki opredeljujejo APS, poročali tudi o drugih, zelo raznolikih kliničnih motnjah, ki pa še niso vključena v merila za APS. Nekatere izmed teh so: trombocitopenija, hemolitična anemija, bolezni srčne zaklopke, predhodne ishemije, kap, transverzalna mielopatija, mielitis, horea, livedo retikularis, migrena in kognitivne disfunkcije (7). APS se lahko pojavi v odsotnosti drugih bolezni (primarni APS) ali hkrati z drugo avtoimunsko boleznijo, najpogosteje je to sistemski lupus eritematozus (SLE) (sekundarni APS) (8).

Antifosfolipidna protitelesa so velika in heterogena družina avtoprotiteles. Vežejo se na negativno nabite fosfolipide, komplekse fosfolipid-protein in/ali na določene plazemske proteine, ki se vežejo s fosfolipidi (9). Najprej so mislili, da aPL prepoznavajo epitope na anionskih in nevtralnih fosfolipidih (kardiolipin, fosfatidilserin, fosfatidilholin, fosfatidiletanolamin), od koder tudi izhaja njihovo ime (10). Vendar so kasneje ugotovili, da s trombotičnimi spremembami povezana aPL, ne vežejo direktno anionskih fosfolipidov, ampak so usmerjena proti plazemskim proteinom, ki imajo visoko afiniteto vezave za anionske fosfolipide, oziroma proti kompleksom fosfolipid-protein (9). V zadnjih nekaj letih so odkrili številna protitelesa proti različno lipidno-proteinskim kompleksom in sestavinam endotelnijskih celic (11). Najpogostejši antigenski tarči teh protiteles sta  $\beta_2$ -glikoprotein I ( $\beta_2$ GPI) in protrombin, ostali so visoko in nizko molekularni kinogeni, aneksin V, aktiviran protein C, protein S in fosfolipaza A<sub>2</sub>. Te molekule pogosto zasledimo pod imenom »antifosfolipidni kofaktorji« (11). aPL, ki se vežejo direktno na fosfolipide, so prisotna pri infekcijah in v glavnem niso povezana s trombozami (7).

Protitelesa aPL nastanejo kot posledica avtoimunskih procesov, kadar telo napačno prepozna fosfolipide ali beljakovine, vezane na fosfolipide, kot tuje snovi in začne izdelovati protitelesa proti njim. Večina teh antigenov je vključenih v proces strjevanja krvi, zato nekatera aPL ovirajo delovanje koagulacijskega sistema, s čimer lahko pojasnimo visoko stopnjo tromboz pri bolnikih z APS (8).

Med najbolj poznanimi aPL so aCL in LA, ki so bila prva vključena v laboratorijska merila za APS (5). aCL določamo z encimskoimunskimi metodami, LA pa s pomočjo fosfolipidno odvisnih testov koagulacije (12). Kasneje so bila odkrita še a $\beta_2$ GPI in antiprotrombinska protitelesa (aPT), ki imajo tudi aktivnost LA. Oboja se določajo z encimsko imunskimi metodami, vendar so bila nedavno samo a $\beta_2$ GPI dodatno vključena v laboratorijske kriterije za postavitev diagnoze APS (6). aCL so skupina antigeno nedefiniranih protiteles, ki predstavljajo tveganje za nastanek tromboemboličnih zapletov. Najbolj raziskan protein, ki ima epitope za vezavo aCL, je  $\beta_2$ GPI. Epitopi na proteinu se izpostavijo in omogočijo vezavo aCL šele s konformacijsko spremembo  $\beta_2$ GPI, do katere pride, ko se  $\beta_2$ GPI veže na anionske fosfolipide (najpogosteje kardiolipin). V *in vitro* testih do take konformacijske spremembe pride po vezavi  $\beta_2$ GPI na fosfolipid, ki je predhodno imobiliziran na polistirensko ploščo (npr. kardiolipin pri aCL/ $\beta_2$ GPI-ELISA), ali pa z nanosom antigena  $\beta_2$ GPI na negativno nabito površino t.i. plošče z visoko afiniteto vezave (13).

Protitelesa aCL, ki za svojo vezavo na kardiolipin ne potrebujejo kofaktorja in se pojavljajo prehodno, so opredeljena kot netrombogena aCL. Značilna so za infekcijska obolenja (sifilis, tuberkuloza, gobavost, hepatitis A in druge) in ne predstavljajo tveganja za pojav kliničnih znakov povezanih z APS, predvsem tromboz. aCL določamo z encimsko imunsko metodo, pri kateri pred nanosom preiskovanega seruma, testne plošče z nanosenim kardiolipinom, inkubiramo še z raztopino, ki vsebuje mešanico serumskih proteinov, med katerimi je tudi  $\beta_2$ GPI. Medtem ko določamo a $\beta_2$ GPI na testnih ploščah z visoko afiniteto vezave, pri katerih je  $\beta_2$ GPI vezan na površino brez prisotnosti fosfolipidov (14, 15, 16).

LA so protitelesa, ki v *in vitro* testih delujejo kot pridobljeni inhibitorji koagulacije. Določamo jih s testi koagulacije, odvisnimi od fosfolipidov. Na proces koagulacije vplivajo preko lipidno vezanega proteina, ki predstavlja kofaktor pri aktivnosti LA. Najpomembnejša kofaktorja sta  $\beta_2$ GPI in protrombin (17). Nedavni podatki kažejo, da tudi nekateri specifični testi ELISA za aPL lahko služijo za potrditev prisotnosti aktivnosti LA (13).

### *1.2.1 PATOFIZIOLOŠKA VLOGA aPL*

Najprej ni bilo popolnoma jasno, ali so aPL vzrok nekaterih sistemskih bolezni vezivnega tkiva, njihova posledica ali samo njihovi spremljevalci. Nekatere študije govore v prid vzročni vlogi aPL v številnih kliničnih motnjah (11). Splošno je sprejeto, da imajo aPL patogeno vlogo pri nastanku APS (18).

Povišano raven aPL najdemo pri:

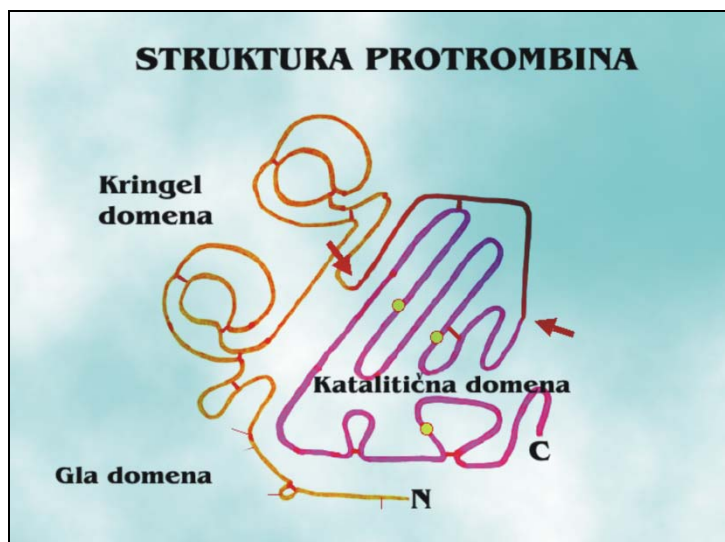
1. bolnikov z APS;
2. bolnikov z drugimi avtoimunskimi motnjami (npr. SLE);
3. bolnikov s sifilisom ali drugimi infekcijami;
4. bolnikov z malignimi obolenji (kot klinične motnje povezane s povišanim titrom aPL so največkrat opažene ponavljajoče se tromboze);
5. bolnikov, ki jih zdravimo z nekaterimi zdravili; hidralazin, prokainamid, fenotiazini, etosukcimid, klortiazid in peroralni kontraceptivi lahko povzročijo lupusni sindrom. Natančneje, nekatera od njih lahko povzročijo samo produkcijo aPL brez kliničnih znakov, spet druga pa še trombotične zaplete;
6. zdravih posameznikov, večinoma tu opazamo malo povišane ravni aPL, s starostjo se pojavljajo nekoliko pogosteje.

Protitelesa, ki jih določamo pri tretji in šesti skupini, so neškodljiva za organizem, saj so prisotna le začasno in niso povezana s kliničnimi težavami, povezanimi z APS (pregled v 19).

### 1.3 PROTROMBIN

Protrombin je od vitamina K odvisna beljakovina, ki se sintetizira v jetrih. V krvni obtok se sprosti kot enoverižni glikoprotein, sestavljen iz 579 aminokislinskih ostankov, z molekulsko maso 72 kDa. V plazmi je normalno prisoten v koncentraciji ~100 g/L. Med biosintezo v jetrih je protrombin podvržen  $\gamma$ -karboksilaciji. To je od vitamina K odvisna karboksilacija ostankov glutaminske kisline v  $\gamma$ -karboksi ostanke glutamata. Ti  $\gamma$ -karboksi glutamatski ostanki, znani kot Gla domena, so bistvenega pomena za od kalcija odvisno

vezavo protrombina na fosfolipide. Ta vezava je potrebna za pretvorbo protrombina v biološko aktiven trombin. Gla domeni sledita še kringel domena, ki vsebuje dve krožni strukturi in katalitična domena serinske proteaze (Slika 2).



Slika 2: Struktura protrombina (19)

Protrombin, poznan tudi kot faktor II, je pomemben faktor v verižni reakciji strjevanja krvi. Fiziološko se aktivira s protrombinaznim kompleksom, ki nastane, ko se aktiviran faktor X ob prisotnosti  $\text{Ca}^{2+}$  združi s faktorjem V in fosfolipidi. Ko se protrombin veže na negativno nabite fosfolipide, ga kompleks protrombinaze pretvori v trombin, ki nato sproži polimerizacijo fibrinogena v fibrin. Ta je končni proizvod strjevanja krvi. V normalnih okoliščinah se protrombin spremeni v trombin samo takrat, ko pride do poškodbe tkiva in/ali krvožilnega sistema, zato fibrin in krvni strdki ne nastajajo, razen kot odziv na krvavitev. Trombin sekundarno veže trombomodulin na površini endotelijskih celic in aktivira protein C, ki nato doseže svojo antikoagulantno aktivnost, s tem da razgradi faktor V in onemogoči kompleks protrombinaza. Zaradi te negativne povratne zanke protrombin/trombin deluje tudi kot "posredni" antikoagulant (17, 20, 21).

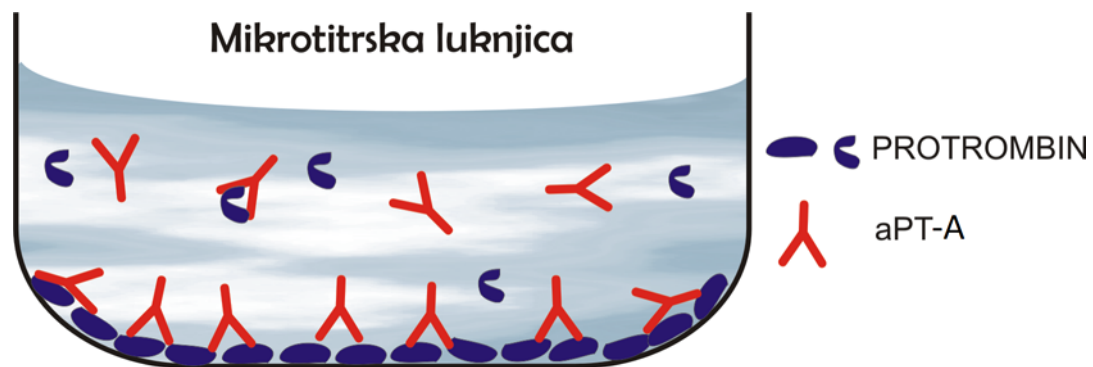
#### 1.4 ANTIPROTROMBINSKA PROTITELESA

aPT so heterogena družina protiteles, ki spadajo v skupino aPL. Prvi jih je odkril Bajaj s sodelavci (22) pri dveh bolnikih z LA in hipotrombinemijo, kasneje je Edson (23) našel komplekse protrombin/antiprotrombin (aPT/PT) v plazmi bolnikov z aktivnostjo LA, vendar brez hujših hipotrombinemij. Fleck (24) je te ugotovitve potrdil in razširil, ter s tem dokazal, da imajo aPT aktivnost LA. Poleg  $\beta_2$ GPI je protrombin največkrat določen kofaktor LA v serumih bolnikov s SLE in/ali APS.

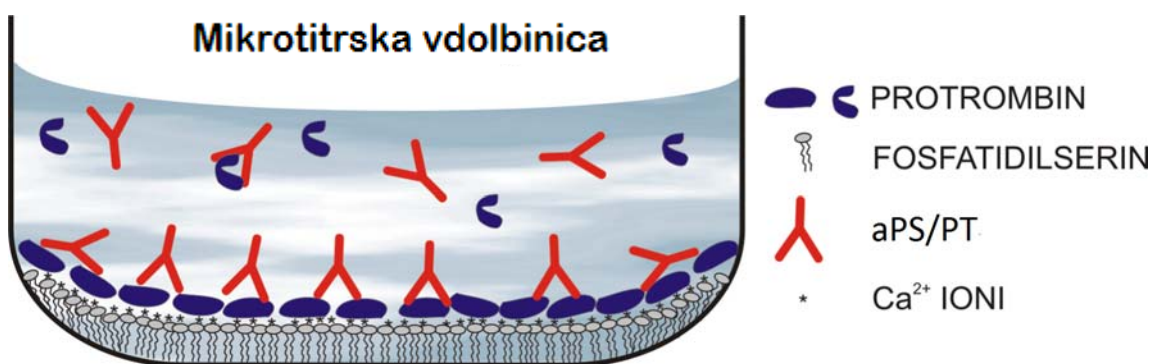
Za določanje aPT sta bili prvi uporabljeni tehniki dvojna imunodifuzija in navzkrižna imunoelektroforeza (22, 23, 24). Njuna glavna prednost je bila možnost določanja imunskih kompleksov aPT s protrombinom. Pomankljivost teh metod je, da nista uporabni za kvantifikacijo protiteles, saj je v večini primerov titer in afiniteta aPT prenizka, da bi dala jasne precipitacijske linije. Naslednje uporabljene tehnike so temeljile na oslabitvi protrombinske aktivnosti po vezavi z aPT (25, 26). Vendar so zaradi potrebe po izolaciji aPT in očiščenju faktorjev strjevanja krvi te metode neprimerne za rutinsko delo (8, 20).

Danes najbolj uporabljene tehnike določanja aPT so različne ELISA metode. Omogočajo hitro določitev titra in izotipa aPT. Zanimivo je, da način predstavitve protrombina na trdnem nosilcu močno vpliva na njegovo prepoznavo s strani aPT. aPT se vežejo na protrombin, imobiliziran na  $\gamma$ -obsevanih ali na PVC mikrotitrskih ploščah z visoko afiniteto vezave (Slika 3), medtem ko se na protrombin, nanesen na navadne polistirenske mikrotitrške plošče, aPT ne vežejo (8). Kasneje so bila odkrita še protitelesa proti kompleksu fosfatidilserin-protrombin. Tudi ta protitelesa določamo z ELISA metodo, pri kateri predhodno na mikrotitrsko ploščico imobiliziramo fosfatidilserin in šele nato naneseemo protrombin (13) (Slika 4).

## **Mikrotitrška vdolbinica**



Slika 3: Vezava aPT na imobiliziran PT na  $\gamma$ -obsevanih ali na PVC mikrotitrskih ploščah z visoko afiniteto vezave (19)



Slika 4: Vezava PS, PT in aPT/PS ob prisotnosti  $\text{Ca}^{2+}$  na polistirenske mikrotitrne plošče (19)

Zaradi dveh različnih izvedb ELISA metod za določanje aPT, kjer pri eni določamo protitelesa, ki se vežejo na sam protrombin, pri drugi pa na kompleks fosfatidilserin-protrombin, se v skupino aPT vključuje dve domnevno različni vrsti protiteles. Z metodo, kjer je na testne ploščice vezan samo protrombin, določamo protitelesa proti samemu protrombinu (aPT-A), pri metodi z vezanim fosfatidilserinom in protrombinom pa določamo od fosfatidilserina odvisna aPT (aPS/PT) (20). aPT so pogosto prisotna pri bolnikih z aPL, vendar pa ne dokažemo vedno obeh vrst, aPT-A in aPS/PT, pri istem bolniku. aPT-A so zasledili pri približno polovici bolnikov z aPL (27, 28, 29), za razliko od teh pa se prevalenca pozitivnih rezultatov poveča do 90%, če določamo protitelesa, ki se vežejo na fosfatidilserin-protrombin kompleks v prisotnosti  $\text{Ca}^{2+}$  (13, 29).

Izkazalo se je, da se aPT v ELISA metodah obnašajo zelo podobno kot anti- $\beta_2\text{GPI}$ . Vežejo se lahko z neopitopi, ki se izpostavijo, ko se protrombin veže na anionske fosfolipide v

prisotnosti  $\text{Ca}^{2+}$ , ali pa delujejo kot nizko afinitetna protitelesa, ki se vežejo na protrombin imobiliziran na  $\gamma$ -obsevanih ali na PVC mikrotitrskih ploščah z visoko afiniteto vezave (13).

Imunološke in funkcionalne lastnosti aPT se močno razlikujejo, predvsem glede na afiniteto za humani protrombin. Kljub povečanju znanja o njihovem mehanizmu delovanja, klinični pomen teh protiteles še ni dokazan (8, 13). V nekaterih študijah so poročali, da so aPT pogosto prisotna pri bolnikih s SLE. Ker je njihova prisotnost povezana s trombozami, so ta protitelesa potencialni markerji za APS. Testiranje za ta protitelesa bi bilo lahko klinično nadomestilo pri bolnikih, ki so negativni za rutinsko uporabljene teste. Nekatere študije so pokazale pozitivno, čeprav šibko korelacijo aPT s kliničnimi manifestacijami APS. Vendar pa nekateri preiskovalci niso našli nobenih korelacij, zato je potrebno vrednost aPT kot označevalce APS še določiti. Poleg tega še ni bila določena razlika v kliničnem pomenu med aPT in aPS/PT, čeprav je v več študijah pokazano, da so aPS/PT bolj povezana z APS in LA v primerjavi z aPT-A (Povzeto v 8, 20).

## 1.5 IMUNSKI TESTI NA TRDNEM NOSILCU

Osnova imunskih testov na trdnem nosilcu je reakcija med antigenom in protitelesi. Določamo lahko količino antigena ali protiteles v vzorcu. Značilnost teh testov je, da vključujejo standardne pripravke, ki omogočajo kvantitativno vrednotenje na osnovi umeritvene krivulje. Glede na to, kako označimo imunske komplekse (z radioaktivnim, encimskim ali fluorokromnim označevalcem), jih delimo v podskupine. Najbolj znana sta radioimunski in encimski imunski test.

### *1.5.1 ENCIMSKO IMUNSKI TESTI NA TRDNEM NOSILCU*

Encimski imunski testi na trdnem nosilcu (ELISA) se uporabljajo za določanje protiteles (indirektna ELISA) ali antigena (direktna in indirektna ELISA). Za detekcijo uporabimo encimski sistem s kromogenim substratom. Princip metode je, da encim, konjugiran s protitelesom, reagira z brezbarvnim substratom, pri čemer nastane obarvan produkt, katerega intenziteto lahko merimo. Pri direktni tehniki je že primarno protitelo konjugirano z encimom, pri indirektni tehniki pa je encim konjugiran na sekundarno protitelo (2).



Določanje protiteles z indirektno ELISA poteka tako, da v vdolbinice mikrotitrne plošče, ki so prekrte z anigenom, nanesemo preiskovani vzorec seruma. Če so v serumu prisotna specifična protitelesa za imobiliziran antigen, z njim reagirajo. Po inkubaciji nevezana protitelesa odstranimo s spiranjem z ustreznim pufrom za spiranje, vezana protitelesa pa določimo z encimsko označenimi sekundarnimi protitelesi. Ponovno speremo nevezana protitelesa in dodamo substrat, ki reagira z encimom, pri čemer nastane obarvan produkt. Obarvan produkt reakcije merimo v posebnem, v ta namen pripravljenem spektrofotometru za merjenje absorbance v mikrotitrskih ploščah. Izmerjena absorbanca je sorazmerna s količino produkta, količino vezanih sekundarnih protiteles, ter količino vezanih primarnih protiteles, katerih količino v vzorcu določamo.

#### 1.6 OPREDELITEV PARAMETROV VREDNOTENJA METOD IN REZULTATOV

**Natančnost** je sposobnost metode, da nam poda čim bolj ponovljive rezultate. Izražamo jo kot relativno standardno deviacijo (RSD) oziroma kot koeficient variabilnosti (CV) v odstotkih. Natančnost določene metode podaja sipanje rezultatov pri posameznih meritvah. Nanaša se na velikost razlik med kvantitativnimi rezultati, ki jih dobimo s ponavljanjem poskusa na istem vzorcu, ne da bi se ozirali na resnično množino merjenega parametra. Manjša kot je razlika, bolj natančna je metoda. Natančnost je podrobneje opredeljena s ponovljivostjo (30).

Ko želimo opredeliti diagnostično pomembnost testa, določimo, kolikšna je njegova ponovljivost. Določamo jo lahko kot ponovljivost znotraj analize, kjer določamo variabilnost vrednosti paralelk istega vzorca znotraj ene analize, ali kot medanalizno ponovljivost, kjer v več analizah znotraj enega laboratorija večkrat testiramo iste referenčne vzorce (30).

**Diagnostična občutljivost** predstavlja delež bolnikov s preiskovano boleznijo, pri katerih je rezultat testa pozitiven. Izražamo jo v odstotkih, predstavlja pa verjetnost pozitivnega izida testa pri osebah, pri katerih je bolezen prisotna. Večja kot je diagnostična občutljivost testa, manjše je število lažno negativnih rezultatov (31).

Metoda je občutljiva, kadar lahko z njo dobimo pozitiven rezultat in vzorec resnično vsebuje merjeno sestavino. Če v vzorcu, ki vsebuje določeno sestavino, z neko metodo ne izmerimo njene navzočnosti, pričakujemo pa, da jo vsebuje, pravimo, da smo dobili lažno negativen rezultat. Vzroka za lažno negativen rezultat sta dva: mogoče metoda res ne zazna

sestavine, ki je v vzorcu in je rezultat tudi analitsko napačen. Pogosto pa je lažno negativen rezultat vezan na biološko raznolikost in ne na samo metodo: bolnik dejansko nima patološkega parametra, ki ga pričakujemo in je rezultat z analitskega vidika pravilen (30).

**Diagnostična specifičnost** je definirana kot delež oseb, ki nimajo preiskovane bolezni, in pri katerih je rezultat testa negativen. Predstavlja delež resnično negativnih dogodkov, ki smo jih pravilno ugotovili. V veliki meri je diagnostična specifičnost odvisna od prazne vrednosti (ki je dogovorna vrednost) med zdravo in bolno populacijo, ki se v posameznih lastnostih pogosto deloma prekrivata. Na prekrivanje pa vpliva tudi nenatančnost metode z velikim sipanjem rezultatov, zato je za visoko klinično uporabnost rezultatov pomembno, da izvajamo zanesljive teste z veliko natančnostjo.

Pri določanju specifičnosti predvidevamo, da v vzorcu ni iskane sestavine. Če s testom dobimo pozitiven rezultat, je ta lažno pozitiven. Večja kot je diagnostična specifičnost testa, manjše je število lažno pozitivnih rezultatov (30, 31).

**Analizna specifičnost** je sposobnost metode, da izmeri samo iskano snov v vzorcu (30).

**Prevalenca** je ena od mer, ki jih uporabljamo za merjenje pogostnosti neke bolezni v populaciji. Pove nam, koliko posameznikov ima določeno bolezen ob določenem času (30).

**Napovedna vrednost** združuje diagnostično občutljivost in specifičnost testa s prevalenco določene bolezni. Število pravilno pozitivnih in lažno pozitivnih rezultatov je odvisno od razširjenosti bolezni v populaciji in diagnostične občutljivosti in specifičnosti testa. V primeru, ko je prevalenca bolezni majhna, je napovedna vrednost pozitivnega ali negativnega testnega izvida majhna. Tedaj tudi najbolj specifični in občutljivi testi dajejo veliko število lažno negativnih ali lažno pozitivnih rezultatov.

**Pozitivna napovedna vrednost** (PNV) predstavlja verjetnost, da bi oseba, ki ima pozitiven testni izvid, resnično imela bolezen. Izražamo jo v odstotkih, pove nam odstotek pravih pozitivnih rezultatov (30, 32).

**Negativna napovedna vrednost** (NNV) predstavlja verjetnost, da bi oseba, ki ima negativen testni izvid, resnično ne bila bolna. Izražamo jo v odstotkih, pove nam odstotek pravih negativnih rezultatov (30, 32).

## 1.7 PRAŽNE VREDNOSTI

Pražna vrednost je najnižja smiselna koncentracija, ki še ima klinični pomen (30). Predstavlja mejo med količino analita, ki je z določeno metodo zaznaven pri zdravi populaciji, in značilno povišano ravno analita pri bolnikih. Pražno vrednost največkrat opredeljuje analitsko ozadje metode, pri čemer pomeni nespecifično vezavo protiteles, ki jo zaznamo pri določeni metodi, lahko pa predstavlja tudi normalne vrednosti specifičnih protiteles, prisotnih pri zdravih posameznikih. Določitev pražne vrednosti, ki postavlja mejo med pozitivnimi in negativnimi vrednostmi, je torej ključnega pomena pri predstavitvi rezultatov testiranja vzorcev na aPL. Določimo jo na osnovi kontrolne skupine, ki zajema normalne serume. Rezultate testiranja normalnih serumov obdelamo z ustrežno statistično metodo, s katero določimo pražno vrednost. Če so vrednosti porazdeljene normalno, pražno vrednost določimo na podlagi srednje vrednosti + poljubno število SD, če pa vrednosti niso porazdeljene normalno, uporabimo 99. percentil.

## 2 NAMEN DELA

aPT so pogosto prisotna pri bolnikih z APS, vendar različno od aCL, anti- $\beta_2$ GPI in LA ne predstavljajo merila za klasifikacijo APS. V zadnjem času se povečuje zanimanje tudi za aPT kot potencialne kazalce za APS, saj so nekatere študije pokazale pozitivno korelacijo aPT s kliničnimi manifestacijami APS. Testiranje za ta protitelesa bi bilo lahko klinično nadomestilo pri bolnikih, ki so negativni na rutinsko uporabljene teste. Dve različni izvedbi ELISA omogočajo določitev domnevno različnih populacij antiprotrombinskih protiteles aPT-A in aPS/PT. Nekatere študije so dokazale, da so aPS/PT bolj povezana z APS in LA, vendar se pomen posameznih aPT za diagnostiko še ugotavlja.

V diplomski nalogi je naš namen primerjati obe izvedbi encimsko imunske metode za določanje aPT. Najprej bomo vsako metodo ovrednotili (določili bomo natančnost - variabilnost znotraj analize in med analizami). Na ta način želimo pred vrednotenjem rezultatov zagotoviti, da je posamezna metoda natančna in zanesljivo izvedena. Nato bomo določili prazne vrednosti aPT-A ter aPS/PT razredov IgG in IgM, na osnovi izmerjenih vrednosti absorbanc in pripadajočih arbitrarnih enot serumov zdravih posameznikov. V zadnji fazi bomo ovrednotili diagnostično uporabnost rezultatov (diagnostično specifičnost in občutljivost, ter pozitivno in negativno napovedano vrednost). Ugotavljali bomo pogostost prisotnosti aPT-A in aPS/PT pri bolnikih z APS v primerjavi s skupinami bolnikov z drugimi avtoimunskimi boleznimi kot so SLE, revmatoidni artritis (RA), Sjögrenov sindrom (SjS) in pri krvodajalcih. Naš cilj je ugotoviti, katera metoda je primernejša in daje uporabnejše rezultate za diagnostiko APS.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 HUMANI VZORCI

Priprava seruma: Odvzeto kri v roku dveh ur centrifugiramo, po centrifugiranju serum (supernatant) previdno prenesemo v svežo epruveto in ga tako ločimo od krvih celic.

Humane serume krvodajalcev smo dobili iz krvne banke Zavoda za transfuzijo krvi, serume bolnikov s sistemski avtoimunskimi boleznimi pa iz obstoječih bank Kliničnega oddelka za revmatologijo SPS Interne klinike KC Ljubljana.

Analizirali smo:

- 223 serumov klinično zdravih ljudi: 83 žensk in 140 moških, starih od 19 do 65 let (povprečna starost 43 let),
- 99 serumov bolnikov z APS: 65 žensk in 34 moških, starih od 16 do 85 let (povprečna starost 43 let),
- 40 serumov bolnikov s SLE: 39 žensk in 1 moški, starih od 22 do 77 let (povprečna starost 44 let),
- 52 serumov bolnikov z RA: 45 žensk in 7 moških, starih od 26 do 81 let (povprečna starost 58 let),
- 12 serumov bolnikov s SjS: 11 žensk in 1 moški, starih od 35 do 84 let (povprečna starost 57 let).

#### 3.2 STANDARDI

##### 3.2.1 INTERNI STANDARDI

Za medanalizno primerljivost smo uporabili ustrezne interne standarde, ki so jih predstavljali predhodno večkrat testirani serumi bolnikov obstoječih serumskih bank Kliničnega oddelka za revmatologijo. Standarde smo ustrezno redčili, alikvotirali in zamrznili do njihove uporabe, ko smo jih serijsko redčili, da smo dobili standardno krivuljo za ELISA.

➤ **Interni standardi za umeritveno krivuljo:**

- **aPS/PT**

Za IgG: O714, redčen 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200

Za IgM: M703, redčen 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200

- **aPT-A**

Za IgG: O714, redčen 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600

Za IgM: K408, redčen 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200

➤ **Interni standardi za pozitivno kontrolo:**

- **aPS/PT**

Za IgG: E331, neredčen

Za IgM: M218, redčen 1:8

- **aPT-A**

Za IgG: E331, neredčen

Za IgM: K452, neredčen

### 3.3 ANTIGEN

Humani protrombin [7,71mg/L]. Enzyme Reserch Laboratories, Swansea, UK

### 3.4 MIKROTITRSKE PLOŠČE

Polistrienske mikrotitrne plošče:

- Costar<sup>®</sup> medium binding, EIA/RIA plates, Cambridge, ZDA
- Costar<sup>®</sup> high binding, EIA/RIA plates, Cambridge, ZDA

### 3.5 KEMIKALIJE

- Dietanolamin ( $\text{NH}(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH})_2$ ) analitske čistoče, Sigma St. Louis, ZDA
- Fosfatidilserin (2 g/L), Sigma, St. Louis, ZDA
- Goveji serumski albumin (BSA), Sigma, St. Louis, ZDA

- Kalcijev klorid dihidrat ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) analitske čistoče, Merck, Darmstadt, Nemčija
- Kalijev dihidrogenfosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) analitske čistoče, Merck, Darmstadt, Nemčija
- Kalijev klorid ( $\text{KCl}$ ) analitske čistoče, Merck, Darmstadt, Nemčija
- Kloroform analitske čistoče, Kemika, Zagreb, Hrvaška
- Klorovodikova kislina ( $\text{HCl}$ ) analitske čistoče, Kemika, Zagreb, Hrvaška
- Magnezijev klorid heksahidrat ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) analitske čistoče, Kemika, Zagreb, Hrvaška
- Metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) analitske čistoče, Kemika, Zagreb, Hrvaška
- Natrijev azid ( $\text{NaN}_3$ ) analitske čistoče, Merck, Darmstadt, Nemčija
- Natrijev hidrogenfosfat dihidrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) analitske čistoče, Merck, Darmstadt, Nemčija
- Natrijev hidroksid ( $\text{NaOH}$ ) analitske čistoče, Kemika, Zagreb, Hrvaška
- Natrijev klorid ( $\text{NaCl}$ ) analitske čistoče, Merck, Darmstadt, Nemčija
- Para-nitrofenil-fosfat 5 mg tablete (pNPP), Sigma Chemical, St. Louis, ZDA
- Sekundarna protitelesa: afinitetno prečiščena kunčja protitelesa, usmerjena proti človeškim IgG oziroma IgM, konjugirana z alkalno fosfatazo, Accurate Chemical & Scientific Corporation (ACSC), Westbury, ZDA
- Tris (3-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiol), TRIZMA base, Sigma Aldrich, Steinheim, Nemčija
- Tween 20, Sigma Ultra, ZDA

### 3.6 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

pH uravnamo z 2M klorovodikovo kislino

- **Pufrana fiziološka raztopina TBS-Ca<sup>2+</sup>; pH=7,4**

natrijev klorid	136 mmol/L
kalijev klorid	2,7 mmol/L
Tris	25 mmol/L
kalcijev klorid	5 mmol/L

pH uravnamo z 2M klorovodikovo kislino

- **TBS-Ca<sup>2+</sup> - 0,05% Tween**

Pufrana fiziološka raztopina TBS-Ca<sup>2+</sup>; pH=7,4

0,05% (v/v) Tween 20

- **1% BSA/TBS-Ca<sup>2+</sup>**

Pufrana fiziološka raztopina TBS-Ca<sup>2+</sup>; pH=7,4

1% (w/v) goveji serumski albumin (BSA)

- **Pufrana fiziološka raztopina PBS; pH=7,4**

dinatrijev hidrogenfosfat	6,5 mmol/L
kalijev dihidrogenfosfat	1,5 mmol/L
kalijev klorid	2,7 mmol/L
natrijev klorid	137 mmol/L

pH uravnamo z 1M klorovodikovo kislino



- **PBS – 0,1% Tween**

Pufrana fiziološka raztopina PBS; pH=7,4

0,1% (v/v) Tween 20

- **1% BSA/PBS - Tween**

Pufrana fiziološka raztopina PBS; pH=7,4

0,1% (v/v) Tween 20

1% (w/v) goveji serumski albumin (BSA)

### 3.7 APARATURE IN PRIBOR

- droben laboratorijski material: pipete, multipipete, nastavki za pipete, steklovina (čaše, erlermajerice, merilni valji, stekleničke), plastične kadičke,...
- analitska tehtnica (Mettler Toledo type PM2500, Mettler Toledo AG, Greifensee, Švica)
- rotacijsko mešalo (Spectrafuge 24D, Labnet International, ZDA)
- pH meter (Mettler Toledo SevenEasy, Columbus, Ohio, ZDA)
- ročni spiralnik za mikrotitrne ploščice plošč (Bio-Rad model 1550 Microplate Washer, Bio-Rad, Richmond, ZDA)
- spektrofotometerski čitalec mikrotitrskih plošč (Tecan Rainbow, Thermo, SLT, Avstrija)
- magnetno mešalo (IKA<sup>®</sup> RCT basic safety control, IKA<sup>®</sup>, Staufen)
- stresalnik za mikrotitrne ploščice (IKA<sup>®</sup> MTS 2/4, IKA<sup>®</sup>, Staufen)

### 3.8 IMUNSKIE METODE NA TRDNEM NOSILCU

#### 3.8.1 MODIFICIRANA METODA ELISA ZA DOLOČANJE APS/PT (APS/PT ELISA)

Na polistirensko mikrotitrsko ploščo (Costar medium binding) smo nanegli 40  $\mu$ l fosfatidilserina (50 mg/l v kloroform/metanol 1:4) in inkubirali čez noč na +4°C v temi. Ko se je naslednji dan plošča ogrela na sobno temperaturo, smo nanegli pufer za blokiranje (150  $\mu$ l 1% BSA/TBS-Ca<sup>2+</sup>) in inkubirali eno uro na sobni temperaturi. Po inkubaciji smo vdolbinice dvakrat spirali s 300  $\mu$ l pufrane fiziološke raztopine (TBS-Ca<sup>2+</sup> - 0,05% Tween); pH=7,4 in nato nanegli v vse vdolbinice po 25  $\mu$ l PT [10 mg/L v 1% BSA/TBS-Ca<sup>2+</sup>] in 25  $\mu$ l vzorcev/standardov redčenih 1:50 v 1% BSA/TBS-Ca<sup>2+</sup>. Antigen in serume smo nanašali neposredno drugega za drugim in ju skupaj inkubirali, tako so bili vzorci na plošči redčeni 1:100. Po enourni inkubaciji na stresalniku za mikrotitrsko ploščo smo vdolbinice spirali štirikrat. Nato smo nanegli 50  $\mu$ l/vdolbinico sekundarnih protiteles redčenih 1:2000 v 1% BSA/TBS-Ca<sup>2+</sup> in jih inkubirali 30 minut na stresalniku. Ponovno smo vdolbinice štirikrat spirali in nanegli 100  $\mu$ l/vdolbinico substrata para-nitrofenil-fosfata v DEA koncentracije 1 mg/ml. Inkubirali smo 5 minut in nato merili absorpcijo s čitalcem mikrotitrskih plošč pri valovni dolžini 405 nm in referenčnem filtru 690 nm, dokler nismo dosegli najboljšega približka izbranim absorbanam internih standardov.

#### 3.8.2 OSNOVNA METODA ELISA ZA DOLOČANJE APT-A (APT-A ELISA)

Na polistirensko mikrotitrsko ploščo (Costar high binding) smo nanegli 80  $\mu$ l protrombina ER (10 mg/l v PBS) in inkubirali čez noč na +4°C v temi. Naslednji dan smo plošče ogrete na sobno temperaturo trikrat spirali s 300  $\mu$ l/vdolbinico pufrane fiziološke raztopine (PBS - 0,1% Tween); pH=7,4 in nanegli 100  $\mu$ l vzorcev/standardov redčenih 1:100 (razen IgG standard 1:50) v 1%BSA/PBS - 0,1% Tween. Po enourni inkubaciji na stresalniku pri sobni temperaturi smo ploščo trikrat spirali in nato nanegli 100  $\mu$ l/vdolbinico sekundarnih protiteles redčenih 1:2000 v 1% BSA/PBS - 0,1% Tween. Ploščo smo inkubirali eno uro na stresalniku, trikrat spirali in nanegli 100  $\mu$ l/vdolbinico substrata para-nitrofenil-fosfata v DEA [1 mg/ml]. Inkubirali smo 5 minut in nato merili absorpcijo s čitalcem mikrotitrskih plošč pri valovni dolžini 405 nm in referenčnem filtru 690 nm, dokler nismo dosegli najboljšega približka izbranim absorbanam internih standardov.

### 3.9 ENAČBE ZA RAČUNANJE PARAMETROV VREDNOTENJA METODE IN REZULTATOV

Posamezno metodo smo ovrednotili z analizo natančnosti, pridobljene rezultate pa z diagnostično specifičnostjo in občutljivostjo ter pozitivno in negativno napovedano vrednostjo. Vrednosti posameznih parametrov smo izračunali po spodnjih enačbah (32).

- *Natančnost (%)*:  $CV = \frac{SD * 100}{x}$
- *Diagnostična specifičnost (%)* =  $\frac{\text{št. pravilno negativnih} * 100}{\text{št. pravilno negativnih} + \text{št. lažno pozitivnih}}$
- *Diagnostična občutljivost (%)* =  $\frac{\text{št. pravilno pozitivnih} * 100}{\text{št. pravilno pozitivnih} + \text{št. lažno negativnih}}$
- *Pozitivna napovedana vrednost (%)* =  $\frac{\text{št. pravilno pozitivnih} * 100}{\text{št. pravilno pozitivnih} + \text{št. lažno pozitivnih}}$
- *Negativna napovedana vrednost (%)* =  $\frac{\text{št. pravilno negativnih} * 100}{\text{št. pravilno negativnih} + \text{št. lažno negativnih}}$

Pravilno pozitivni rezultati (PP) so pozitivni rezultati analize aPT-A ali aPS/PT ELISA pri bolnikih z APS.

Pravilno negativni rezultati (PN) so negativni rezultati analize aPT-A ali aPS/PT ELISA pri kontrolni skupini, ki nimajo APS.

Lažno pozitivni rezultati (LP) so pozitivni rezultati analize aPT-A ali aPS/PT ELISA pri kontrolni skupini, ki nimajo APS.

Lažno negativni rezultati (LN) so negativni rezultati analize aPT-A ali aPS/PT ELISA pri bolnikih z APS.

### 3.10 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Vse dobljene rezultate smo statistično obdelali z računalniškim programom Microsoft Excel 2007 in SPSS 15,0.

Normalno porazdelitev meritev aPT smo preverili pri krvodajalcih s Kolmogorov-Smirnov testom in s koeficientoma asimetrije in sploščenosti. Verjetnosti so bile statistično značilne, pri  $p < 0,05$ . Spremenljivka je normalno porazdeljena kadar sta koeficient asimetrije in sploščenosti večja od -1 in manjša od 1. Smer asimetrije pokaže predznak izračunanega koeficienta asimetrije. Če je večji od 0, je porazdelitev asimetrična v desno, če je manjši 0, je porazdelitev asimetrična v levo. Kadar je koeficient sploščenosti manjši od 0, je porazdelitev koničasta, če je večji od 0, je porazdelitev sploščena.

Za določitev razlik v prevalenci aPT-A in aPS/PT med različnimi skupinami bolnikov z avtoimunskimi boleznimi smo uporabili  $\chi^2$  test. Razlike so bile statistično značilne, kadar je bila  $p < 0,05$ .

Korelacijo med obema metodama smo izračunali s Spearmanovim koeficientom korelacije rangov, ki se uporablja za oceno stopnje povezanosti spremenljivk, ki niso porazdeljene normalno. Koeficient korelacije po Spearmanu ima lahko vrednosti med -1 in +1. Vrednost -1 dobimo, če gre za maksimalno negativno korelacijo, vrednost +1 pa pri maksimalni pozitivni korelaciji. Če je koeficient korelacije enak nič, med obema spremenljivkama ni linearne povezanosti (33).

## 4 REZULTATI

### 4.1 VARIABILNOST ZNOTRAJ ANALIZE

Vse preiskovane vzorce in interne standarde smo testirali v dvojniku in zmerili absorbance obeh paralelk, ter variabilnost podali s CV. Dovoljena meja za CV je bila pri metodi aPS/PT 18%, pri metodi aPT-A pa 10%. Meritve, pri katerih je CV presegel to mejo, smo ponovili. Preglednica I prikazuje variabilnost znotraj analize aPS/PT ter aPT-A, kjer smo za izračun upoštevali vse vzorce, vključno s tistimi, katerih CV je presegel dovoljeno mejo. Povprečje variabilnosti znotraj analize je znašalo 3,3% za IgG in 3,4% za IgM aPS/PT, ter 2,5% za IgG in 2,2% za IgM aPT-A. Preglednica II prikazuje variabilnost znotraj posamezne analize, kjer smo pri izračunu upoštevali ponovno analizirane vzorce s predhodno previsokimi CV vrednostmi, ki nato niso presegali dovoljene meje 18% za aPS/PT in 10% za aPT-A. V tem primeru je bilo povprečje variabilnosti znotraj analize 3,1% za IgG in 3,2% za IgM aPS/PT, ter 2,0% za IgG in 1,9% za IgM aPT-A.

**Preglednica I: Variabilnost znotraj analize, izračun na vseh testiranih vzorcih**

		število meritev	CV (%)		
			min	max	povprečje
<b>aPS/PT</b>	IgG	608	0,0	60,8	<b>3,3</b>
	IgM	596	0,0	89,8	<b>3,4</b>
<b>aPT-A</b>	IgG	606	0,0	31,7	<b>2,5</b>
	IgM	610	0,0	37,7	<b>2,2</b>

**Preglednica II: Variabilnost znotraj analize; izračun na vzorcih, kjer CV ni presegel 18% pri aPS/PT in 10% pri aPT-A**

		število meritev	CV (%)		
			min	max	povprečje
<b>aPS/PT</b>	IgG	608	0,0	14,7	<b>3,1</b>
	IgM	596	0,0	16,3	<b>3,2</b>
<b>aPT-A</b>	IgG	594	0,0	9,7	<b>2,0</b>
	IgM	608	0,0	10,0	<b>1,9</b>

#### 4.2 VARIABILNOST MED ANALIZAMI

Variabilnost med analizami smo določali na podlagi izmerjenih absorbanc internega standarda ter pozitivne kontrole. Interni standard in pozitivno kontrolo smo analizirali pri vsaki analizi, iz dobljenih absorbanc pa smo izračunali CV internega standarda in pozitivne kontrole za posamezen razred protiteles pri obeh metodah. Končni rezultat je povprečje CV internega standarda in pozitivne kontrole za posamezen razred protiteles. Preglednica III prikazuje variabilnost med analizami aPS/PT, ki je 7,9% za IgG in 10,1% za IgM. Variabilnost med analizami aPT-A pa je 12,6% za IgG in 7,6% za IgM, kar prikazuje preglednica IV.

**Preglednica III: Variabilnost med analizami aPS/PT**

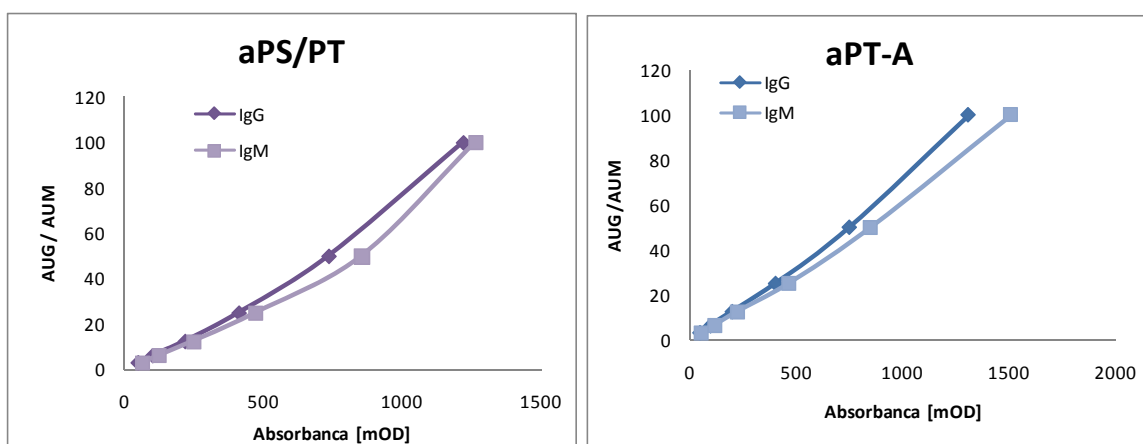
aPS/PT		število analiz	CV (%)	Povprečje CV (%)
<b>IgG</b>	Interni standard (1:100)	13	5,2	<b>7,9</b>
	Pozitivna kontrola	12	10,5	
<b>IgM</b>	Interni standard (1:100)	13	7,0	<b>10,1</b>
	Pozitivna kontrola	13	13,2	

#### Preglednica IV: Varibilnost med analizami aPT-A

aPT-A		Število analiz	CV (%)	Povprečje CV (%)
IgG	Interni standard (1:50)	15	8,6	<b>12,6</b>
	Pozitivna kontrola	15	16,6	
IgM	Interni standard (1:100)	15	4,0	<b>7,6</b>
	Pozitivna kontrola	15	11,2	

#### 4.3 STANDARDNA KRIVULJA

Pri vsaki analizi IgG/IgM aPS/PT in IgG/IgM aPT-A smo naredili standardno umeritveno krivuljo na podlagi internega standarda, ki smo ga serijsko redčili 1:2. Redčitve internih standardov pri IgG/IgM aPS/PT in IgM aPT-A so bile 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 in pri IgG aPT-A od 1:50 do 1:1600. Izmerjenim absorbancom smo predpisali arbitrarne enote (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125) in na podlagi enačbe umeritvene krivulje izračunali arbitrarne enote ostalim vzorcem testiranim v isti analizi.



Slika 5: Umeritvene krivulje za IgG/IgM aPS/PT in IgG/IgM aPT-A

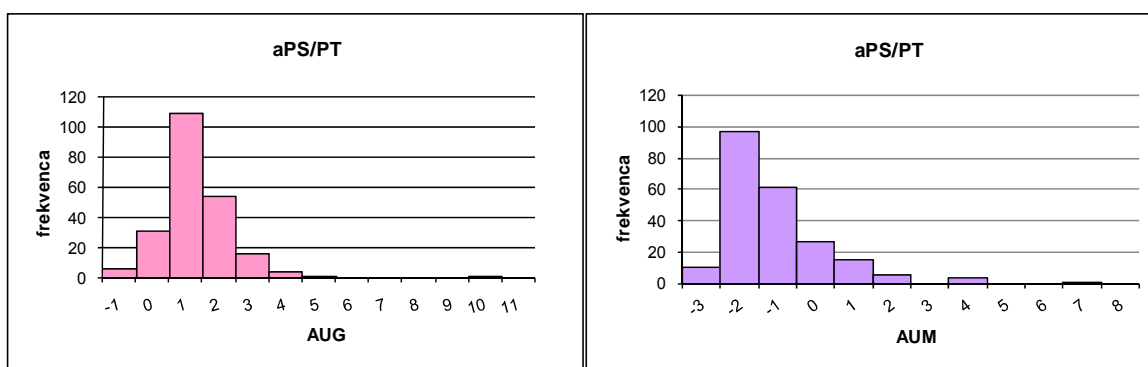
#### 4.4 DOLOČANJE PRAŽNIH VREDNOSTI

Pražne vrednosti smo določili na osnovi izmerjenih absorbancc serumov krvodajalcev, in sicer 222 serumov za aPS/PT razredov IgG in IgM, 220 serumov za aPT-A razreda IgG, ter 223 serumov za aPT-A razreda IgM. Iz frekvenčne porazdelitve izmerjenih vrednosti smo

izračunali parametre statistike (povprečje, standardni odklon, percentil) in preverili, ali se vrednosti porazdeljujejo normalno.

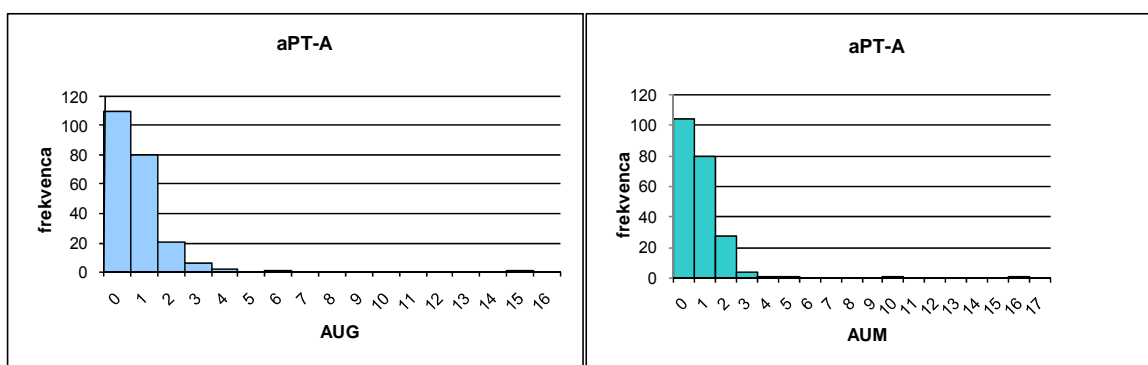
#### 4.4.1 FREKVENČNA PORAZDELITEV VSEH IZMERJENIH VREDNOSTI PRI ZDRAVI POPULACIJI

Frekvenčna porazdelitev izmerjenih arbitrarnih enot 222 krvodajalcev, testiranih z metodo aPS/PT, je prikazana na sliki 6. Frekvenčna porazdelitev za AUG je zvonasta, medtem ko je za AUM desno asimetrična, kjer rep sega proti višjim vrednostim. Pri AUG in AUM aPS/PT smo izmerili eno ekstremno vrednost (osamelec).



Slika 6: Frekvenčna porazdelitev AUG in AUM pri populaciji 222 krvodajalcev, testiranih z metodo aPS/PT

Frekvenčno porazdelitev arbitrarnih enot v populaciji krvodajalcev, testiranih z metodo aPT-A, prikazuje slika 7. Pri AUG aPT-A smo izmerili eno in pri AUM aPT-A dve ekstremni vrednosti.



Slika 7: Frekvenčna porazdelitev AUG in AUM pri populaciji 220 krvodajalcev za AUG in 223 krvodajalcev za AUM, testiranih z metodo aPT-A



Pri verjetnosti  $p < 0,05$  Kolmogorov-Smirnov testa in na osnovi koeficientov asimetrije in sploščenosti (preglednica V) lahko potrdimo, da se vrednosti AUG/AUM aPS/PT in AUG/AUM aPT-A pri krvodajcih ne porazdeljujejo normalno.

**Preglednica V: Parametri porazdelitve AUG/AUM aPS/PT in AUG/AUM aPT-A pri krvodajcih**

	aPS/PT		aPT-A	
	AUG	AUM	AUG	AUM
Kolmogorov-Smirnov test	1,930	2,141	3,174	3,247
p	0,001	0,000	0,000	0,000
koeficient asimetrije	0,8	1,7	2,3	1,9
koeficient sploščenosti	1,6	3,6	6,9	4,6

#### 4.4.2 STATISTIČNI PODATKI IZMERJENIH ABSORBANC IN PRIPADAJOČIH

##### ARBITRARNIH ENOT PRI ZDRAVI POPULACIJI

Na podlagi enačbe umertivene krivulje internih standardov smo iz izmerjenih absorbanc izračunali arbitrarne enote pri vsaki analizi ločeno. Rezultat meritve aPS/PT in aPT-A smo podajali v arbitrarnih enotah AUG za IgG in AUM za IgM. Statistični podatki vseh izmerjenih absorbanc krvodajalcev in pripadajočih arbitrarnih enot IgG in IgM aPS/PT in aPT-A so prikazani v preglednici VI.

**Preglednica VI: Statistični podatki vseh izmerjenih absorbanc in pripadajočih arbitrarnih enot IgG in IgM aPS/PT in aPT-A**

	aPS/PT				aPT-A			
	IgG		IgM		IgG		IgM	
	Abs	AUG	Abs	AUM	Abs	AUG	Abs	AUM
število vzorcev	222	222	222	222	220	220	223	223
srednja vrednost	21	1,4	36	2,0	119	7,7	167	8,8
Standardni odklon (SD)	19	1,1	28	1,4	117	7,8	153	9,7
srednja vrednost + 2SD	58	3,6	93	4,8	352	23,2	472	28,2
srednja vrednost + 3SD	77	4,7	121	6,2	469	31,0	625	37,9
98 percentil	63	3,7	121	6,4	362	23,2	548	28,8
99 percentil	74	4,4	139	7,2	463	29,7	639	34,3
najnižja vrednost	2	-0,7	1	0,3	16	1,0	21	1,3
najvišja vrednost	173	10,2	204	10,1	1365	93,3	1432	108,1
pražna vrednost	<b>74</b>	<b>4</b>	<b>140</b>	<b>7</b>	<b>463</b>	<b>30</b>	<b>640</b>	<b>34</b>

Za pravilno določitev praznih vrednosti smo izločili osamelce, to so vrednosti, ki za več kot 5 standardnih odklonov odstopajo od srednje vrednosti (34). Te vrednosti predstavljajo pozitiven rezultat in imajo zato nepravilen vpliv na prazno vrednost. Iz skupine testiranih krvodajalcev smo zato izločili izstopajoče ekstremne vrednosti in ponovno izračunali statistične mere preostalim vrednostim. Podatki so zbrani v preglednici VII.

**Preglednica VII: Statistični podatki arbitrarnih enot testiranih krvodajalcev brez osamelcev (osamelci so imeli vrednosti večje od povprečja+5SD)**

	aPS/PT		aPT-A	
	AUG	AUM	AUG	AUM
število vzorcev	221	221	219	221
število izločenih osamelcev	1	1	1	2
srednja vrednost	1,3	1,9	7,3	8,1
standardni odklon (SD)	1,0	1,3	5,2	5,7
srednja vrednost+2SD	3,2	4,5	17,7	19,4
srednja vrednost+3SD	4,2	5,8	22,8	25,1
98 percentil	3,6	5,4	22,2	25,9
99 percentil	4,1	7,1	27,4	29,5
najnižja vrednost	-0,7	0,3	1,0	1,3
najvišja vrednost	5,2	7,3	36,2	34,9
prazna vrednost	<b>4</b>	<b>7</b>	<b>27</b>	<b>30</b>

Pražne vrednosti smo določili na podlagi 99. percentila, izračunane iz arbitrarnih enot testiranih krvodajalcev brez osamelcev (preglednica VII). Pražna vrednost za IgG aPS/PT je 4,1 AUG, za IgM aPS/PT 7,1 AUM, za IgG aPT-A 27,4 AUG in 29,5 AUM za IgM aPT-A. Naredili smo matematično korekcijo rezultatov in z njo poenotili prazne vrednosti. Rezultate smo matematično preračunali tako, da smo poenotili vse prazne vrednosti na 4,5 arbitrarne enote. Vsem izmerjenim AUG aPS/PT smo prišteli 0,4 in AUM aPS/PT odšteli 2,6. AUG aPT-A smo delili s 6,09, AUM pa s 6,56. Statistični podatki korigiranih arbitrarnih enot so prikazani v preglednici I. Rezultat večji od 4,5 arbitrarnih enot (kar je zaokroženo na 5 AU) predstavlja pozitiven rezultat.

**Preglednica II: Statistični podatki korigiranih arbitrarnih enot**

	aPS/PT		aPT-A	
	AUG+0,4	AUM-2,6	AUG/6,09	AUM/6,56
število vzorcev	221	221	219	221
srednja vrednost	1,7	-0,7	1,2	1,2
SD	1,0	1,3	0,9	0,9
srednja vrednost+2SD	3,6	1,9	2,9	3,0
srednja vrednost+3SD	4,6	3,2	3,7	3,8
98 percentil	4,0	2,8	3,6	4,0
99 percentil	4,5	4,5	4,5	4,5
najnižja vrednost	-0,3	-2,3	0,2	0,2
najvišja vrednost	5,6	4,7	6,0	5,3
pražna vrednost	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>

#### 4.5 DOLOČANJE PROTITELES PROTI PROTROMBINU PRI RAZLIČNIH SKUPINAH BOLNIKOV

##### 4.5.1 ANTIFOSFOLIPIDNI SINDROM

V skupini 99 bolnikov z APS smo pri 59 bolnikih določili aPS/PT (48 IgG, 45 IgM) in pri 25 aPT-A (15 IgG, 16 IgM) protitelesa.

##### Preglednica IX: Protitelesa proti protrombinu pri bolnikih z APS

APS	aPS/PT		aPT-A	
	IgG	IgM	IgG	IgM
pozitivni	48	45	15	16
negativni	51	54	84	83
skupaj	99	99	99	99
pozitiven IgG in/ali IgM	59		25	

##### 4.5.2 SISTEMSKI LUPUS ERITEMATOZUS

V skupini 40 bolnikov s SLE smo pri 11 bolnikih določili aPS/PT (7 IgG, 7 IgM) in pri 7 aPT-A (4 IgG, 4 IgM) protitelesa.

**Preglednica X: Protitelesa proti protrombinu pri bolnikih s SLE**

SLE	aPS/PT		aPT-A	
	IgG	IgM	IgG	IgM
pozitivni	7	7	4	4
negativni	33	33	36	36
skupaj	40	40	40	40
pozitiven IgG in/ali IgM	11		7	

#### 4.5.3 REVMATOIDNI ARTRITIS

V skupini 52 bolnikov z RA smo pri 7 bolnikih določili aPS/PT (2 IgG, 5 IgM) in pri 9 aPT-A (3 IgG, 6 IgM) protitelesa.

**Preglednica XI: Protitelesa proti protrombinu pri bolnikih z RA**

RA	aPS/PT		aPT-A	
	IgG	IgM	IgG	IgM
pozitivni	2	5	3	6
negativni	50	47	49	46
skupaj	52	52	52	52
pozitiven IgG in/ali IgM	7		9	

#### 4.5.4 SJÖGREN OV SINDROM

V skupini 12 bolnikov s SjS pri noben nismo določili aPS/PT, samo pri enem pa smo določili IgM aPT-A protitelesa.

**Preglednica XII: Protitelesa proti protrombinu pri bolnikih s SjS**

SjS	aPS/PT		aPT-A	
	IgG	IgM	IgG	IgM
pozitivni	0	0	0	1
negativni	12	12	12	11
skupaj	12	12	12	12
pozitiven IgG in/ali IgM	0		1	

#### 4.6 PREVALENCA PROTITELES PROTI PROTROMBINU PRI RAZLIČNIH SKUPINAH BOLNIKOV

S  $\chi^2$  testom smo potrdili, da so protitelesa proti protrombinu (aPS/PT in aPT-A) statistično značilno pogosteje prisotna pri bolnikih z APS v primerjavi z drugimi skupinami bolnikov in zdravimi posamezniki ( $p < 0,01$ ).

**Preglednica XIII: Kontingenčna tabela za izračun  $\chi^2$  testa**

aPS/PT	APS+	*APS-
pozitivna aPS/PT	59	22
negativna aPS/PT	40	303
skupaj	99	325

\* krvodajalci in bolniki s SLE, RA ali SjS

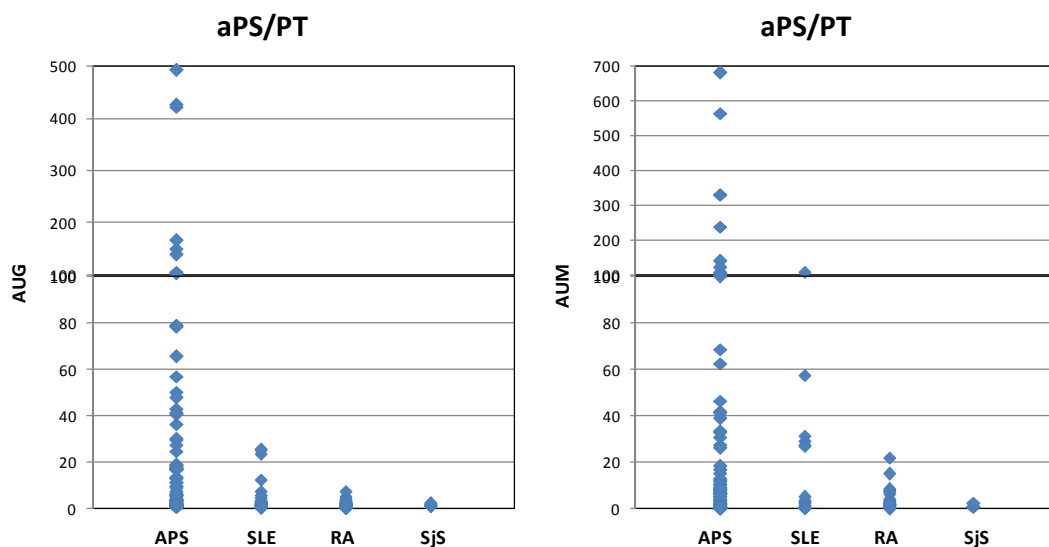
aPT-A	APS+	*APS-
pozitivna aPT-A	25	23
negativna aPT-A	74	301
skupaj	99	324

aPS/PT (59/99 proti 22/325;  $p < 0,01$ )

aPT-A (25/99 proti 23/324;  $p < 0,01$ )

##### 4.6.1 PREVALENCA APS/PT

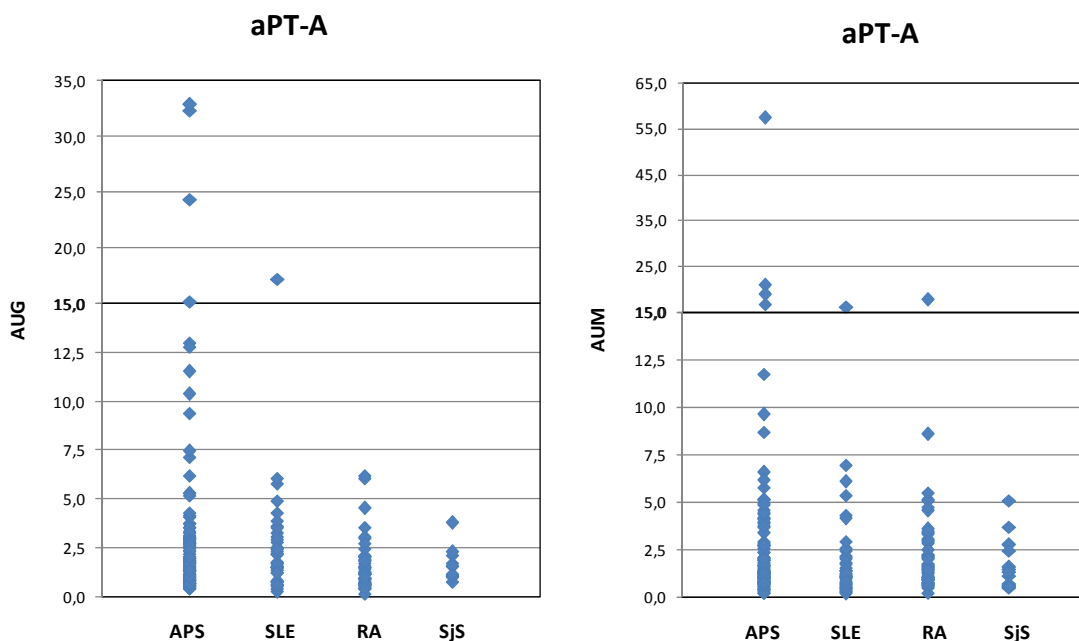
Prevalenca aPS/PT pri bolnikih z APS, SLE, RA in SjS je prikazana na sliki 8. aPS/PT protitelesa so pogosteje prisotna pri bolnikih z APS v primerjavi z drugimi skupinami bolnikov.



**Slika 8: Primerjava izmerjenih vrednosti AUG in AUM aPS/PT pri bolnikih z APS, SLE, RA in SjS; Vzorci z vrednostmi nad 5 enot so pozitivni. Vrednost najvišjega standarda je 100 AUG/AUM.**

#### 4.6.2 PREVALENCA aPT-A

Izmerjene vrednosti aPT-A pri bolnikih z APS, SLE, RA in SjS prikazuje slika 9. aPT-A protitelesa so pogosteje prisotna pri bolnikih z APS v primerjavi z drugimi skupinami bolnikov.



**Slika 9: Primerjava izmerjenih vrednosti AUG in AUM aPT-A pri bolnikih z APS, SLE, RA in SjS; Vzorci z vrednostmi nad 5 enot so pozitivni. Vrednost najvišjega standarda je pri IgG 16,4 AUG in pri IgM 15,2 AUM.**

#### 4.7 PRIMERJAVA METODE aPS/PT Z METODO aPT-A

##### 4.7.1 PARAMETRI VREDNOTENJA REZULTATOV POSAMEZNE METODE:

###### *DIAGNOSTIČNA OBČUTLJIVOST IN SPECIFIČNOST, POZITIVNA IN NEGATIVNA NAPOVEDANA VREDNOST*

Izračunali smo diagnostično občutljivost in specifičnost za rezultate, pridobljene s posamezno metodo, in sicer skupaj za oba razreda prototeles, IgG in IgM. Obe metodi dajeta rezultate s primerljivo diagnostično specifičnostjo (93%), medtem ko so rezultati aPS/PT diagnostično občutljivejši (60%) v primerjavi z rezultati aPT-A (25%).

Ocenili smo tudi pozitivno in negativno napovedano vrednost rezultatov posamezne metode. Pozitivna napovedana vrednost je višja pri metodi aPS/PT. Če smo rezultate ovrednotili tako, da je pozitiven rezultat predstavljala prisotnost IgG in/ali IgM, je bila pozitivna napovedana vrednost rezultatov metode aPS/PT 73,8%, rezultatov metode aPT-A pa 53,2%, kar je prikazano v preglednici XIV. Preglednica XV prikazuje rezultate negativne napovedane vrednosti, ki je prav tako višja pri metodi aPS/PT, in sicer znaša 88,4% za rezultate aPS/PT, ter 80,3% za rezultate aPT-A.

**Preglednica XIV: Pozitivna napovedana vrednost rezultatov, pridobljenih z metodama aPS/PT in aPT-A**

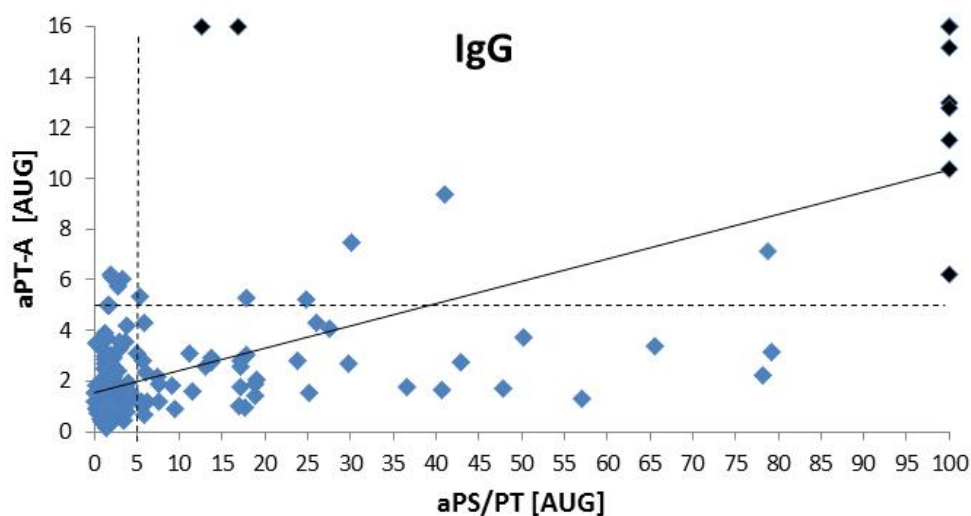
	aPS/PT		aPT-A	
	IgG	IgM	IgG	IgM
PP	48	45	15	16
LP	11	13	8	15
PNV(%)	81,4	77,6	65,2	51,6
	IgG in/ali IgM		IgG in/ali IgM	
PP	59		25	
LP	21		22	
PNV(%)	<b>73,8</b>		<b>53,2</b>	

**Preglednica XV: Negativna napovedana vrednost rezultatov, pridobljenih z metodama aPS/PT in aPT-A**

	aPS/PT		aPT-A	
	IgG	IgM	IgG	IgM
PN	314	312	315	310
LN	51	54	84	83
PNV(%)	86,0	85,2	78,9	78,9
	IgG in/ali IgM		IgG in/ali IgM	
PN	304		302	
LN	40		74	
PNV(%)	<b>88,4</b>		<b>80,3</b>	

#### 4.7.2 KORELACIJA REZULTATOV METOD aPS/PT IN aPT-A

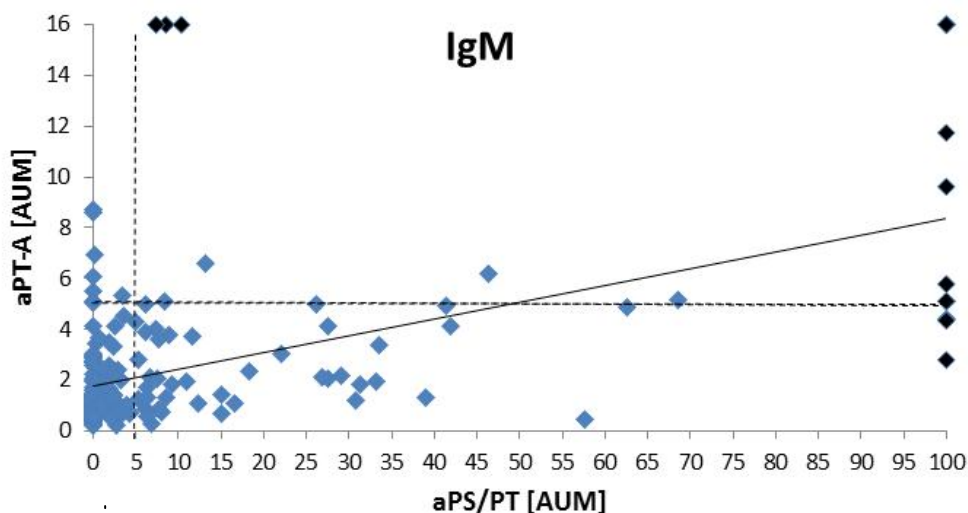
Primerjali smo izmerjene arbitrarne enote aPS/PT ELISA z aPT-A, ločeno za oba izotipa protiteles, vseh testiranih vzorcev bolnikov z različnimi avtoimunskimi boleznimi (APS, SLE, RA, SjS). Grafični prikaz korelacije med obema metodama je na slikah 10 in 11. Mero povezanosti smo izračunali s Spearmanovim koeficientom korelacije, ki je bil za IgG 0,413 in za IgM 0,451.



Slika 10: Korelacija med aPS/PT in aPT-A za IgG izotip protiteles. Osi predstavljajo AUG. Črtna črta predstavlja prazno vrednost (5 arbitrarnih enot). Vzorci z absorbancami višjimi od najvišje redčine internega standarda (100 pri aPS/PT ELISA in 16 pri aPT-A ELISA) imajo za grafični prikaz na tej sliki pripisano vrednost najvišjega standarda (točke na grafu so črne barve).

V skupini 203 bolnikov z različnimi avtoimunskimi boleznimi jih je 63 (31,0%) imelo pozitivne rezultate za IgG, določene z metodo aPS/PT in/ali aPT-A. Med njimi je bilo 16 (25,4%) pozitivnih pri obeh metodah (aPS/PT in aPT-A), 47 (74,6%) je imelo pozitiven rezultat samo pri enem testu; 41 (65,1%) samo aPS/PT in 6 (9,5%) samo aPT-A. Nihče od 6 bolnikov z aPT-A protitelesi ni imel APS. Z metodo aPS/PT smo zajeli 90,5% pozitivnih rezultatov za IgG, z metodo aPT-A pa le 74,6%.





**Slika 11: Korelacija med aPS/PT in aPT-A za IgM izotip protiteles. Osi predstavljajo AUM. Črtna črta predstavlja prazno vrednost (5 arbitrarnih enot). Vzorci z absorbancami višjimi od najvišje redčine internega standarda (100 pri aPS/PT ELISA in 16 pri aPT-A ELISA) imajo za grafični prikaz na tej sliki pripisano vrednost najvišjega standarda (točke na grafu so črne barve).**

V skupini 203 bolnikov jih je 66 (32,5%) imelo pozitivne rezultate za IgM aPT, določene z metodo aPS/PT in/ali aPT-A. Med njimi je bilo 17 (25,8%) pozitivnih pri obeh metodah, 49 (74,2%) pa jih je imelo pozitiven rezultat samo pri enem testu; 41 (62,1%) samo aPS/PT in 8 (12,1%) samo aPT-A. Samo 1 od 8 bolnikov z aPT-A protitelesi je imel APS. Z metodo aPS/PT zajamemo 87,9% pozitivnih rezultatov za IgM, z metodo aPT-A pa le 74,2%.

## 5 RAZPRAVA

Klinična uporabnost rezultatov meritev protiteles v veliki meri zavisi od zanesljivosti metode, s katero določamo protitelesa. Zelo pomembno je, da oblikujemo postopek analize tako, da daje primerljive rezultate skozi daljše časovno obdobje. Za vrednotenje rezultatov moramo poznati pojavljanje določenih protiteles v zdravi populaciji ter porazdelitev izmerjenih vrednosti. Vse te vidike smo obdelali, preden smo se usmerili na primerjalno vrednotenje pojavljanja avtoprotiteles pri različnih skupinah bolnikov, določenih z metodo aPS/PT in aPT-A.

### 5.1 VREDNOTENJE METODE

Dobro postavljena in izvedena metoda je osnovni pogoj za nadaljnje vrednotenje rezultatov. Zato smo najprej ovrednotili posamezno metodo, s tem da smo določili natančnost v smislu znotrajanalizne in medanalizne ponovljivosti, šele nato smo prešli na vrednotenje rezultatov, pridobljenih s posamezno metodo (diagnostična specifičnost in občutljivost ter pozitivna in negativna napovedana vrednost).

#### 5.1.1 VARIABILNOST ZNOTRAJ ANALIZE IN MED ANALIZAMI

Pri vsaki posamezni stopnji analize lahko pride do napak in nenatančnosti pri delu, kar se končno odraža v netočnosti in večji variabilnosti rezultatov znotraj ene analize ali pa med več analizami. Najprej smo določili variabilnost rezultatov znotraj posamezne analize, pri čemer smo pri prvem izračunu upoštevali vse vzorce. Pri ELISA metodah za določanje aCL in  $\beta_2$ GPI pri testiranju bolnikov priporočajo dovoljeno mejo za CV 20% (35). Mi smo na podlagi naših predhodnjih izkušenj v laboratoriju to mejo postavili na 18% za ELISA z mešanim antigenom (fosfolipid + protein) in 10% za ELISA s čistim proteinom. Izkazalo se je, da smo pri obeh metodah za oba razreda protiteles (IgG in IgM) dosegli odlično ponovljivost znotraj analize. Povprečje variabilnosti je bilo namreč od 2,2% do 3,4%, kar je zelo ozko območje, tako da je v vseh primerih znotrajanalizna variabilnost zelo primerljiva in ne predstavlja razlik med posamezno metodo ter posameznim izotipom protiteles. Ker pa smo vzorce, katerih CV je presegel dovoljeno mejo 18% pri aPS/PT in 10% pri aPT-A, ponovno testirali, smo previsoke vrednosti CV teh vzorcev nadomestili s ponovljenimi vrednostmi CV, ter vnovič izračunali ponovljivost. V tem primeru je bila variabilnost znotraj analize še nekoliko nižja, in sicer od 1,9% do 3,2%, kar je pokazatelj, da sta obe metodi zelo natančni.

Na podlagi izmerjenih absorbanč internega standarda in pozitivne kontrole smo določili tudi medanalizno variabilnost. Ponovljivost je bila v tem primeru nekoliko slabša kot znotraj analize; povprečje CV internega standarda in pozitivne kontrole je bilo od 7,6% do 12,6%. Razumljivo je, da je medanalizna variabilnost višja v primerjavi z znotraj analizo, saj pri vseh analizah ne moremo zagotoviti povsem enakih pogojev, doseženih pri posamezni analizi (temperatura, svetloba, čas inkubacije...). Vzrok za višjo variabilnost so lahko tudi standardi, to so serumi bolnikov z avtoimunsko boleznijo, ki so bili večkrat zamrznjeni in odtaljeni. Vzorci pozitivne kontrole so pri obeh metodah za oba izotipa dosegali slabšo ponovljivost kot interni standardi. Povprečje CV internih standardov je bilo od 4,0% do 8,6%, pri pozitivnih kontrolah pa od 10,5% do 16,6%. Absorpcijo smo merili toliko časa, dokler niso bile dosežene vedno enake vrednosti internega standarda, zato so interni standardi dosegali boljšo ponovljivost. Obe metodi, aPS/PT in aPT-A, se nista bistveno razlikovali, ne pri znotrajanalizni variabilnosti, kot tudi ne pri variabilnosti med analizami, zato lahko povzamemo, da sta obe metodi primerljivo natančni. Pri obeh smo dosegli ustrezno ponovljivost za oba razreda protiteles.

## 5.2 DOLOČANJE PRAŽNIH VREDNOSTI

Pri metodi ELISA za določanje aPT nas zanima predvsem, kaj je negativno in kaj pozitivno, katere vrednosti predstavljajo normalen in katere patološki izvid. Mejo med količino aPT, ki je z določeno metodo zaznavna pri zdravi populaciji, in značilno povišano ravno aPT pri bolnikih z APS opredeljuje pražna vrednost, zato je določitev pražne vrednosti ključnega pomena pri predstavitvi rezultatov testiranja vzorcev na aPT. Pri določanju pražne vrednosti se pojavi splošno vprašanje, ali je bolje izbrati vrednost, s katero zajamemo vse pozitivne rezultate in pri tem vključimo še kakšen negativen rezultat, ali je bolje, da zajamemo samo pozitivne in nobenega negativnega rezultata. Na ta način se odločamo med višjo diagnostično specifičnostjo ali višjo diagnostično občutljivostjo metode.

Za določitev ustrezne pražne vrednosti je bilo najprej potrebno zagotoviti ustrezno število vzorcev zdravih ljudi. Če je kontrolna skupina premajhna, so postavljene pražne vrednosti vprašljive in s tem postane vprašljiva tudi interpretacija kasnejših rezultatov. Po priročnikih Evropskega foruma za antifosfolipidna protitelesa (36) naj bi se pražna

vrednost določila na podlagi testiranja najmanj 50 vzorcev krvodajalcev. Mi smo testirali 222 serumov krvodajalcev, da bi določili dovolj zanesljive prazne vrednosti.

Pri vsaki posamezni analizi smo izmerili tudi vrednosti reagenčne slepe, kjer so dodani vsi reagenti razen seruma. Praviloma bi moral biti dodan tudi serum, ki pa ne bi vseboval preiskovanih protiteles. Reagenčni slepi vzorec predstavlja ozadje, ki naj vsebuje vse, razen analitskega dejavnika, kar pa v primeru biološkega materiala ni izvedljivo. Reagenčni slepi vzorec smo pri vsaki analizi testirali v šestih ponovitvah, izračunali njegovo povprečje in ga odšteli vsem absorbancom vzorcev, internih standardov in kontrol.

Z umeritvenimi krivuljami internih standardov smo iz izmerjenih absorbancc izračunali pripadajoče arbitrarne enote pri vsaki analizi ločeno. Rezultate meritev aPS/PT in aPT-A smo podajali v arbitrarnih enotah AUG za IgG in AUM za IgM, ter s tem zagotovili večjo primerljivost samih rezultatov med posameznimi analizami.

Za določitev praznih vrednosti za IgG in IgM aPS/PT in aPT-A smo na osnovi izmerjenih absorbancc krvodajalcev izračunali več statističnih parametrov: srednja vrednost + poljubno število SD, ki se uporablja za mejo pri normalni porazdelitvi spremenljivke, in percentili, ki so primerni za določitev prazne vrednosti pri nenormalni porazdelitvi spremenljivke.

Grafično smo prikazali obliko frekvenčne porazdelitve izmerjenih arbitrarnih enot krvodajalcev in preverili, ali se vrednosti porazdeljujejo normalno. Na podlagi Kolmogorov-Smirnov testa in koeficientov asimetrije in sploščenosti smo potrdili, da vrednosti AUG in AUM pri obeh metodah niso porazdeljene normalno. Ker gre za nenormalno porazdelitev vrednosti pri krvodajalcih in ker mednarodna priporočila za klasifikacijo kriterijev za določitev APS (6) priporočajo za določitev prazne vrednosti 99. percentil, smo za opredelitev praznih vrednosti uporabili 99. percentil. Na ta način so določili prazne vrednosti tudi pri aCL in a $\beta_2$ GPI ELISA metodi.

Frekvenčna porazdelitev za AUG aPS/PT je zvonasta, medtem ko je za AUM aPS/PT desno asimetrična, kjer rep sega proti višjim vrednostim. Pri tej metodi smo izmerili tudi vrednosti manjše od nič. Pri nekaj teh vzorcev je negativen rezultat nastal po matematični pretvorbi v arbitrarne enote, nekateri vzorci pa so imeli izmerjeno absorpcijo nižjo od izmerjene absorpcije reagenčne slepe. Vrednosti reagenčne slepe smo odšteli od vseh

izmerjenih vrednosti absorbanc vzorcev, zato je bil pri slednjih rezultat manjši od nič. Ta pojav lahko razložimo z značilnostjo encima alkalne fosfataze, ki je zelo lepljiv encim. Encim je na sekundarna protitelesa vezan kovalentno, vendar se pri pipetiranju, taljenju in drugih rokovanjih z raztopino lahko odlomi. V reagenčni slepi, kjer ni dodan serum s protitelesi, je več prostora za lepljenje encima na površino. Encim reagira s substratom, ta interakcija pa povzroči barvno reakcijo substrata. Posledično je absorpcija vzorca, kjer je manj prostora za nespecifično lepljenje encima, nižja od absorpcije reagenčne slepe. Kadar je vrednost absorpcije vzorca nižja od reagenčne slepe in zato rezultat manjši od nič, v serumu zagotovo ni protiteles. Pri metodi aPT-A nismo izmerili negativnih rezultatov. Frekvenca izmerjenih vrednosti je bila najvišja pri 0 arbitrarnih enotah, in je nato padala z večanjem števila arbitrarnih enot.

Pri obeh metodah smo izmerili tudi izstopajoče, ekstremne vrednosti, in sicer pri AUM aPT-A dve, pri ostalih pa eno. Te vrednosti za več kot 5 SD odstopajo od srednje vrednosti in krvodajalci s takšnimi vrednostimi imajo pozitiven rezultat. Podatkov o klinični sliki in anamnezi krvodajalcev nimamo, zato težko trdimo, da niso bolni oziroma, da nimajo aPT. Ekstremne vrednosti imajo močan nepravilen vpliv na pražno vrednost, zato smo jih iz izračuna izločili in ponovno izračunali statistične mere preostalim vrednostim.

Čeprav je pri zdravih osebah pričakovana odsotnost aPT, ni presenetljivo, da je bilo v celotni skupini nekaj posameznikov s pozitivnim rezultatom, saj je imunski odziv možen tudi pri zdravih posameznikih. Tudi ostala aPL, aCL in a $\beta_2$ GPI so odkrili pri zdravih osebah (37).

Na podlagi 99. percentil, izračunanih iz arbitrarnih enot testiranih krvodajalcev brez osamelcev, smo ponovno določili pražne vrednosti. Za IgG aPS/PT smo določili pražno vrednost 4,1 AUG, za IgM aPS/PT 7,1 AUM, za IgG aPT-A 27,4 AUG in 29,5 AUM za IgM aPT-A. Za lažjo interpretacijo pozitivnih rezultatov smo pražne vrednosti poenotili, tako da smo naredili matematično korekcijo. Rezultate smo matematično preračunali tako, da smo poenotili vse pražne vrednosti na 4,5 arbitrarne enote, kar računalniški program v predlogi za izračun rezultata iz absorbanc zaokroži na 5. Na osnovi teh kriterijev so vsi rezultati višji od 5 AU predstavljali pozitiven rezultat.

### 5.3 PREVALENCA PROTITELES PROTI PROTROMBINU PRI RAZLIČNIH SKUPINAH BOLNIKOV

Za določanje aPT sta v literaturi opisani dve metodi ELISA. Pri eni kot antigen uporabimo protrombin, imobiliziran na  $\gamma$ -obsevani ELISA ploščici (aPT-A), pri drugi pa določamo aPT, ki se vežejo na fosfstidilserin-protrombin kompleks v prisotnosti  $\text{Ca}^{2+}$  (aPS/PT). Mi smo z obema metodama testirali 203 serume bolnikov s sistemskimi avtoimunskimi boleznimi, od tega jih je 99 imelo diagnozo APS, 104 pa so imeli ostale avtoimunske bolezni (40 SLE, 52 RA in 12 SjS). Z upoštevanjem prazne vrednosti smo ovrednotili prisotnost aPS/PT in aPT-A razredov IgG in IgM.

aPS/PT smo našli pri 58,6% bolnikov z APS, aPT-A pa le pri 25,3% bolnikov. Med bolniki s SLE jih je 27,5% imelo aPS/PT, 17,5% pa aPT-A. V skupini bolnikov z RA jih je 13,5% imelo aPS/PT, aPT-A pa 17,3%. Izmed 12 bolnikov s SjS ni imel noben aPS/PT, le en (8,3%) je imel aPT-A protitelesa. S testom  $\chi^2$  smo potrdili, da so aPS/PT in aPT-A statistično značilno pogosteje prisotna pri bolnikih z APS v primerjavi z drugimi skupinami bolnikov in krvodajalcev ( $p < 0,01$ ).

Med rezultati je grafično prikazana prevalenca aPS/PT in aPT-A pri bolnikih z APS, SLE, RA in SjS. Vzorci z vrednostmi nad 5 AU so pozitivni. Vrednost najvišjega standarda pri aPS/PT je 100 AUG/AUM, 16,4 AUG pri IgG aPT-A, ter 15,2 AUM pri IgM aPT-A. Vzorce z višjimi vrednostimi bi morali dodatno redčiti in upoštevati faktor redčitve za natančno določitev nivoja protiteles. Za potrebe diplomske naloge nas točne vrednosti visoko pozitivnih vzorcev niso zanimale in je dovolj, da jih predstavimo z oznako  $>100$  AUG/AUM aPS/PT ter  $>15$  AUG/AUM aPT-A.

Skupina raziskovalcev (29) je leta 1997 prva pokazala, da je prevalenca aPT pri bolnikih z aPL ob uporabi aPT-A metode 58%, če pa uporabimo metodo aPS/PT, pa se prevalenca poviša na 90%. O višji prevalenci ob uporabi aPS/PT metode v primerjavi z aPT-A so kasneje poročali tudi drugi (13, 38, 39). Do enakih zaključkov smo prišli tudi mi, saj je bila prevalenca aPT-A pri bolnikih z APS le 25,3%, ob uporabi metode, kjer določamo aPS/PT protitelesa, pa 58,6%.

aPT, določena z aPS/PT ali aPT-A ELISA, smo dokazali pri 60% bolnikov z APS. Med njimi je 58 bolnikov imelo samo aPS/PT, 25 pa samo aPT-A, 24 bolnikov je imelo hkrati prisotna oboja. Samo en bolnik je bil ločeno pozitiven v aPT-A ELISA, medtem ko so vsi

ostali s pozitivnimi aPT-A bili hkrati pozitivni tudi v aPS/PT ELISA. Naši rezultati kažejo na to, da bi metoda aPS/PT morebiti lahko nadomestila metodo aPT-A. V literaturi drugi raziskovalci predpostavljajo obstoj dveh različnih populacij aPT (12, 13, 38, 39), z našo raziskavo pa temu ni tako. Ker je aPS/PT analizo občutljivejša metoda, zazna praktično vse pozitivne aPT, zato morda tudi *in vivo* ne obstajata dva tipa protiteles (16).

#### 5.4 DIAGNOSTIČNA OBČUTLJIVOST IN SPECIFIČNOST

Izračunali smo diagnostično občutljivost in specifičnost za posamezno skupino rezultatov po metodah skupaj za oba razreda protiteles. Ugotovili smo, da je diagnostična občutljivost rezultatov aPS/PT za APS veliko boljše kot pri aPT-A, diagnostična specifičnost pa je primerljiva pri obeh metodah.

Diagnostično občutljivost smo izračunali na podlagi rezultatov bolnikov z APS, kjer protitelesa pričakujemo, ter skupin, kjer aPT ne pričakujemo. V kontrolno skupino smo uvrstili krvodajalce in bolnike z drugimi avtoimunskimi vezivno tkivnimi boleznimi: SLE, RA in SjS. Ugotovili smo, da daje metoda aPS/PT rezultate z veliko višjo diagnostično občutljivostjo kot metoda aPT-A, saj je občutljivost rezultatov metode aPS/PT 60%, občutljivost rezultatov metode aPT-A pa samo 25%. To pomeni, da z metodo aPS/PT dobimo manj lažno negativnih rezultatov kot z metodo aPT-A. Na osnovi rezultatov naše diplomske naloge je aPS/PT boljše metoda za določitev aPT, ki bi morebiti lahko v prihodnje postala kriterij za APS, saj z njo zaznamo večji del protiteles proti protrombinu.

Tudi diagnostično specifičnost smo izračunali na podlagi rezultatov skupin, kjer aPT ne pričakujemo, ter bolnikov z APS, kjer protitelesa pričakujemo. Obe metodi dajeta rezultate z visoko in primerljivo diagnostično specifičnostjo (93%). Zato lahko pri pozitivnem rezultatu ob prisotnosti enega od kliničnih kriterijev za APS z veliko verjetnostjo sumimo na APS.

##### 5.4.1 OCENA POZITIVNE IN NEGATIVNE NAPOVEDANE VREDNOSTI

Pri oceni pozitivne in negativne napovedane vrednosti so pravilno pozitivne rezultate predstavljali serumi bolnikov z APS, ki so imeli določena aPT (IgG in/ali IgM aPS/PT ali aPT-A). Pravilno negativne rezultate pa so predstavljali serumi krvodajalcev in bolnikov z drugimi avtoimunskimi boleznimi (SLE, RA in SjS), ki niso imeli določenih aPT.

Tako pozitivna kot tudi negativna napovedana vrednost je višja pri rezultatih z metodo aPS/PT. Če smo rezultate ovrednotili tako, da je pozitiven rezultat predstavljala prisotnost kateregakoli izotipa protiteles IgG in/ali IgM, je bila pozitivna napovedana vrednost pri aPS/PT 73,8%, pri aPT-A pa 53,2%. Odstotek pravilno pozitivnih rezultatov je pri metodi aPS/PT za približno 20% višji kot pri metodi aPT-A, kar pomeni, da z metodo aPS/PT v primerjavi z metodo aPT-A pri bolnikih z APS določimo približno 20% več pozitivnih rezultatov za aPT.

Tudi negativna napovedana vrednost je nižja pri rezultatih metode aPT-A, le da je razlika v tem primeru manjša. Metoda aPS/PT nam da za približno 8% več pravilno negativnih rezultatov kot metoda aPT-A.

#### *5.4.2 KORELACIJA METOD aPS/PT IN aPT-A*

Primerjali smo izmerjene arbitrarne enote aPS/PT z aPT-A ločeno za oba izotipa protiteles vseh testiranih vzorcev. Mero povezanosti med višino aPS/PT in aPT-A pri istem bolniku smo določili s Spearmanovim koeficientom korelacije ranga, ki se uporablja za oceno stopnje povezanosti, kadar spremenljivki nista porazdeljeni normalno. Test je pokazal nizko mero korelacije med aPS/PT in aPT-A ( $r=0,59$  za IgG in  $r=0,48$  za IgM). Velik delež bolnikov je imel pozitivne vrednosti izmerjene samo v eni metodi. Pri IgG je bilo med pozitivnimi 74,6% bolnikov z neskladnimi rezultati, pri IgM pa 74,2%. V nasprotju z vsemi prejšnjimi objavami, kjer so primerjali metodo aPS/PT, ki jo je opisal Atsumi (13) z metodo aPT-A (12, 13, 38, 39, 40), je v naši študiji delež bolnikov, ki so pozitivni samo na aPS/PT veliko večji od deleža pozitivnih samo na aPT-A (IgG: 65,1% samo aPS/PT, 9,5% samo aPT-A; IgM: 62,1% samo aPS/PT, 12,1% samo aPT-A). Vse druge raziskovalne skupine (12, 13, 38, 39, 40) poročajo o enakovrednem deležu bolnikov pozitivnih samo na aPS/PT ali aPT-A in zato povzemajo, da obstajata dve prekrivajoči, vendar pa ne identični, populaciji aPT. Z modificirano metodo aPS/PT, ki smo jo uporabili v naši študiji, smo izmerili pozitiven rezultat pri 98,3% aPT-A pozitivnih rezultatih bolnikov z APS, zato sklepamo, da ta metoda omogoča detekcijo obeh, tako aPT-A kot tudi aPS/PT, populacij protiteles. Možno je tudi, da ne obstajata dve ločeni populaciji aPT, vendar zaradi razlik v njihovih vezavnih lastnostih, z različnimi testi prednostno določimo samo eno subpopulacijo, druge pa ne (16).



## 6 SKLEP

V okviru diplomske naloge smo prišli do naslednjih sklepov:

- Znotrajanalizna in medanalizna ponovljivost je bila pri obeh metodah zelo dobra, metodi sta primerljivo natančni.
- aPS/PT in aPT-A protitelesa so statistično značilno pogosteje prisotna pri bolnikih z APS v primerjavi z drugimi skupinami bolnikov in krvodajalcev ( $p < 0,01$ ).
- Prevalenca aPT pri bolnikih z APS je višja ob uporabi metode aPS/PT, in sicer 58,6% za aPS/PT in 25,3% za aPT-A.
- Diagnostična občutljivost, pozitivna in negativna napovedna vrednost rezultatov, določenih z metodo aPS/PT za diagnozo APS je veliko boljše kot pri aPT-A, medtem ko je diagnostična specifičnost primerljiva pri obeh skupinah protiteles.
- Metoda aPS/PT bi morebiti lahko nadomestila metodo aPT-A, saj smo z aPS/PT metodo izmerili pozitiven rezultat pri 98,3% vseh aPT-A pozitivnih bolnikih z APS (le en bolnik je imel samo aPT-A in negativne aPS/PT). Iz tega sklepamo, da aPS/PT ELISA omogoča detekcijo obeh, tako aPT-A kot tudi aPS/PT, populacij protiteles.
- Z modificirano aPS/PT metodo izmerimo obe domnevno različni populaciji protiteles, zato pomislimo, da morda ne obstajata različni populaciji protiteles.
- Na podlagi vseh rezultatov smo zaključili, da je metoda aPS/PT primernejša in daje uporabnejše rezultate za diagnostiko APS.

## 7 LITERATURA

1. Roitt, Brostoff, Male: Immunology, 5<sup>th</sup> ed., Mosby, London, 1998: 71-81, 107-112
2. Vozelj M: Temelji imunologije, Državna založba Slovenije, Ljubljana, 2000: 48-55, 56-58, 283
3. Božič B, Mlinarič Raščan I: Imunologija v farmaciji – študijsko gradivo, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2008: 52-53
4. Hughes GRV: Thrombosis, abortion, cerebral disease and the lupus anticoagulant. Br Med J 1983; 287: 1088-89
5. Wendell A, Willson, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JC, Brey R, Derksen R, Harris EN, Hughes GR, Triplett DA, Khamashta MA: International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. Arthritis & Rheumatism 1999; 42: 1309-1311
6. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Cervera R, Derksen RH, DE Groot PG, Koike T, Meroni PL, Reber G, Shoenfeld Y, Tincani A, Vlachoyiannopoulos PG, Krilis SA: International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). Journal of Thrombosis and Haemostasis 2006; 4: 295-306
7. Božič B: Pathogenesis of Antiphospholipid Syndrome. V: TOPIĆ E: New trends in classification, monitoring and management of neurological diseases: handbook. Zagreb: Medicinska naklada 2003; 19-25
8. Galli M, Barbui T: Antiprothrombin Antibodies: Detection and Clinical Significance in the Antiphospholipid Syndrome. Blood 1999; 93: 2149-2157
9. Roubey RA: Autoantibodies to phospholipid-binding plasma proteins: a new view of lupus anticoagulants and other "antiphospholipid" autoantibodies. Blood 1994; 84: 2854-2867
10. Rauch J, Tannenbaum M, Janoff AS: Distinguishing plasma lupus anticoagulants from anti-factor antibodies using hexagonal (II) phase phospholipids. Thromb. Haemost. 1989; 62: 892-896
11. Galli M. Non  $\beta_2$ -glycoprotein I cofactors for antiphospholipid antibodies. Lupus 1996; 5: 388-392

12. Nojima J, Iwatani Y, Suehisa E, Kuratsune H, Kanakura Y: The presence of anti-phosphatidylserine/prothrombin antibodies as risk factor for both arterial and venous thrombosis in patients with systemic lupus erythematosus. *Haematologica* 2006; 9: 699-702
13. Atsumi T, Ieko M, Bertolaccini M, Ichikawa K, Tsutsumi A, Matsuura E, Koike T: Association of autoantibodies against the phosphatidylserine-prothrombin complex with manifestations of the antiphospholipid syndrome and with the presence of lupus anticoagulant. *Arthritis & Rheumatism* 2000; 43: 1982–1993
14. Amengual O, Atsumi T, Khamashta M, Koike T, Hughes GRV: Specificity of ELISA for antibody to b2-glycoprotein I in patients with antiphospholipid syndrome. *Br J Rheumatol* 1996; 35: 1239-1243
15. Roubey RAS, Maldonado MA, Byrd SN: Comparison of an enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to b2-glycoprotein I and a conventional anticardiolipin immunoassay. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 1606–1607
16. Žigon P: Značilnosti vezave antitrombinskih protiteles in vitro ter in vivo, Magistersko delo, Ljubljana, 2008
17. Amengual O, Atsumi T, Koike T: Antiprothrombin antibodies and the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Clinical Immunology* 2004; 112: 144–149
18. Galli M, Beretta G, Daldossi M, Bevers EM, Barbui T: Different anticoagulant and immunological properties of anti- prothrombin antibodies in patients with antiphospholipid antibodies. *Thromb. Haemost* 1997; 77: 486-491
19. Žigon P: Določanje od fosfatidilserina odvisnih protiteles proti protrombinu z encimsko imunskim testom na trdnem nosilcu. Diplomsko naloga 2002. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
20. Amengual O, Atsumi T, Koike T: Specificities, Properties, and Clinical Significance of Antiprothrombin Antibodies. *ARTHRITIS & RHEUMATISM* 2003; 48: 886–895
21. Oku K, Atsumi T, Amengual O, Koike T: Antiprothrombin Antibodies testing: Detection and Clinical Utility. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 2008; 34: 335-339

22. Bajaj S, Rapaport S, Fierer D, Herbst K, Schwartz D: A mechanism for the hypoprothrombinemia of the acquired hypoprothrombinemia- lupus anticoagulant syndrome. *Blood* 1983; 61: 684-692
23. Edson J, Vogt J, Hasegawa D: Abnormal prothrombin crossed immunoelectrophoresis in patients with lupus inhibitor. *Blood* 1984; 64: 807-816
24. Fleck R, Rapaport S, Rao L: Antiprothrombin antibodies and the lupus anticoagulant. *Blood* 1988; 72: 512-519
25. Bevers EM, Galli M, Barbui T, Comfurius P, Zwaal RFA: Lupus anticoagulant IgG's (LA) are not directed to phospholipids only, but to a complex of lipid-bound human prothrombin. *Thromb Haemost* 1991; 66: 629-632
26. Oosting JD, Derksen RHW, Bobbink IWG, Hackeng TM, Bouma BN, de Groot PG: Antiphospholipid antibodies directed against a combination of phospholipid with prothrombin, protein C or protein S: an explanation for their pathogenetic mechanism? *Blood* 1993; 81: 2618-2625
27. Pengo V, Biasiolo A, Brocco T, Tonetto S, Ruffatti A: Autoantibodies to phospholipid-binding plasma proteins in patients with thrombosis and phospholipid-reactive antibodies. *Thromb Haemost* 1996; 75: 721-725
28. Arvieux J, Darnige L, Reber G, Bensa JC, Colomb MG: Development of an ELISA for autoantibodies to prothrombin showing their prevalence in patients with lupus anticoagulants. *Thromb Haemost* 1995; 74: 1120- 1125
29. Galli M, Beretta G, Daldossi M, Bevers EM, Barbui T: Different anticoagulant and immunological properties of anti-prothrombin antibodies in patients with antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* 1997; 77: 486-491
30. Kotnik V: *Imunološki priročnik, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani – Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Ljubljana, 2010: 122-127, 139*
31. Saah AJ, Hoover DR: "Sensitivity" and "specificity" reconsidered: the meaning of these terms in analytical and diagnostic settings. *Ann Intern Med.* 1997; 126: 91-94
32. Lothar T: *Clinical laboratory diagnostics: use and assessment of clinical laboratory results, 1<sup>st</sup> ed, TH-Books, Frankfurt, 1998*
33. Adamič Š: *Temelji biostatistike. Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani – Inštitut za biomedicinsko informatiko, Ljubljana, 1995: 116-120*

34. Jones R, Payne B: Clinical investigation and statistics in laboratory medicine, ACB Venture Publications, London, 1997: 22-24
35. Wong R, Favaloro E: A Consensus Approach to the Formulation of Guidelines for Laboratory Testing and Reporting of Antiphospholipid Antibody Assays. *Seminars in Thrombosis and hemostasis* 2008; 4
36. Tincani A, Allegri F, Balestrieri G, Reber G, Sanmarco M, Meroni P, Boffa MC: Minimal requirements for antiphospholipid antibodies ELISAs proposed by the European Forum on antiphospholipid antibodies. *Thrombosis Research* 2004; 114: 553-558
37. Avčin T, Ambrožič A, Kuhar M, Kveder T, Rozman B: Anticardiolipin and anti-beta(2) glycoprotein I antibodies in sera of 61 apparently healthy children at regular preventive visits. *Rheumatology (Oxford)* 2001; 40: 565-573
38. Bertolaccini M, Atsumi T, Koike T, Hughes G, Khamashta M: Antiprothrombin antibodies detected in two different assay systems (Prevalence and clinical significance in systemic lupus erythematosus). *Thromb Haemost* 2005; 93: 289-297
39. Tsutsumi A, Hayashi T, Chino Y, Mamura M, Goto D, Matsumoto Satoshi I, Sumida T: Significance of antiprothrombin antibodies in patients with systemic lupus erythematosus: clinical evaluation of the antiprothrombin assay and the antiphosphatidylserine/prothrombin assay, and comparison with other antiphospholipid antibody assays. *Mod Rheumatol* 2006; 16: 158-164
40. Matsuda J, Sanaka T, Nishizawa A, Gotoh M, Gohchi K: Two antiprothrombin antibodies against prothrombin and prothrombin-phosphatidyl serine show partial but not total identity. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 2002; 13: 697-702
41. Čučnik S, Rozman B, Božič B: Pomen protiteles proti  $\beta$ 2-glikoproteinu I. *Farmaceutski vestnik* 2004; 55: 207-214
42. Galli M, Luciani D, Bertolini G, Barbui T: Anti- $\beta$ 2-glycoprotein I, antiprothrombin antibodies, and the risk of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Blood* 2003; 102: 2717-2723

43. Oku K, Atsumi T, Amengual O, Koike T: Antiprothrombin Antibodies testing: Detection and Clinical Utility. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 2008; 34: 335-339

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NEŽA KIKELJ

DIPLOMSKA NALOGA

**POMEN DOLOČANJA PROTITELES PROTI PROTROMBINU Z  
DVEMA ENCIMSKO IMUNSKIMA METODAMA**

VISOKOŠOLSKI STROKOVNI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE  
BIOMEDICINE

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NEŽA KIKELJ

**POMEN DOLOČANJA PROTITELES PROTI PROTROMBINU Z  
DVEMA ENCIMSKO IMUNSKIMA METODAMA**

**SIGNIFICANCE OF ANTIPROTHROMBIN ANTIBODY DETECTION  
WITH TWO ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY  
METHODS**

Ljubljana, 2010



Diplomsko delo sem opravljala v Laboratoriju za imunologijo revmatizma Kliničnega oddelka za revmatologijo, SPS Interne klinike Univerzitetnega Kliničnega centra v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Boruta Božič, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom mag. Polone Žigon, univ. dipl. mikrobiol.

### **Zahvala**

Iskreno se zahvaljujem mentorju prof. dr. Borutu Božiču, mag. farm., spec. med. biokem., da mi je omogočil izvedbo diplomske naloge na področju imunologije in za vse strokovne nasvete pri pisanju diplomske naloge. Še posebej se zahvaljujem somentorici mag. Poloni Žigon, univ. dipl. mikrobiol., za vso pomoč pri eksperimentalnem delu in pisanju diplomske naloge. Zahvaljujem se tudi celotnemu osebju Laboratorija za imunologijo revmatizma za prijaznost in pomoč pri delu v laboratoriju.

Prav tako se zahvaljujem družini in prijateljem, da so me v času študija podpirali in verjeli vame.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Boruta Božič, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom mag. Polone Žigon, univ. dipl. mikrobiol.