

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SANDRA LAMEŠIĆ

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SANDRA LAMEŠIĆ

**VREDNOTENJE ENCIMSKOIMUNSKHE METODE ZA DOLOČANJE
NEUSTREZNO GLIKOZILIRANIH IMUNOGLOBULINOV
RAZREDA A**

**EVALUATION OF ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY
FOR THE DETERMINATION OF ABERRANTLY GLYCOSYLATED
IMMUNOGLOBULINS CLASS A**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2013

Diplomsko nalogo sem opravljala na Katedri za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Boruta Božiča, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Jasne Omersel, mag. farm. Nefelometrične meritve so bile opravljene na Oddelku za laboratorijsko diagnostiko Splošne bolnišnice Jesenice.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Borutu Božiču za priložnost opravljanja raziskovalnega dela ter vse strokovne in koristne nasvete, ki so mi bili v pomoč pri izdelavi diplomske naloge.

Posebna zahvala gre tudi somentorici asist. dr. Jasni Omersel za vso spodbudo, trud in strokovno pomoč pri izdelavi diplomske naloge.

Hvala tudi moji družini in bližnjim za vso podporo in motivacijo.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Boruta Božiča, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Jasne Omersel, mag. farm.

Ljubljana, september 2013

Sandra Lamešič

Predsednik diplomske komisije: izr. prof. dr. Marko Anderluh, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Robert Roškar, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE.....	I
POVZETEK	III
ABSTRACT	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	V
1 UVOD.....	1
1.1 Imunoglobulini.....	1
1.2 Glikozilacija imunoglobulinov	2
1.3 Imunoglobulin A.....	3
1.4 Glikozilacija IgA1 v gibljivi regiji.....	3
1.5 Neustrezno glikoziliran IgA1.....	5
1.5.1 IgA nefropatija.....	6
1.5.2 Diagnoza IgA nefropatije	7
1.5.3 Henoch-Schönleinova purpura	8
1.6 Metode za analizo neustrezno glikoziliranega IgA1.....	8
1.6.1 Encimskoimunska tehnika na trdni podlagi (ELISA)	9
1.6.2 HAA-IgA ELISA.....	10
1.7 Vrednotenje analitičnih metod.....	10
2 NAMEN DELA.....	11
3 MATERIALI IN METODE	12
3.1 Vzorci.....	12
3.1.1 Vrste vzorcev	12
3.1.2 Priprava in shranjevanje vzorcev.....	12
3.1.3 Rekalifikacija plazme	12
3.2 Materiali.....	13
3.2.1 Reagenti in kemikalije	13
3.2.2 Aparature in oprema	14

3.2.3	Priprava pufrov in raztopin.....	14
3.3	Metode	16
3.3.1	Encimskoimunski metoda na trdnem nosilcu (ELISA)	16
3.3.2	Nefelometrija	18
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	19
4.1	Določitev optimalne koncentracije lovilnega protitelesa in optimalnega redčenja vzorca seruma ter reagentov biotin-HAA in ExtrAvidin-HRP	19
4.2	Blokada	22
4.3	Prilagajanje koncentracije in pogojev za encim nevraminidaza	24
4.4	Inkubacija substrata	26
4.5	Ugotavljanje primernosti vrste vzorca za analizo: serum, plazma, rekalcificirana plazma.....	27
4.6	Parametri vrednotenja imunokemijskih tehnik	29
4.6.1	Analizna specifičnost.....	29
4.6.2	Natančnost	30
4.6.2.1	Znotrajtestna natančnost.....	30
4.6.2.2	Medtestna natančnost	32
4.6.3	Linearnost	34
4.7	Problematika analize ravni določanja neustrezno glikoziliranih IgA	35
4.8	Preliminarno preverjanje potencialne klinične uporabnosti rezultatov	39
4.8.1	Razlikovanje med zdravo in bolno skupino na osnovi neustrezno glikoziliranih IgA1	39
4.8.2	Koncentracija serumskega IgA.....	40
4.9	Zaključek	41
5	SKLEP	42
6	LITERATURA	43
	PRILOGE	47

POVZETEK

Imunoglobulini so glikozilirani proteini, ki sodelujejo pri imunskem odzivu sesalcev. Pri motnjah v glikozilaciji pride do sinteze neustrezno glikoziliranih imunoglobulinov, ki so lahko povezani tudi s patogenezo nekaterih bolezni. Neustrezno glikozilirani IgA1, z nižjim deležem galaktoze v pregibni regiji, se v literaturi omenja kot potencialni biološki označevalec za diagnostiko IgA nefropatije, za katero je trenutno potrebna histopatološka preiskava ledvičnega biopta.

Namen našega eksperimentalnega dela je bil prilagoditev indirektna sendvič ELISA metode za določanje neustrezno glikoziliranih IgA1 in vrednotenje njene analize specifičnosti, natančnosti in linearnosti za potencialno rutinsko uporabo v prihodnosti. Posebnost metode je cepitev sialičnih kislin in nadaljnja specifična vezava lektina na *N*-acetilgalaktozamin v gibljivi regiji neustrezno glikoziliranega IgA1. Prilagodili smo redčenje reagentov (lovilno protitelo, nevraminidaza, lektin iz vrtnega polža in konjugat avidin-hrenova peroksidaza), sestavo pufrov ter čas inkubacije substrata, da smo dobili najbolj optimalna razmerja med absorbancami vzorcev analiznega ozadja in serumskih vzorcev bolnikov oz. zdravih posameznikov. Kot primeren izhodiščni vzorec za analizo se je izkazal serum, rezultati plazemskih vzorcev so bili nepričakovano visoki. Ugotovili smo, da ima na aktivnost nevraminidaze pomemben vpliv tudi prisotnost kalcijevih ionov v redčitvenem pufri. Natančnost metode smo ovrednotili z znotrajtestno natančnostjo (CV = 5,5 %, n = 48) ter medtestno natančnostjo s povprečno vrednostjo za vzorce bolnikov in zdravih (CV = 18,6 %, n = 4) in povprečno vrednostjo za vzorce analiznega ozadja (CV = 48,9 %, n = 5). Po analizi 40 serumskih vzorcev bolnikov z IgA nefropatijo in 10 serumskih vzorcev zdravih krvodajalcev smo ugotovili določeno stopnjo prekrivanja vrednosti med skupinama – povprečna vrednost izmerjenih absorbanc bolnikov je bila 0,447, povprečna vrednost izmerjenih absorbanc zdravih pa 0,386. Rezultati nakazujejo na potencialno možnost uporabe opisane metode v diagnostične namene, vendar le ob dodatni prilagoditvi ter natančnem nadzoru vseh stopenj in sledljivosti uporabljenih reagentov, s čimer bi dosegli ustrezno ponovljivost.

Ključne besede: ELISA, neustrezno glikozilirani IgA1, IgA nefropatija

ABSTRACT

Immunoglobulins are glycosylated proteins that participate in the immune response of mammals. A disruption of glycosylation induces a synthesis of aberrantly glycosylated immunoglobulin which may also be associated with the pathogenesis of certain diseases. Aberrantly glycosylated IgA1 with galactose deficiency in hinge region is mentioned in literature as a potential biomarker for the diagnosis of IgA nephropathy. Currently, a histopathological examination of renal biopsy material is required for the diagnosis.

The purpose of our experimental work was to optimize the indirect sandwich ELISA assay for the determination of aberrantly glycosylated IgA1 and evaluation of its analytical specificity, precision and linearity for potential routine use in the future. The specificity of the assay refers to the removal of sialic acid and further specific binding of lectin to *N*-acetylgalactosamine in hinge region of aberrantly glycosylated IgA1. We have optimized the dilution of reagents (capture antibody, neuraminidase, lectin from garden snail and conjugate avidin-horseradish peroxidase), buffer composition and incubation time of the substrate in order to obtain the optimal ratio between the absorbance of the samples of analytical background and serum samples of patients and healthy individuals. Serum has proved to be a suitable starting sample for analysis. The results of plasma samples were unexpectedly high. We have established that the presence of calcium ions in a dilution buffer produces a significant effect on the activity of neuraminidase. The precision of the assay was evaluated with within-run imprecision (CV = 5.5 %, n = 48), and between-day imprecision with an average value of the samples of patients and healthy individuals (CV = 18.6 %, n = 4) and the average value of the samples of the analytical background (CV = 48.9 %, n = 5). After analyzing 40 serum samples of patients with IgA nephropathy and 10 serum samples of healthy blood donors we have found a degree of overlap between the groups – the average value of the measured absorbance of the patients was 0.447 and the average value of the measured absorbance of healthy donors was 0.386. The results indicate the potential possibility of using the assay for diagnostic purposes, but only with additional adjustment, close monitoring of all levels and traceability of the reagents used, which would enable appropriate repeatability.

Key words: ELISA, aberrantly glycosylated IgA1, IgA nephropathy

SEZNAM OKRAJŠAV

BSA	goveji serumski albumin
CV	koeficient variacije
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
ELISA	encimskoimunska tehnika na trdni podlagi
Gal	galaktoza
GalNAc	<i>N</i> -acetilgalaktozamin
HAA	lektin iz vrtnega polža (<i>Helix aspersa</i>)
HRP	hrenova peroksidaza
IgA	imunoglobulin A
Neu	nevraminidaza
PBS	izotonični fosfatni pufer
SD	standardna deviacija
Ser	serin
Thr	treonin
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidin

1 UVOD

1.1 Imunoglobulini

Imunoglobulini (Ig) ali protitelesa so del humoralnega imunskega sistema pri sesalcih. So glikozilirani globularni proteini iz naddružine imunoglobulinov z navidezno molekulsko maso večjo od 150 kDa. Prisotni so v krvi, tkivnih tekočinah in telesnih izločkih (sluz, solze, slina, urin in mleko doječe matere). Zrele imunoglobuline proizvajajo aktivirani in končno diferencirani limfociti B. Njihova primarna funkcija je specifična vezava na antigen in inaktivacija ali olajšana odstranitev toksinov, mikrobov, parazitov ali drugih tujkov v organizmu (1, 2).

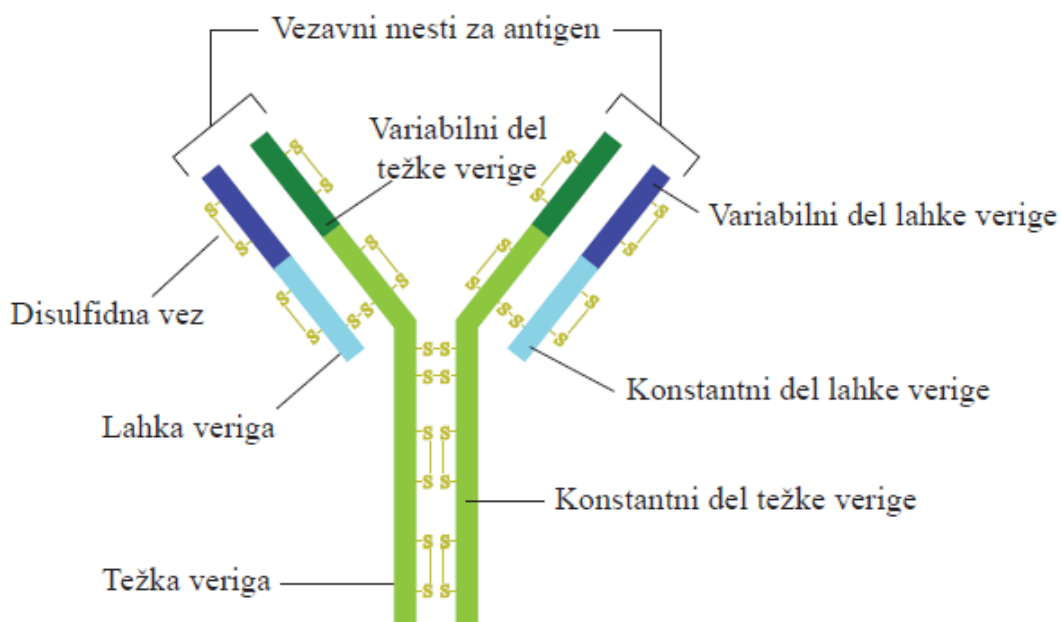
Osnovna struktura vseh imunoglobulinov je podobna. Imajo simetrično strukturo, sestavljeno iz dveh enakih težkih polipeptidnih verig (γ , μ , α , δ , ϵ) in dveh enakih lahkih polipeptidnih verig (κ , λ), ki so med seboj povezane z disulfidnimi vezmi (slika 1). Strukturno se med seboj razlikujejo po velikosti, naboju, aminokislinskem zaporedju in vsebnosti ogljikovih hidratov (1, 3). Vsaka temeljna enota imunoglobulina ima dva globularna segmenta Fab (angl. *fragment antigen binding*) in vsak od njiju ima po eno vezavno mesto za antigen. Ta segmenta sta povezana še s tretjim globularnim segmentom Fc (angl. *fragment crystallizable*), ki ga lahko kristaliziramo in je odgovoren za efektorske funkcije protitelesa, npr. vezava komplemента, vezava na celice (2).

Glede na vrsto težke verige imunoglobuline razdelimo v pet razredov: IgG, IgM, IgA, IgD in IgE, ki se lahko naprej delijo v podrazrede. IgG delimo na štiri podrazrede (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) in IgA na dva podrazreda (IgA1, IgA2) (1–4). IgG v krvi predstavljajo večino imunoglobulinov in prevladujejo pri sekundarnem imunskem odzivu. IgM so pentameri in so pomembni pri primarnem imunskem odzivu. IgA v dimerni obliki prevladujejo v telesnih izločkih in na sluznicah, kjer preprečujejo vezavo virusov na respiratorne in gastrointestinalne epitelne celice, v monomerni obliki pa jih najdemo predvsem v serumu. IgD se izražajo na površini limfocita B. IgE sodelujejo pri alergičnih reakcijah, saj vezani na bazofilce in mastocite sprožijo sproščanje vnetnih mediatorjev (4).

Težka in lahka polipeptidna veriga sta sestavljeni iz konstantnega in variabilnega področja (slika 1). Konstantna področja imajo podobno aminokislinsko sestavo, razlike pa določajo razred in podrazred imunoglobulinov. Večja raznolikost aminokislinskega zaporedja je v variabilnem področju imunoglobulinov in določa specifičnost za antigen (1). Največ

variabilnosti je v treh kratkih odsekih, ki jih označujemo kot hipervariabilna regija (CDR) (2).

Sinteza težkih in lahkih verig, ki se nato sestavijo v molekule imunoglobulinov, poteka v endoplazemskem retikulumu, celičnem organelu evkariotskih organizmov. Nato pride v Golgijevem aparatu do glikozilacije in drugih posttranslacijskih sprememb imunoglobulinov (1), kot so metilacija, fosforilacija, oksidacija idr.



Slika 1: Struktura molekule imunoglobulina.

1.2 Glikozilacija imunoglobulinov

Glikozilacija ima pomembno vlogo pri biološki funkciji imunoglobulinov. Ti imajo značilno glikozilacijo, ki se razlikuje v številu, tipu in lokaciji oligosaharidov. Na Fc in Fab segmentih najdemo *N*-glikozilacijo. Pri IgG, IgA in IgD sta segmenta Fc in Fab povezana s prilagodljivo gibljivo regijo ali zglobom, kjer lahko najdemo *N*- in *O*-glikozilacijo. *N*-glikani so oligosaharidi, kovalentno vezani na stransko verigo asparaginskih ostankov, *O*-glikani pa se vežejo na hidroksilno skupino v stranski verigi serinskih ali treoninskih ostankov. Glikani uravnavajo topnost imunoglobulinov, pospešujejo transport molekule in izločanje (sekrecijo) iz celice, na strukturnem nivoju pa ohranjajo konformacijo oz. stabilnost molekule imunoglobulinov ter tako zagotavljajo optimalno vezavo Fc predela na celične receptorje in sprožitev efektorskih funkcij kot so inaktivacija mikrobov in njihovih toksinov ter aktivacija komplekta (5).

Proces glikozilacije v celici je sicer dobro in natančno encimsko nadzorovan, vendar lahko v določenih primerih pride do motenj v glikozilaciji. Neustrezna glikozilacija imunoglobulinov na Fc predelu ali v gibljivi regiji, je lahko povezana s patogenezo nekaterih bolezni, kot so revmatoidni artritis, IgA nefropatija, Henoch-Schönleinova purpura, prirojena motnja glikozilacije in folikularni limfom. Zaradi sprememb v glikozilaciji so lahko v serumu povišane koncentracije neustrezno glikoziliranih imunoglobulinov, ki bi lahko predstavljali potencialne biološke označevalce v diagnostiki in prognozi bolezni (5), lahko pa takšni imunoglobulini predstavljajo tarče (antigen) za avtoprotitelesa in nadaljnji imunski odziv.

1.3 Imunoglobulin A

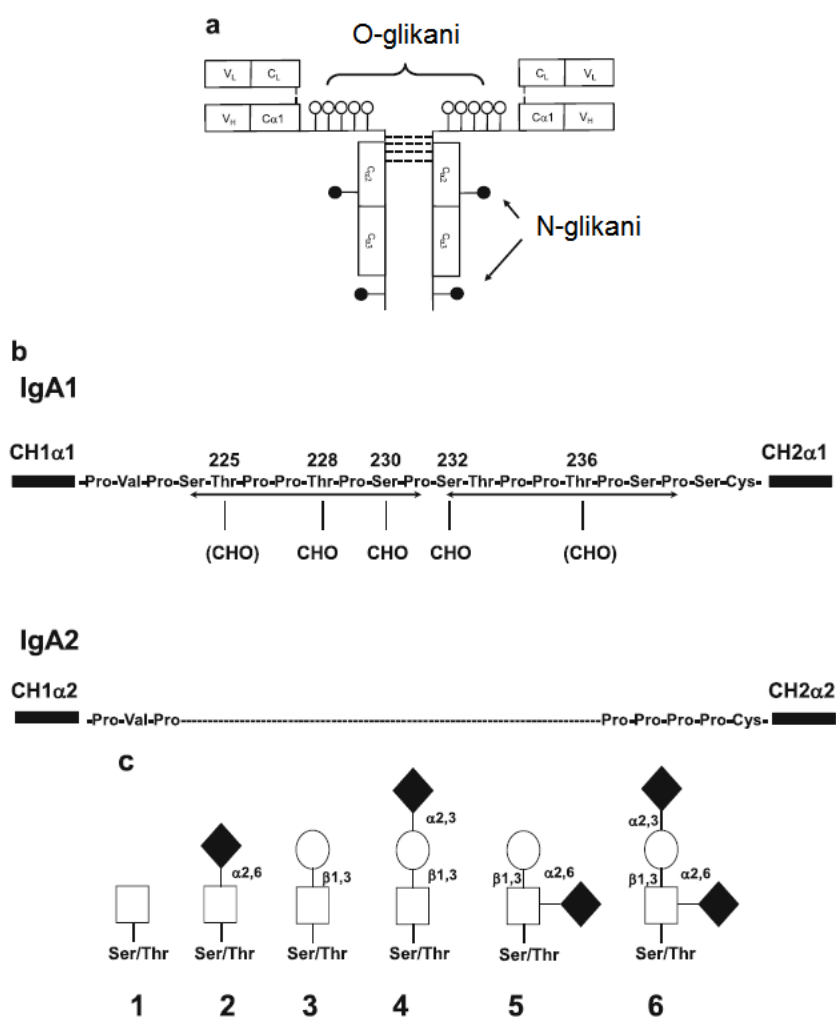
IgA je pomemben imunoglobulin, ki sodeluje v imunskem odzivu v človeški sluznici (6). Predstavlja le 15–20 % celokupnih serumskih imunoglobulinov (3), vendar se ga dnevno proizvede ~66 mg/kg telesne teže, kar je precej več kot v primerjavi z IgG, ki je najbolj zastopan v krvnem obtoku (~25 mg/kg/dan), in ostalimi razredi (7). Obstajata dva podrazreda: IgA1 in IgA2. IgA1 najdemo predvsem v serumu (~85 % celotnega IgA oz. 0,6–3,5 g/l (8, 9)), medtem ko IgA2 prevladuje v telesnih izločkih (3, 8). Dimerne molekule so povezane z dodatnima polipeptidnima verigama (veriga J in sekrecijska veriga) (2). Strukturno sta težki verigi IgA1 in IgA2 zelo podobni, razlikujeta se v razširjenem delu gibljive regije, kjer ima IgA1 26 aminokislinskih ostankov, medtem ko ima IgA2 13 aminokislinskih ostankov (slika 2 b) (8). Težki verigi IgA2 nista povezani z disulfidnimi vezmi, ampak z nekovalentnimi vezmi (2).

Zaščitne lastnosti specifičnih IgA se izražajo predvsem v oviranju tesnega stika patogenih bakterij in virusov z epitelijskimi celicami. Zasedranje molekul IgA v plast sluzi, ki prekriva epitelij, verjetno omogoča sekrecijska veriga ter tako prepreči pritrditev bakterij in virusov. Poleg tega IgA nevtralizira številne bakterijske antigene in viruse (2).

1.4 Glikozilacija IgA1 v gibljivi regiji

IgA1 je eden redkih proteinov, na katerem lahko potečeta tako *N*-glikozilacija kot tudi *O*-glikozilacija (slika 2 a) (10, 11). Vsaka težka veriga vsebuje dve mesti za *N*-glikozilacijo (8). *O*-glikozilacija poteka v gibljivi regiji (17 aminokislin), ki je bogata s prolinom, serinom in treoninom. Serin in treonin predstavljata devet potencialnih mest za vezavo

O-glikanov, vendar se ti vežejo na največ šestih mestih, vzorec vezanih monosaharidov pa je zelo raznolik (8–11).



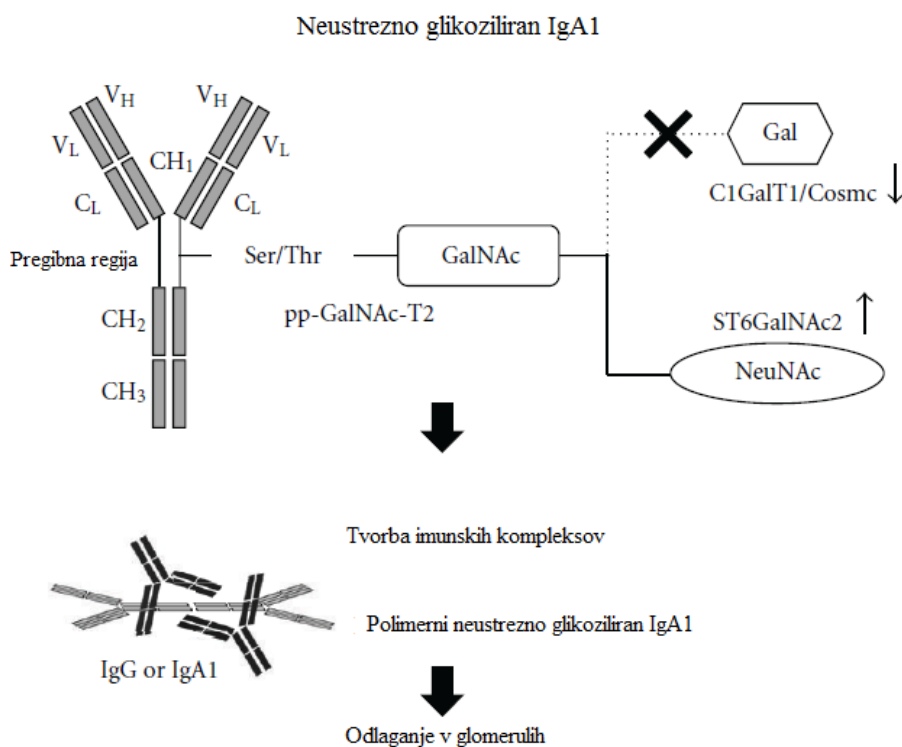
Slika 2: Struktura IgA (povzeto po 8). **a** Vsaka težka veriga humanega IgA1 ima vezana dva *N*-glikana in do šest *O*-glikanov. **b** Aminokislinsko zaporedje v gibljivi regiji humanega IgA1 in IgA2. Oštevilčene aminokisliline predstavljajo pogosta vezavna mesta *O*-glikanov. **c** Strukturne različice *O*-glikanov, vezanih na IgA1. Strukturi 1 in 2 predstavljata neustrezno glikoziliran IgA1, strukture 3–6 predstavljajo normalno glikoziliran IgA1. Simboli: \square – GalNAc, \circ – galaktoza, \blacklozenge – sialična kislina.

O-glikozilacija IgA1 poteka v Golgijevem aparatu pod vplivom glikoziltransferaz. Pri normalnih humanih IgA (slika 2 c, strukture 3–6) se glikozilacija začne z vezavo *N*-acetilgalaktozamina (GalNAc) na treonin ali serin v gibljivi regiji imunoglobulina; reakcijo katalizira encim polipeptid *N*-acetilgalaktozaminil-transferaza (pp-GalNAc-T),

kjer ima pp-GalNAc-T2 najpomembnejšo funkcijo. V naslednji stopnji se na GalNAc preko β 1,3 vezi veže galaktoza (Gal). Vezava je posredovana preko encima imenovanega osrednja 1 β 1,3 galaktoziltransferaza (C1Gal-T1) in je odvisna od prisotnosti šaperona Cosmc. V zadnji stopnji poteče še vezava sialične kisline na GalNAc preko α 2,6 vezi in na Gal preko α 2,3 vezi, ki je posredovana z α 2,6-GalNAc-sialiltransferazo 2 (ST6GalNAc2) (10, 12–14).

1.5 Neustrezno glikoziliran IgA1

Pri študijah O-glikozilacije so ugotovili, da se pri bolnikih z IgA nefropatijo in nekaterih otroci z Henoch-Schönleinovo purpuro pojavlja neustrezno glikoziliran IgA1 (angl. *galactose-deficient IgA1*, *aberrantly glycosylated IgA1*), ki ima v gibljivi regiji manj galaktoze vezane na GalNAc (slika 2 c, strukturi 1 in 2) (15). Mehanizmi, ki privedejo do neustrezne glikozilacije, še niso povsem pojasnjeni. Suzuki in sodelavci so iz krvi bolnikov z IgA nefropatijo pripravili z Epstein Barr virusom transformirane nesmrtno celične linije limfocitov, ki proizvajajo neustrezno glikozilirane IgA1. Z *in vitro* študijami na teh celicah so ugotovili zmanjšano aktivnost encima C1GalT1 in povišano aktivnost ST6GalNAc. Tudi neravnovesje med temi encimi se omenja kot možen vzrok za neustrezno glikozilacijo (12).



Slika 3: Neustrezno glikoziliran IgA1 in tvorba imunskih kompleksov (povzeto po 12).

Povišana raven neustrezno glikoziliranih IgA1 v serumu je povezana s povečanim tveganjem za napredovanje ledvične bolezni, vendar sama prisotnost teh imunoglobulinov ni zadosten razlog za sprožitev renalnih poškodb (16). Neustrezno glikoziliran IgA1 ima hkrati povečano težnjo za tvorbo agregatov. Deluje tudi kot avtoantigen, saj pomanjkanje Gal izpostavi molekule GalNAc, ki jih prepoznajo normalno prisotna protitelesa IgG in IgA1 (7, 17). Neustrezno glikoziliran IgA1 s temi protitelesi tvori imunske komplekse, ki se lahko izogonej razgradnji v jetrih (6, 7, 17). Z *in vitro* študijami na kultiviranih humanih mezangijskih celicah so dokazali, da imajo imunski kompleksi z neustrezno glikoziliranim IgA1 večjo afiniteto za vezavo na komponente zunajceličnega matriksa, kot so fibronektin, kolagen tipa IV, zato se z visoko afiniteto vežejo na mezangijske celice v ledvicah, kjer se nato kopičijo (14). Večji kompleksi (> 700 kDa) sprožijo tudi proliferacijo mezangijskih celic in apoptozo, povečajo sintezo komponent zunajceličnega matriksa (7) ter povečajo sproščanje TNF α , IL-6 in TGF β (17). Neustrezno glikoziliran IgA zmanjša produkcijo vaskularnega endotelijskega rastnega faktorja (VEGF) in spremeni ekspresijo integrina (14). Kompleksi ali agregati z neustrezno glikoziliranim IgA spodbujajo tudi aktivacijo komplemента v glomerulih (14, 17).

Depozite IgA lahko najdemo tudi v glomerulnem mezangiju pri drugih sistemskih boleznih kot so kronično vnetje jeter, Crohnova bolezen, adenokarcinom črevesja, kronična obstruktivna bronhiektazija, idiopatska intersticijska pljučnica, dermatitis herpetiformis, gobavost (lepra) in Sjögrenov sindrom. Vendar IgA depoziti pri teh boleznih niso povezani s klinično značilnim glomerulnim vnetjem ali ledvično disfunkcijo (4).

1.5.1 IgA nefropatija

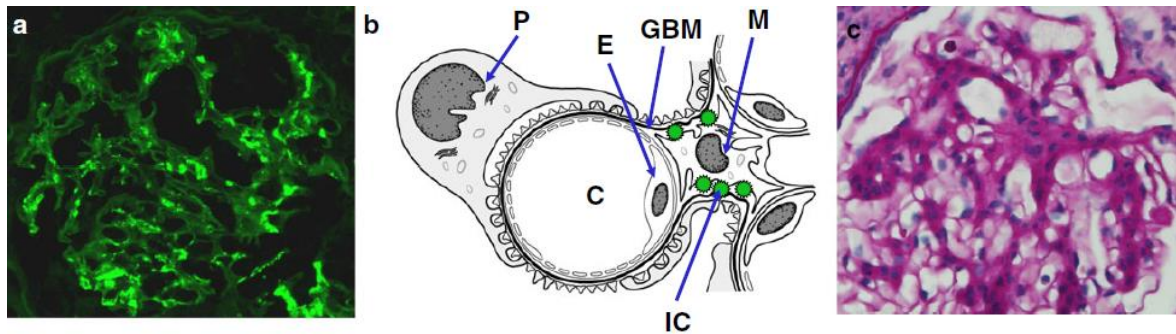
IgA nefropatija je imunokompleksni glomerulonefritis, za katerega so značilni difuzni depoziti IgA v glomerulnem mezangiju. Je najpogostejši primarni glomerulonefritis v razvitem svetu, ki se lahko pojavi tako pri odraslih kot tudi pri otrocih, najpogosteje pa v drugem in tretjem desetletju življenja. Bolezen je pogostejša pri moških, ki obolevajo 2- do 6-krat pogosteje kot ženske. Tudi v Sloveniji je med primarnimi glomerulonefritisi IgA nefropatija najpogostejša in predstavlja okrog 30 % vseh glomerulonefritisov. Za potrditev diagnoze je treba narediti ledvično biopsijo, ki jo pri asimptomatskih bolnikih z mikroskopsko eritrociturijo redko naredijo, zato bolezen pogosto ne odkrijejo in je njena pojavnost verjetno še večja (6).

Bolezen se najpogosteje kaže s ponavljajočimi zagoni makroskopske hematurije, ki se pojavi sočasno z okužbo zgornjih dihal, ali z asimptomatsko mikroskopsko hematurijo. Med zagoni je urinska analiza normalna (4). Pri nekaterih bolnikih se IgA nefropatija kaže kot kronični nefritični sindrom, nefrotski sindrom ali redko tudi kot akutna ledvična odpoved. Napovedniki slabe prognoze so moški spol, višja starost, zmanjšano ledvično delovanje ob odkritju bolezni, proteinurija več kot 1 g dnevno, arterijska hipertenzija in spremembe pri histološki analizi ledvičnega biopta (6).

IgA nefropatije ne moremo pozdraviti, lahko pa upočasnimo njeno napredovanje (6). Pri 20–40 % bolnikov bolezen privede do ledvične odpovedi (7). Pri bolnikih z IgA nefropatijo, ki so jim presadili ledvice, se bolezen ponovi na presadku pri 60 % bolnikov, tveganje za ponovitev bolezni pa se povečuje s časom po presaditvi. Vendar ni dokazov, da bi bilo preživetje presajenih ledvic bolnikov z IgA nefropatijo zaradi tega slabše kot pri ostalih bolnikih po presaditvi ledvice (6). Zanimivo je tudi, da depoziti IgA v presadku, ki ga prejme bolnik brez IgA nefropatije, hitro izginejo (6, 12).

1.5.2 Diagnoza IgA nefropatije

Za dokončno diagnozo IgA nefropatije in oceno resnosti poškodbe tkiva je potrebna histopatološka preiskava ledvičnega biopta, kjer vzamejo vzorce ledvične skorje in jih pregledajo z imunofluorescenčnim, svetlobnim in elektronskim mikroskopom (slika 4) (8). V literaturi omenjajo več novih potencialnih diagnostičnih in prognozičnih bioloških označevalcev, ki bi lahko olajšali diagnozo in prognozo bolezni. Glede na vlogo neustrezno glikoziliranega IgA1 pri razvoju bolezni so Moldoveanu in sodelavci raziskovali njegovo raven v serumu in ugotovili, da je ta pri bolnikih IgA nefropatijo značilno višja kot pri zdravi populaciji (18). Drugi potencialni biološki označevalec je IgG, specifičen za neustrezno glikoziliran IgA1. Raven teh protiteles je v serumu nekaterih bolnikov z IgA nefropatijo značilno povišana in korelira s proteinurijo (19). V urinu bolnikov z IgA nefropatijo so našli povišano raven neustrezno glikoziliranega IgA1 oz. imunskih kompleksov z IgA, kar prav tako nakazuje na možnost uporabe za razvoj neinvazivne preiskave za IgA nefropatijo (20).



Slika 4: Mikroskopske in strukturne značilnosti glomerulov pri IgA nefropatiji (8). **a** Fluorescenčna mikroskopska slika glomerula bolnika z IgA nefropatijo. **b** Shematski prikaz glomerulne kapilare s tipičnimi strukturnimi značilnostmi. E – endotelijska celica, C – kapilara, GBM – glomerulna bazalna membrana, IC – depoziti imunskih kompleksov, M – mezangijska celica, P – podocit. **c** Slika svetlobnega mikroskopa, ki kaže razširjen mezangijski matriks.

1.5.3 Henoch-Schönleinova purpura

Za Henoch-Schönleinovo purpuro so značilne tipične kožne spremembe v obliki tipne netrombocitopenične purpore, prizadeti pa so lahko tudi drugi organi. Bolniki imajo v serumu tudi povišano raven IgA, ki se odlagajo v kožo in ledvice. Imunohistološko so ob stenah žil, prizadetih zaradi vaskulitisa, značilno vidni depoziti IgA in komponente komplementa C3 ter fibrina. Gre predvsem za bolezen otrok, vendar lahko zbolijo tudi odrasli. Najverjetnejši vzrok bolezni je preobčutljivostna reakcija na antigene bakterij ali virusov, sprožijo pa jo lahko tudi alergeni v hrani, zdravilih ali alergeni, vneseni ob piku žuželk (21).

Pri približno 40 % otrok z Henoch-Schönleinovo purpuro se razvije nefritis. V primerjavi z bolniki, pri katerih se ta ne razvije, imajo ti bolniki rahlo povišano raven neustrezno glikoziliranih IgA1 (15).

1.6 Metode za analizo neustrezno glikoziliranega IgA1

Analiza *O*-glikanov pri IgA1 se je izkazala za tehnično zahtevno zaradi več molekulskih oblik IgA1, narave gibljive regije, kjer so pripeti *O*-glikani, in izredne raznolikosti *O*-glikozilacije. Za analizo je bilo uporabljenih več različnih tehnik: encimskoimunska metoda (ELISA) z vezavo lektina na molekulo IgA1, analiza strukture monosaharidov s plinsko-tekočinsko kromatografijo, masna spektroskopija in prenos po Westernu. ELISA je v primerjavi z ostalimi metodami, ki so drage in zahtevne, relativno hitra, poceni, dovolj visoko zmogljiva in enostavnejša za izvedbo (8, 18).

1.6.1 Encimskoimununska tehnika na trdni podlagi (ELISA)

ELISA (angl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) je imunska tehnika, s katero lahko dokazujemo prisotnost antigena ali protiteles v vzorcu in temelji na specifični reakciji antigen-protitelo. Tehnika je primerna za določanje protiteles in antigena ob uporabi standarda in umeritvene krivulje. Zaradi enostavnosti in občutljivosti tehnike je zanesljiva in primerna za presejalne preizkuse velikega števila vzorcev (22).

Tehniko ELISA lahko izvedemo na kompetitivni ali nekompetitivni način, sam nekompetitivni način pa omogoča tudi več različnih tipov izvedbe (23), ki so shematično prikazani na sliki 5:

- direktna ELISA

V vdolbinice mikrotitrne ploščice najprej nanese vzorec, v katerem določamo antigen, ki se veže na površino vdolbinic, nato pa dodamo protitelesa, ki so specifična za antigen in označena z encimom. Po dodatku encimskega substrata poteče barvna reakcija, katere intenziteto določamo spektrofotometrično.

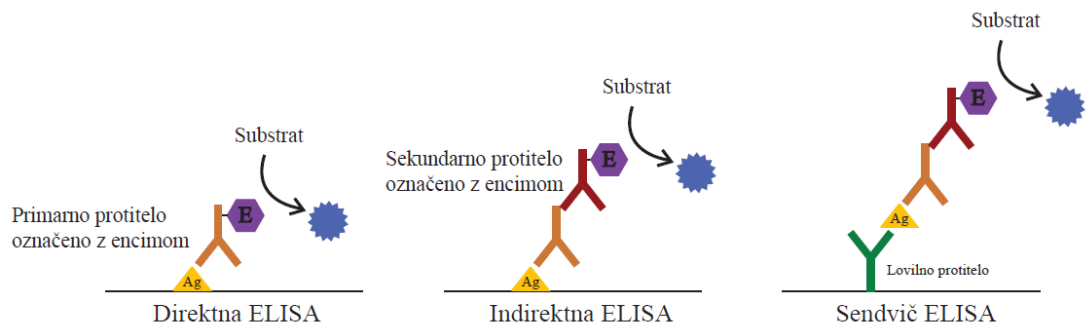
- indirektna ELISA

V vdolbinice mikrotitrne ploščice najprej dodamo vzorce z iskanim antigenom. Po dodatku primarnih protiteles dodamo še sekundarna protitelesa, označena z encimom. Po dodatku encimskega substrata poteče barvna reakcija, katere intenziteto določamo spektrofotometrično.

- sendvič ELISA

Na površino vdolbinic mikrotitrne ploščice najprej vežemo (lovilno) protitelo, ki je specifično za antigen. Nato dodamo vzorec, v katerem določamo antigen; slednji mora imeti več epitopov za vezavo protiteles, ki so prostorsko ločeni. Antigen določamo z detekcijskimi protitelesi, ki so lahko encimsko označeno ali uporabimo še sekundarna encimsko označena protitelesa. Po dodatku encimskega substrata poteče barvna reakcija, katere intenziteto določamo spektrofotometrično. Ta ELISA je visoko specifična in občutljiva (22).

Glede na vrsto označevalca (encim, fluorofor, izotop) izmerimo specifičen signal (absorbanco, fluorescenco, luminiscenco ali radioaktivnost), ki je sorazmeren s količino nastalega produkta.



Slika 5: Tipi ELISA metod.

1.6.2 HAA-IgA ELISA

Za diagnozo IgA nefropatije je potrebna ledvična biopsija. Da bi se izognili tej invazivni metodi, predvsem pri bolnikih z milejšo obliko bolezni, so Moldoveanu in sodelavci skušali razviti manj invazivno diagnostično metodo. Z indirektno sendvič ELISA metodo so v serumu bolnikov z IgA nefropatijo dokazovali neustrezno glikozilirani IgA1 (18). Kot vmesno stopnjo so za dokazovanje uporabili lektin iz vrtnega polža (*Helix aspersa*, HAA), ki se specifično veže na GalNAc (24).

1.7 Vrednotenje analitičnih metod

V medicinskih laboratorijih pogosto uvajajo nove ali že optimizirane metode, ki pa jih je potrebno pred sprejetjem v rutinsko rabo laboratorija ustrezno ovrednotiti. Vrednotenje, s katerim preverimo, če nam metoda daje ustrezne in uporabne rezultate, poteka po zahtevah smernic. Za vrednotenje učinkovitosti sistema se najpogosteje uporabljajo natančnost, točnost, linearnost, analizna občutljivost (meja detekcije, meja kvantifikacije), analizna specifičnost in stabilnost sistema. S praktičnega vidika je pomembna tudi robustnost (25), kjer gre za (ne)občutljivost metode na manjše spremembe analitskih pogojev. Pomembno je, da metoda daje ponovljive rezultate, ne glede na to ali analizo izvaja ista ali druga oseba, ali se analiza izvaja v istem ali drugem laboratoriju, ob uporabi drugih reagentov in opreme (26).

2 NAMEN DELA

Moldoveanu in sodelavci so razvili encimskoimunsko metodo na trdnem nosilcu (HAA-IgA ELISA) za določanje neustrezno glikoziliranih IgA1, ki se v literaturi omenjajo kot potencialni biološki označevalci IgA nefropatije. Princip metode so do sedaj povzele še nekatere druge raziskovalne skupine ter primerjalno ovrednotile nivo neustrezno glikoziliranih IgA pri bolnikih z IgAN v svoji populaciji, kot komercialna diagnostična metoda pa še ni na voljo.

Namen našega eksperimentalnega dela je prilagoditev in vrednotenje ELISA metode za določanje neustrezno glikoziliranih IgA1 za potencialno rutinsko uporabo v prihodnosti.

Z analizo serumskih vzorcev bolnikov z IgA nefropatijo ter kontrolnimi plazemskimi in serumskimi vzorci krvodajalcev bomo ovrednotili analizo specifičnost, natančnost in linearnost ELISA metode.

Z nefelometrično metodo bomo izmerili tudi celokupno koncentracijo IgA v serumu ter primerjali korelacijo s koncentracijo neustrezno glikoziliranih IgA1.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Vzorci

3.1.1 Vrste vzorcev

Za določanje neustrezno glikoziliranih IgA1 z ELISA metodo smo uporabili 40 serumskih vzorcev bolnikov z IgA nefropatijo, katerim so diagnozo potrdili s histološkim pregledom ledvičnega biopta. Med bolniki je bilo 27 oseb moškega spola in 13 oseb ženskega spola, starih od 21 do 79 let. Vzorci so bili pridobljeni s Kliničnega oddelka za nefrologijo (Univerzitetni klinični center Ljubljana), v času med januarjem 2012 in januarjem 2013 v postopku redne diagnostike in spremljanja bolezni.

Za kontrolno skupino smo uporabili 10 serumskih vzorcev zdravih krvodajalcev in 60 plazemskih vzorcev (EDTA) zdravih krvodajalcev, pridobljenih iz Zavoda Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, po predhodni odobritvi Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko (št. 54/06/12).

3.1.2 Priprava in shranjevanje vzorcev

Serumski vzorci so bili pripravljani z odvzemom krvi v epruveto brez antikoagulantov. Kri je bila inkubirana na sobni temperaturi 30–45 minut, da je nastal krvni strdek, in centrifugirana 15 minut pri 1200 x g. Dobljeni supernatant predstavlja serum, ki je tekoča frakcija krvi brez krvnih celic in faktorjev strjevanja krvi. Serum smo alikvotirali in do analize shranili na –80 °C.

Plazemski vzorci so bili dobljeni z odvzemom krvi v epruveto z antikoagulantom (EDTA) in centrifugirani 15 minut pri 1200 x g. Dobljeni supernatant predstavlja plazmo. Vzorci so bili do analize shranjeni na –80 °C.

3.1.3 Rekalifikacija plazme

Rekalifikacijo plazme smo izvedli po protokolu smernic za serološko testiranje HIV-a (27).

Raztopino CaCl₂ smo pripravili tako, da smo natehtali 0,028 g CaCl₂ in ga raztopili v 1 ml ultračiste vode. Nato smo 4 µl raztopine dodali k 100 µl plazemskega vzorca, tako da je bila končna koncentracija CaCl₂ v vzorcu 0,1 M. Vzorec smo dobro premešali in eno uro inkubirali na vodni kopeli na 37 °C, da je nastal strdek. V primerih, ko v plazmi ni nastal strdek, smo vzorcem dodali še dodatne 4 µl raztopine CaCl₂ in še eno uro inkubirali na

vodni kopeli na 37 °C, dokler ni nastal strdek. Vzorce smo nato odstranili z vodne kopeli, jih ohladili in zamrznili na –80 °C čez noč. Naslednji dan smo vzorce odtalili na sobni temperaturi in centrifugirali 5 minut pri 1500 x g ter ločili serum od fibrinskega strdka.

3.2 Materiali

3.2.1 Reagenti in kemikalije

- prečiščen F(ab')₂ fragment kozjega protitelesa proti humanemu serumskemu IgA, specifičen za α verigo (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, ZDA)
- nevraminidaza (sialidaza) iz *Vibrio cholerae* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Nemčija)
- lektin iz vrtnega polža (*Helix aspersa*), konjugiran z biotinom (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, ZDA)
- ExtrAvidin-peroksidaza (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, ZDA)
- TMB substrate kit (raztopina TMB in raztopina peroksida) (Thermo Scientific, Rockford, IL, ZDA)
- humani IgA kappa, izoliran iz humanega mielomskega seruma (InvivoGen, San Diego, CA, ZDA)
- goveji serumski albumin, BSA (A6003 in A3059, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, ZDA)
- Tween 20 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, ZDA)
- NaCl
- KCl
- Na₂HPO₄·12H₂O
- KH₂PO₄
- 1 M HCl
- 1 M NaOH
- Na(CH₃COO) · 3H₂O
- CH₃COOH
- 96% H₂SO₄
- 37% HCl

3.2.2 Aparature in oprema

- spektrofotometrični čitalec mikrotitrskih ploščic SunriseTM, (Tecan, Männedorf, Švica)
- spektrofotometrični čitalec mikrotitrskih ploščic Safire², (Tecan, Männedorf, Švica)
- spektrofotometrični čitalec mikrotitrskih ploščic GENios, (Tecan, Männedorf, Švica)
- stresalnik in inkubator Environmental Shaker-Incubator ES-20 (Biosan, Riga, Latvija)
- pH meter SevenEasyTM (Mettler-Toledo, Columbus, ZDA)
- tehtnica Exacta 300 EB (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- vrtinčnik Vortex 3 (IKA, Staufen, Nemčija)
- sistem za spiranje mikrotitrskih plošč Nunc-ImmunoTM Wash 12 (Thermo Fischer Scientific, Roskilde, Danska)
- magnetno mešalo Rotamix 560 MMH (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- mikrotitrške plošče Nunc-ImmunoTM Plates F96 MaxiSorp (Thermo Fischer Scientific, Roskilde, Danska)
- pipete

3.2.3 Priprava pufrov in raztopin

10x PBS – izotonični fosfatni pufer

NaCl	80,0 g
KCl	2,0 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	36,3 g
KH ₂ PO ₄	2,4 g
destilirana voda	1000 ml

1x PBS – izotonični fosfatni pufer (pH = 7,4)

10x PBS	100 ml
destilirana voda	900 ml

- umerimo pH na 7,4 z 1 M HCl oz. 1 M NaOH

spiralni pufer: 1x PBS-0,05% Tween 20

Tween 20	1 ml
1x PBS	2000 ml

blokirni pufer: 2% BSA v 1x PBS-0,05% Tween 20

BSA	2 g
1x PBS-0,05% Tween 20	100 ml

100 mM Na-acetat

0,1 M očetna kislina:

CH ₃ COOH	580 µl
destilirana voda	do 100 ml

0,1 M Na-acetat:

Na(CH ₃ COO) · 3H ₂ O	1,36 g
destilirana voda	100 ml

100 mM Na-acetat:

0,1 M očetna kislina	14,8 ml
0,1 M Na-acetat	35,2 ml
destilirana voda	do 100 ml
- umerimo pH na 5,0	

10 mM Na-acetat

100 mM Na-acetat	5 ml
destilirana voda	45 ml

ustavitveni reagent: 2 M H₂SO₄

96% H ₂ SO ₄	11,10 ml
destilirana voda	do 100 ml

1 M HCl

37% HCl	4,14 ml
destilirana voda	do 50 ml

1 M NaOH

NaOH	4 g
destilirana voda	100 ml

1 M CaCl₂

CaCl ₂	0,11 g
ultračista voda	1 ml

3.3 Metode

3.3.1 Encimskoimunska metoda na trdnem nosilcu (ELISA)

Za določanje neustrezno glikoziliranih IgA1 smo z nekaj spremembami povzeli princip ELISA metode (slika 6), ki so jo razvili Moldoveanu in sodelavci (18).

1. dan

- Pri delu smo uporabljali polistirenske mikrotitrne ploščice s 96 vdolbinicami v katere smo nanesti po 100 µl primarnega (lovilnega) protitelesa - F(ab')₂ fragment kozjega IgG protitelesa proti humanemu IgA, razredčenega v PBS (pH = 7,4).
- Ploščico smo pokrito s plastičnim pokrovom inkubirali čez noč (17–21 h) v hladni sobi na 4 °C.

2. dan

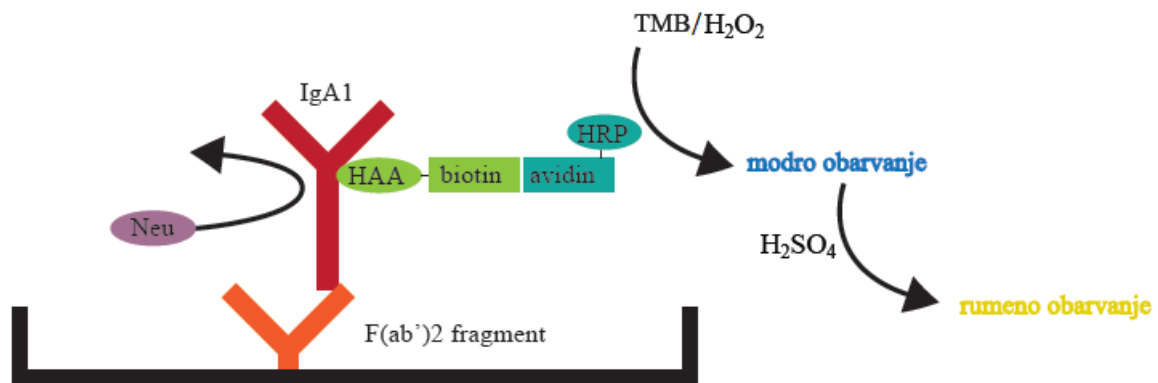
- Najprej smo odlili raztopino iz vdolbinic, otresli ploščico in sprali nevezana protitelesa s 3x 300 µl spiralnega pufra (PBS-0,05% Tween 20) na vdolbinico. Med spiranjem smo ploščico vsakič 1 minuto stresali na stresalniku (hitrost stresanja: 140 vrtljajev na minuto).
- Po spiranju smo v vdolbinice nanesti po 300 µl blokirnega pufra (2% BSA v PBS-0,05% Tween 20), da bi preprečili nespecifične vezave proteinov iz seruma na ploščico. Ploščico smo pokrito s plastičnim pokrovom inkubirali 1 uro na sobni temperaturi (20–25 °C).

- Blokirni pufer smo odlili in ponovno trikrat sprali s 300 μ l spiralnega pufru na vdolbinico, z vmesnim stresanjem 1 minuto na stresalniku (140 vrtljajev na minuto).
- Nato smo v vdolbinice v dvojniku nanesti serumske vzorce, razredčene v blokirnem pufru. V vsako vdolbinico smo nanesti po 100 μ l razredčenega seruma. Za merjenje analiznega ozadja smo uporabili blokirni pufer.
- Ploščico smo pokrito z gumijasto membrano in plastičnim pokrovom čez noč (20–22 h) inkubirali na sobni temperaturi (20–25 °C).

3. dan

- Najprej smo odlili vzorce iz vdolbinic, otresli ploščo in trikrat sprali nevezana protitelesa iz vzorca s 300 μ l spiralnega pufru na vdolbinico z vmesnim stresanjem 1 minuto na stresalniku (140 vrtljajev na minuto).
- V vsako vdolbinico smo nanesti po 100 μ l nevraminidaze, razredčene v 10 mM Na-acetatu (pH = 5,0). Na-acetatu smo pred tem dodali še kalcijeve ione, in sicer tako, da smo k Na-acetatu dodali 1 M raztopino CaCl₂, da smo dobili končno koncentracijo kalcijevih ionov 3 mM. Ploščico smo inkubirali 3 ure na 37 °C, pokrito z gumijasto membrano in plastičnim pokrovom.
- Raztopino smo odlili iz vdolbinic, ploščico trikrat sprali s po 300 μ l spiralnega pufru na vdolbinico z vmesnim stresanjem 1 minuto na stresalniku (140 vrtljajev na minuto).
- Nato smo v vdolbinice dodali po 100 μ l z biotinom konjugiranega lektina iz vrtnega polža (*Helix aspersa*) (biotin-HAA), razredčenega v blokirnem pufru. Ploščico smo pokrito z gumijasto membrano in plastičnim pokrovom inkubirali 3 ure na 37 °C.
- Raztopino smo odlili iz vdolbinic in ploščico trikrat sprali s po 300 μ l spiralnega pufru na vdolbinico z vmesnim stresanjem 1 minuto na stresalniku (140 vrtljajev na minuto).
- V vdolbinice smo nanesti po 100 μ l ExtrAvidina z vezano hrenovo peroksidazo (ExtrAvidin-HRP), razredčenega v blokirnem pufru. Ploščico smo pokrito z gumijasto membrano in plastičnim pokrovom 1 uro inkubirali na 37 °C.

- Raztopino smo odlili iz vdolbinic in ploščico trikrat sprali s po 300 μl spiralnega pufru na vdolbinico z vmesnim stresanjem 1 minuto na stresalniku (140 vrtljajev na minuto).
- Nato smo nanegli po 100 μl raztopine substrata TMB z vodikovim peroksidom. Ploščico smo inkubirali v temi, 35 minut, na sobni temperaturi (20–25 $^{\circ}\text{C}$).
- Reakcijo smo ustavili s 100 μl 2 M H_2SO_4 na vdolbinico. Merjenje absorbance smo izvedli s spektrofotometričnim čitalcem mikrotitskih ploščic. Merili smo pri valovni dolžini 450 nm in 620 nm (referenčni filter).



Slika 6: Shema ELISA metode za določevanje neustrezno glikoziliranega IgA1 (Neu – nevraminidaza, HAA – lektin iz *Helix aspersa*, HRP – hrenova peroksidaza, TMB – 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin).

3.3.2 Nefelometrija

Merjenje celokupne koncentracije IgA je bilo izvedeno na Oddelku za laboratorijsko diagnostiko Splošne bolnišnice Jesenice, po protokolu za rutinsko merjenje celokupnih IgA v humanem serumu z nefelometrično metodo. Princip merjenja pri nefelometriji temelji na merjenju jakosti sipane svetlobe pod kotom 15–90 $^{\circ}$, ki je sorazmerna s koncentracijo merjenega proteina. Zaradi tvorbe imunskih kompleksov IgA s specifičnimi protitelesi v reagentu nastanejo namreč kompleksi, ki razpršijo žarek svetlobe, ki ga pošljemo skozi vzorec. Koncentracijo analita aparat nato preračuna iz umeritvene krivulje standardov znanih koncentracij.

Za meritve je bil uporabljen komplet N Antisera to Human Immunoglobulins (IgG, IgA and IgM) (LOT 153072, Siemens Healthcare Diagnostics Products, Marburg, Nemčija).

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

Vsako novo metodo, ki jo želimo uvesti v medicinski laboratorij, je potrebno optimizirati in ovrednotiti, preden lahko preverjamo klinično uporabnost rezultatov, pridobljenih s to metodo, oz. preden sprejmemo metodo v rutinsko uporabo (25). Tudi prenos že optimizirane metode iz enega v drugi laboratorij zahteva vrednotenje in preverjanje posameznih kritičnih faz. Zato smo ob postavitvi metode po postopku, opisanem v literaturi (18), preverili vse posamične faze postopka ter koncentracije uporabljenih reagentov.

Moldoveanu in sodelavci so razvili ELISA metodo za določanje neustrezno glikoziliranih IgA1 z namenom, da bi olajšali diagnozo IgA nefropatije. Slednja se trenutno dokazuje s histopatološko preiskavo, za katero pridobimo vzorec z invazivnim postopkom – ledvično biopsijo. ELISA metoda se je izkazala za najprimernejšo v primerjavi z ostalimi dražjimi in zahtevnejšimi metodami, kot so na primer plinsko-tekočinska kromatografija, masna spektroskopija in prenos po Westernu. Uspeli so dokazati, da obstaja značilna razlika med koncentracijami neustrezno glikoziliranega IgA1 pri bolni in zdravi populaciji. Diagnostična občutljivost rezultatov pridobljenih s to metodo je 76,5 %, diagnostična specifičnost pa 90 % (18). Z našim eksperimentalnim delom smo to metodo prilagodili in analitično ovrednotili.

4.1 Določitev optimalne koncentracije lovilnega protitelesa in optimalnega redčenja vzorca seruma ter reagentov biotin-HAA in ExtrAvidin-HRP

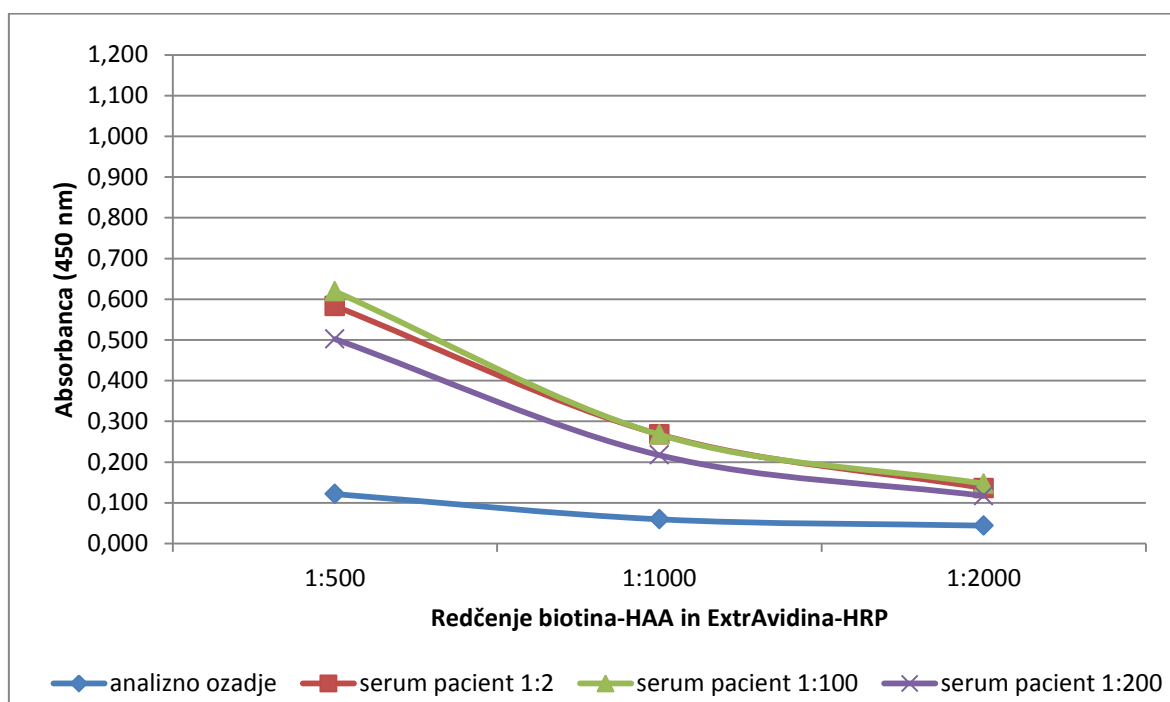
Za določanje neustrezno glikoziliranih IgA1 so Moldoveanu in sodelavci pri svoji ELISA metodi za določanje neustrezno glikoziliranih IgA1 uporabili raztopino lovilnega protitelesa s koncentracijo 3 mg/l in redčitev reagentov biotin-HAA in ExtrAvidin-HRP 1:500 (18). Za ExtrAvidin-HRP sicer proizvajalec pri ELISA metodah priporoča najmanjše redčenje 1:2000 (28).

Za določanje optimalne koncentracije lovilnega protitelesa, optimalnega redčenja vzorca, biotina-HAA in ExtrAvidina-HRP pri naši ELISA metodi smo reagente in vzorce pripravili v različnih koncentracijah. Koncentracije lovilnega protitelesa, ki smo jih pripravili, so bile 0,5, 3, 5 in 10 mg/l. Serumske vzorce bolnika z IgA nefropatijo smo redčili v razmerjih 1:2, 1:100 in 1:200, kot vzorec za merjenje analiznega ozadja pa smo uporabili blokirni puffer, s katerim smo tudi redčili serumski vzorec. Biotin-HAA in Extravidin-HRP smo redčili z

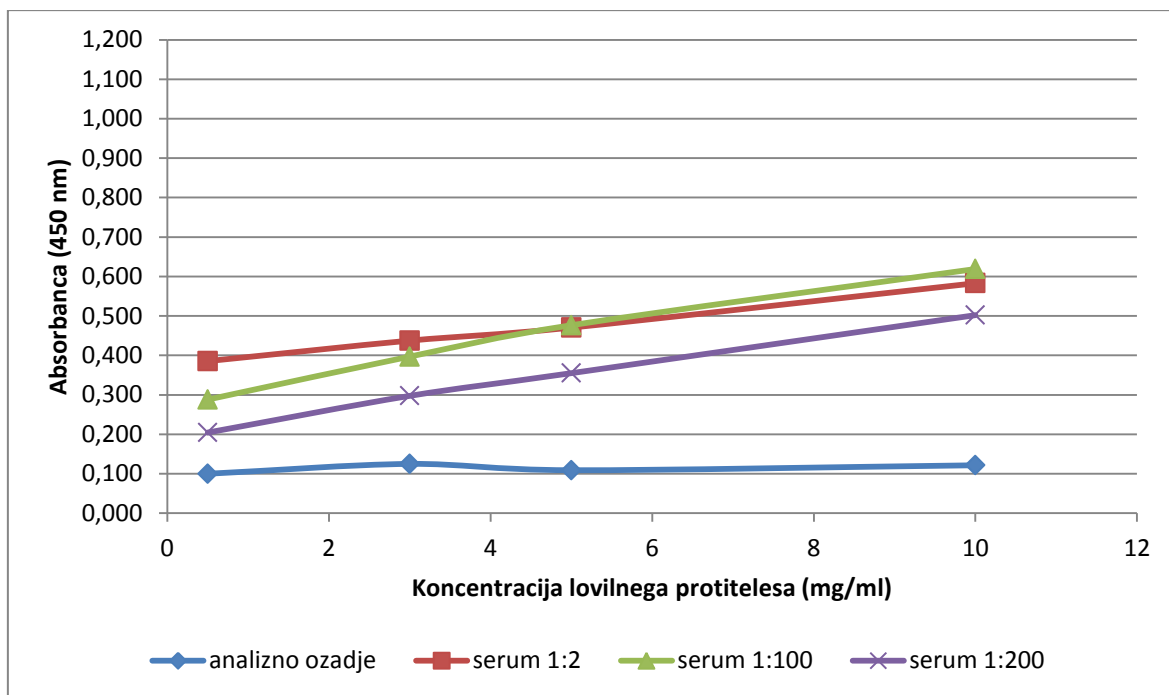
enakim volumnom blokirnega pufra, v razmerjih 1:500, 1:1000 in 1:2000. Raztopine reagentov in vzorcev smo na mikrotitrsko ploščico (s 96 vdolbinicami) nanesli v različnih kombinacijah, vsaka kombinacija pa je bila nanešana v dvojniku. Priporočeni volumni nanosov pri ELISA metodah so 50–100 μ l (29). Pri našem eksperimentalnem delu smo sprva vse raztopine reagentov in vzorcev nanašali v volumnu 50 μ l.

Najvišje absorbance smo dobili pri redčenju biotina-HAA in ExtrAvidina-HRP 1:500 in koncentraciji lovilnega protitelesa 10 mg/l (graf 1). Pri ostalih koncentracijah lovilnega protitelesa so bile absorbance nižje, vendar se je kazal enak trend padanja absorbance z večanjem faktorja redčenja biotina-HAA in ExtrAvidina-HRP. Glede na rezultate je bila za nadaljnja testiranja smiselna uporaba redčenja biotina-HAA in ExtrAvidina-HRP 1:500 in koncentracije lovilnega protitelesa 10 mg/l, saj so bile absorbance najvišje, prav tako pa je bila najvišja razlika med absorbanco serumskega vzorca in analiznega ozadja.

Pri redčenju vzorca v razmerjih 1:2 in 1:100 so bile absorbance primerljive, pri redčenju 1:200 pa je absorbanca že padla (graf 2), zato je bila smiselna nadaljnja uporaba redčenja 1:100, kjer je najboljše razmerje med absorbanco in porabo vzorca.



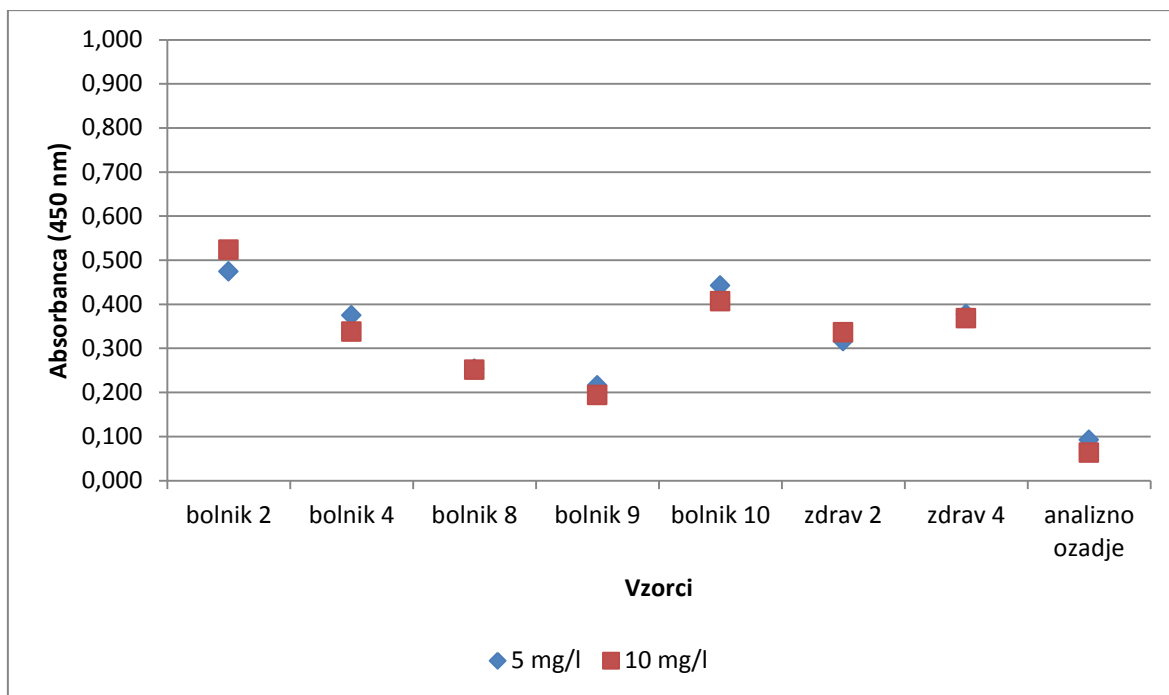
Graf 1: Odvisnost absorbance od redčenja biotina-HAA in ExtrAvidina-HRP, pri različnih redčenjih serumskega vzorca bolnika in konstantni koncentraciji lovilnega protitelesa 10 mg/l.



Graf 2: Odvisnost absorbance od koncentracije lovilnega protitelesa pri različnih redčenjih seruma bolnika (redčenje biotina-HAA in ExtrAvidina-HRP 1:500).

Da bi dobili višje absorbance, smo v nadaljnjih testiranjih volumen nanosa raztopin reagentov in vzorcev povečali s 50 μ l na 100 μ l in ponovno primerjali absorbance pri koncentracijah lovilnega protitelesa 5 in 10 mg/l, vendar tokrat z več vzorci bolnikov in zdravih. Absorbance, ki smo jih dobili (graf 3), so bile pri koncentracijah 5 in 10 mg/l primerljive, zato smo se odločili za nadaljnjo uporabo koncentracije lovilnega protitelesa 5 mg/l, saj je ob enakem učinku strošek izvedbe nižji.

Končna kombinacija, ki je pokazala najbolj optimalno razmerje med porabo reagentov in vzorcev ter odzivom, in smo jo uporabljali pri vseh nadaljnjih analizah, je bila: koncentracija lovilnega protitelesa 5 mg/l, redčenje serumskih vzorcev 1:100, redčenje biotina-HAA in ExtrAvidina-HRP 1:500, nanos po 100 μ l/ vdolbinico.



Graf 3: Absorbanca razredčenih serumov bolnikov in zdravih pri koncentracijah lovilnega protitelesa 5 in 10 mg/l.

4.2 Blokada

Raziskovalne skupine, ki so povzele ELISA metodo za določanje neustrezno glikoziliranih IgA1, so kot pufer uporabljale izotonični fosfatni pufer (PBS), ki so mu kot inertno substanco dodale goveji serumski albumin (BSA), kot površinsko aktivno snov pa Tween 20. Uporabljena koncentracija BSA je bila 1 % (28) oz. 2 % (13), koncentracija Tween-a 20 pa 0,05 %. Te blokirne pufre so uporabljali tudi za redčenje vzorcev, biotina-HAA in ExtrAvidina-HRP (13, 18).

Zaradi dveh različic blokirnih pufrov, ki so jih uporabljale raziskovalne skupine, smo na eni ploščici primerjalno testirali obe različici. Pripravili smo blokirne pufre z različnimi koncentracijami BSA (1%, 2%), Tween-a 20 (0,05%, 0,1% oz. brez dodatka Tween-a 20).

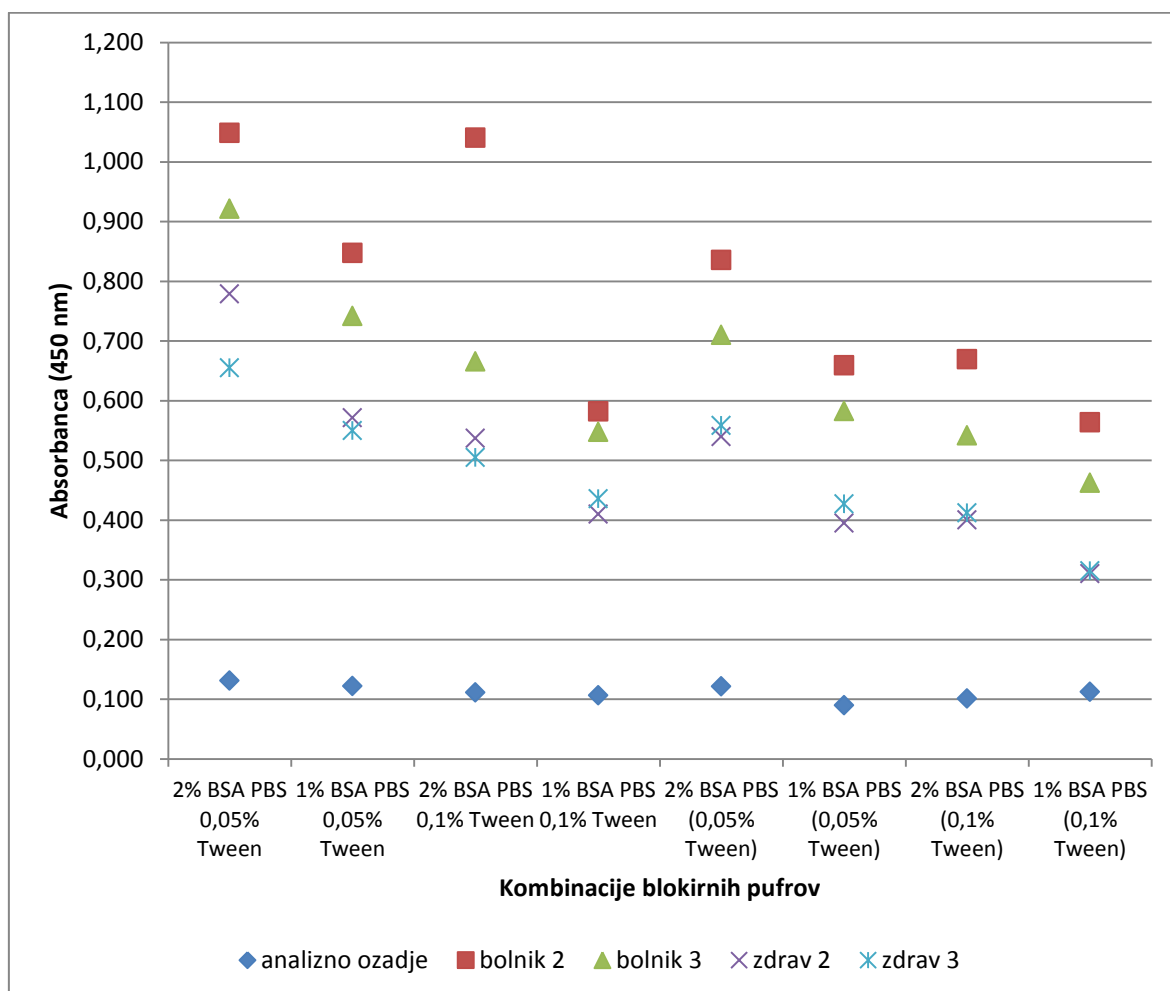
Kombinacije blokirnih pufrov, ki smo jih testirali, so bile:

- 2% BSA-PBS-0,05% Tween 20 (spiralni pufer z 0,05% Tween 20),
- 1% BSA-PBS-0,05% Tween 20 (spiralni pufer z 0,05% Tween 20),
- 2% BSA-PBS-0,1% Tween 20 (spiralni pufer z 0,1% Tween 20),
- 1% BSA-PBS-0,1% Tween 20 (spiralni pufer z 0,1% Tween 20),
- 2% BSA-PBS (spiralni pufer z 0,05% Tween 20),
- 1% BSA-PBS (spiralni pufer z 0,05% Tween 20),

- 2% BSA-PBS (spiralni pufer z 0,1% Tween 20),
- 1% BSA-PBS (spiralni pufer z 0,1% Tween 20).

Vsi ti blokirni pufri so bili uporabljeni tudi kot redčitveni pufri za vzorce, biotin-HAA in ExtrAvidin-HRP.

Pri kombinacijah brez Tween-a 20 so bile absorbance nekoliko nižje, ni pa bilo vpliva na absorbance analiznega ozadja (graf 4). Z dodatkom 0,05% koncentracije Tween-a 20 so se zvišale absorbance vzorcev bolnikov in zdravih. Absorbanca analiznega ozadja je bila v vseh kombinacijah primerljiva. Pri nobeni od testiranih kombinacij nismo opazili znatno večjega razmerja med odzivom vzorcev bolnika in zdravega. Glede na rezultate smo se zgolj na podlagi višjega odziva odločili, da bomo kot blokirni pufer uporabljali 2% BSA-PBS-0,05% Tween 20.



Graf 4: Primerjava različnih kombinacij blokirnih pufrov (BSA – goveji serumski albumin, PBS – izotonični fosfatni pufer).

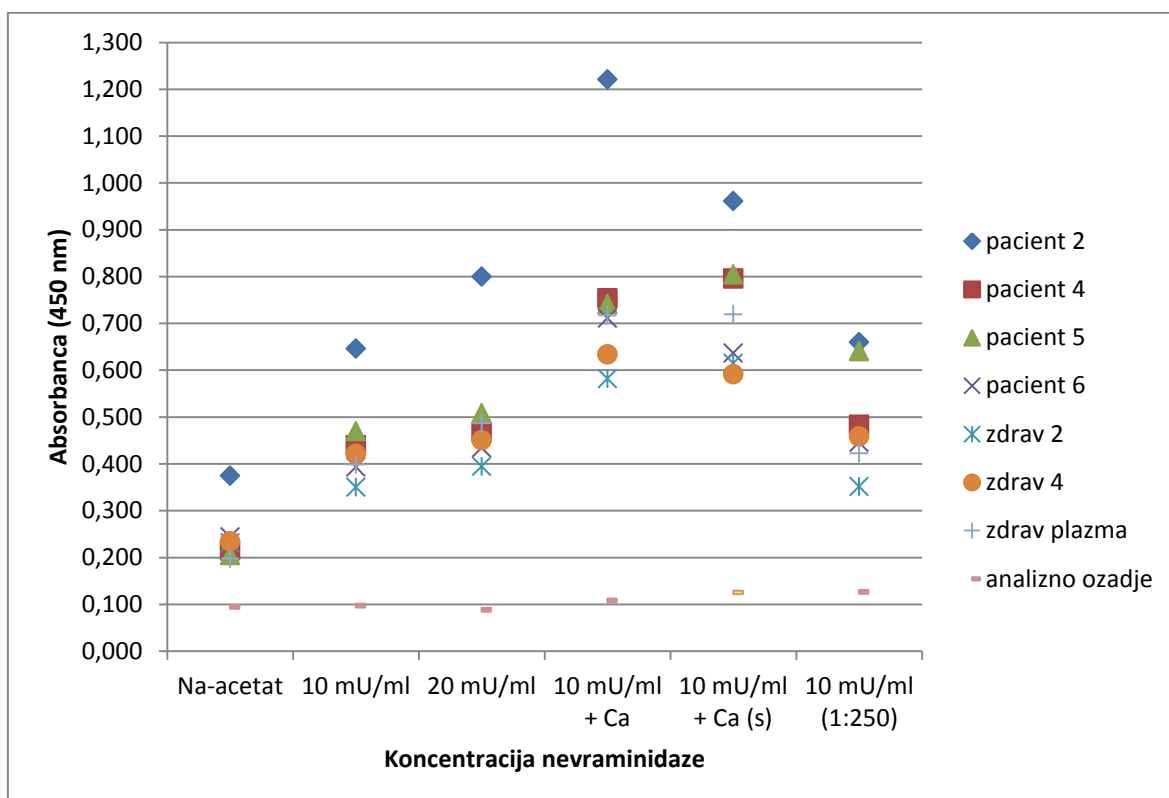
Blokirni pufri pri ELISA metodah običajno vsebujejo inertni protein ali zmes proteinov (npr. goveji serumski albumin, fetalni goveji serum, kazein) in/ali dodan neionski detergent. Inertni proteini preprečuje nespecifično adsorpcijo proteinov iz vzorca na površino mikrotitrne ploščice po nanosu lovilnega protitelesa, saj na plastični površini zasede preostala prosta mesta. Pomembno pa je, da v nadaljnjih fazah ne interagirajo s tarčnim proteinom iz vzorca ali reagenti (npr. konjugiranim protitelesom, encimom, substratom) (29). Polega tega pa s tem tudi preprečuje možnost denaturacije oz. izgubo native oblike tarčnega proteina iz vzorca, do katere lahko pride ob stiku s plastično površino (30). Blokirnemu pufri pa so običajno dodani tudi neionski detergenti (npr. Tween 20), ki v nizkih koncentracijah preprečujejo nespecifične hidrofobne interakcije med inertno substanco in tarčnim proteinom (biološko molekulo) oz. proteini v dodanih reagentih. Blokirni pufri se lahko uporabljajo tako za redčenje vzorcev kot tudi za spiranje med posameznimi fazami izvedbe metode (29). Uporaba blokirnih pufrov je zato priporočljiva za povečanje razmerja šum – signal, torej za zmanjšanje absorbance analiznega ozadja ter zvečanje analizne občutljivosti in specifičnosti metode (30).

4.3 Prilagajanje koncentracije in pogojev za encim nevraminidaza

Nevraminidaza je encim, ki iz oligosaharidov v glikoproteinih, glikolipidih in proteoglikanih odcepi *N*-acetilnevraminsko oz. sialično kislino (31). Pri neustrezno glikoziliranem IgA1 so v gibljivi regiji prisotni različni *O*-glikani, ki lahko imajo na galaktozi in *N*-acetilgalaktozaminu vezano sialično kislino (8). Suzuki in sodelavci so preverjali vpliv nevraminidaze na vezavo HAA pri neustrezno glikoziliranem IgA1. Pri tem so primerjali neustrezno glikoziliran IgA1 z neustrezno glikoziliranim IgA1, obdelanim z nevraminidazo. Izkazalo se je, da se po obdelavi z nevraminidazo vezava HAA na neustrezno glikoziliran IgA1 značilno povečala (13). Na aktivnost nevraminidaze pa kot kofaktorji vplivajo tudi v raztopino dodani kalcijevi ioni, ki povišajo aktivnost encima (32). Delovni pogoji za maksimalno aktivnost encimov morajo biti zelo natančno nadzorovani, aktivnost encima pa se lahko razlikuje tudi glede na uporabljeno serijo encima in proizvajalca.

Pri naši ELISA metodi smo prav tako preverjali vpliv nevraminidaze na vezavo lektina in s tem na višino absorbance. Kot redčitveni pufer za nevraminidazo smo uporabljali Na-acetat (pH = 5,0). Na mikrotitrsko ploščico smo nanegli različne kombinacije:

Na-acetat brez nevraminidaze, raztopino nevraminidaze s koncentracijami 10 mU/ml (to koncentracijo so uporabili Moldoveanu in sodelavci v svojem protokolu (18)), 20 mU/ml, 10 mU/ml s kalcijevimi ioni (3 mM), 10 mU/ml z dodanim segretim Na-acetatom (37°C) in 10 mU/ml z redčenjem biotina-HAA in EvtrAvidina-HRP 1:250. Najvišjo absorbanco smo dobili pri kombinaciji 10 mU/ml nevraminidaze z dodanimi kalcijevimi ioni (3 mM), najnižjo pa pri kombinaciji brez nevraminidaze (graf 5). S tem smo potrdili, da je absorbanca, in s tem tudi vezava HAA, pričakovano višja po obdelavi neustrezno glikozilirane IgA1 z nevraminidazo, hkrati pa ugotovili, da bi dodatek kalcijevih ionov lahko pomembno doprinesel k višji aktivnosti nevraminidaze in s tem k višjemu odzivu v ELISA metodi. V nadaljnjih analizah smo zato raztopini nevraminidaze vedno dodali sveže pripravljeno raztopino CaCl₂ (končna koncentracija kalcijevih ionov 3 mM).

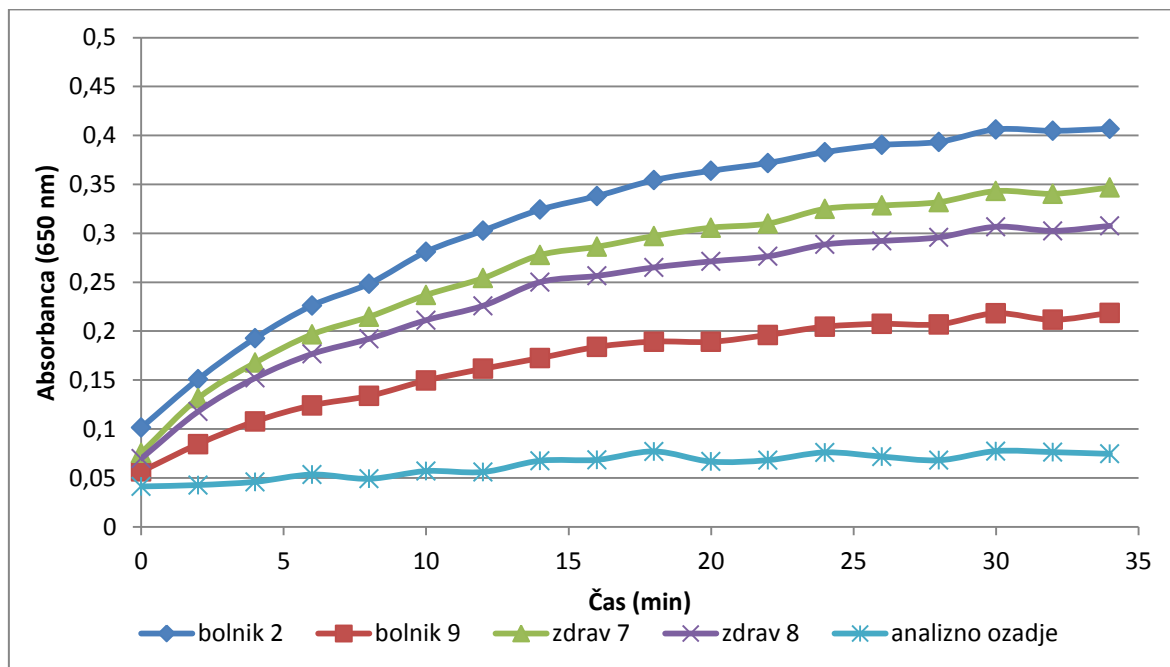


Graf 5: Odvisnost absorbance od koncentracije nevraminidaze in dodatka kalcijevih ionov.

4.4 Inkubacija substrata

Kot substrat je raziskovalna skupina, po kateri smo povzeli metodo, uporabljala *o*-fenilendiamin (OPD) (18). Pri naši metodi smo kot substrat uporabili 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB)/H₂O₂, ki je zaradi svoje občutljivosti in hitrega razvoja barve prav tako primeren za ELISA metodo.

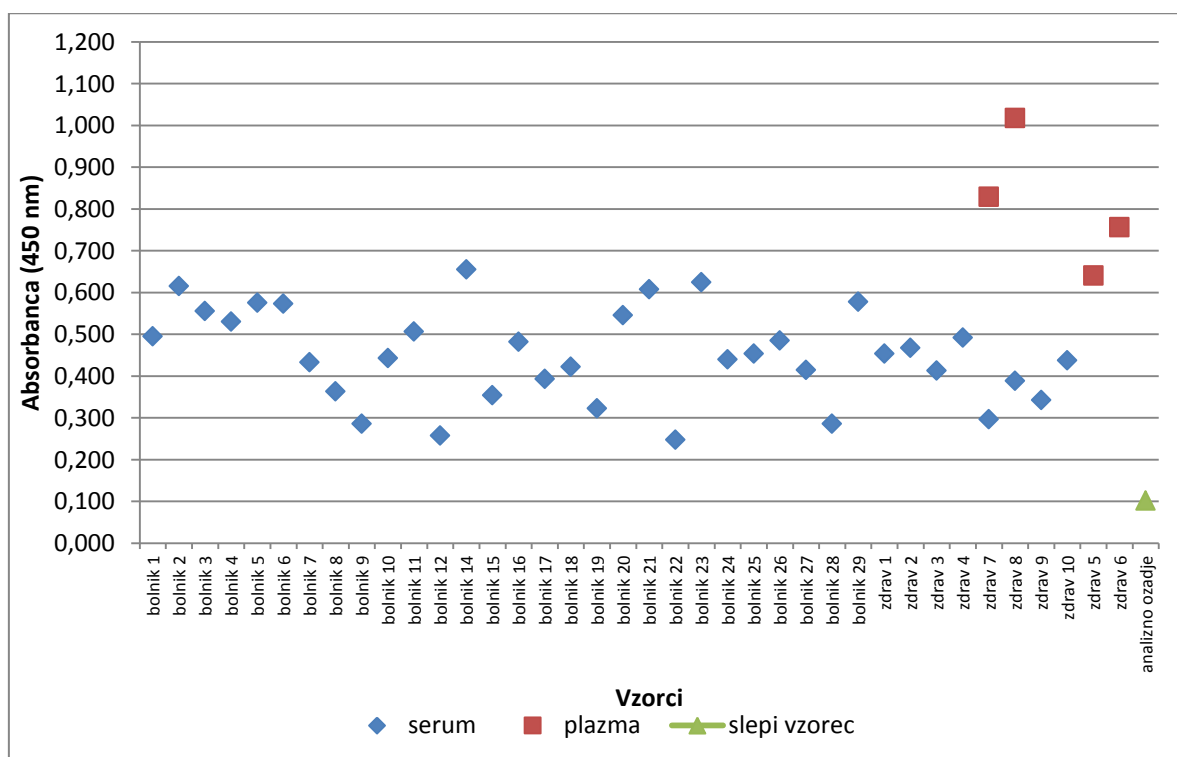
Uporabili smo reagenčni komplet z raztopino TMB (0,4 g/l) in 0,02% raztopino vodikovega peroksida, ki smo ju tik pred nanosom na mikrotitrsko ploščico po navodilih proizvajalca zmešali v razmerju 1+1. Po navodilu proizvajalca se priporoča inkubacija substrata na sobni temperaturi 15–30 minut (33). Za določitev ustreznega časa inkubacije s substratom smo kontinuirano merili absorbanco pri 650 nm, v 2-minutnih intervalih, in sicer 34 minut. Iz rezultatov kinetičnih meritve je razvidno, da je absorbanca serumskih vzorcev bolnikov in zdravih s časom naraščala, prav tako pa tudi njihova razlika z analiznim ozadjem (graf 6). Naklon krivulje se je bistveno zmanjšal po 30 minutah, zato smo v nadaljevanju obdržali čas inkubacije 35 min. V primeru, da bi še podaljševali čas inkubacije, bi se zvišalo tveganje za porast nespecifičnega obarvanja in s tem tudi nespecifičnega dviga absorbance.



Graf 6: Kinetične meritve in prikaz dviga absorbanc v odvisnosti od časa inkubacije substrata.

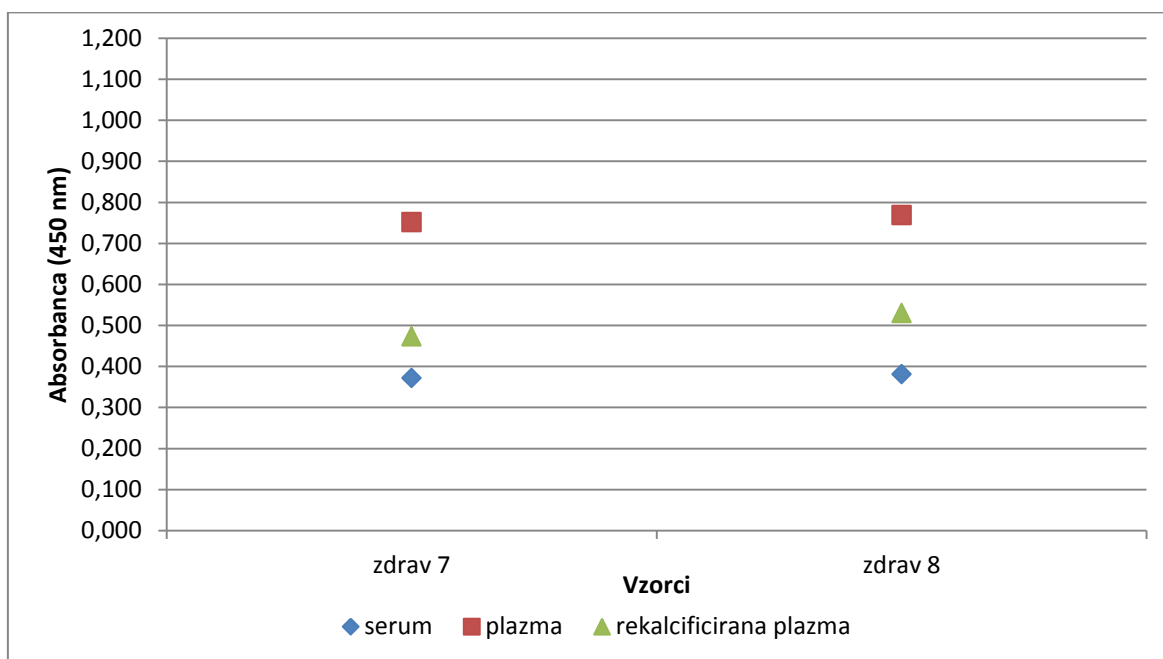
4.5 Ugotavljanje primernosti vrste vzorca za analizo: serum, plazma, rekalcificirana plazma

Zaradi večjega števila plazemskih vzorcev zdravih krvodajalcev smo preverili, kakšni so njihovi odzivi v primerjavi s serumskimi vzorci. Kot skupino vzorcev zdravih krvodajalcev smo imeli na voljo plazemske vzorce in manjše število serumskih vzorcev, medtem ko so bili vzorci bolnikov samo serumi. Na ploščico smo nanesti serumске vzorce bolnikov z IgA nefropatijo, plazemske vzorce zdravih krvodajalcev, in dva vzorca zdravih krvodajalcev od katerih smo lahko pridobili tako plazmo kot serum. Po analizi 60 plazemskih vzorcev smo ugotovili, da so absorbance plazemskih vzorcev v primerjavi s serumskimi vzorci nepričakovano visoke. Za direktno primerjavo smo nato na ploščici vzporedno testirali serumске vzorce bolnikov in zdravih ter plazemske vzorce zdravih. Pri dveh zdravih krvodajalcih (zdrav 7 in zdrav 8), kjer smo nanesti plazemski in serumski vzorec, je dobljena absorbanca plazemskega vzorca 2,8-krat oz. 2,6-krat višja od absorbance serumskega vzorca (graf 7). Na podlagi teh rezultatov sklepamo, da plazemski vzorci zdravih krvodajalcev niso primerljivi s serumskimi vzorci istih oseb ter tako tudi niso primerni za primerjavo s serumskimi vzorci bolnikov oz. kot kontrolna skupina pri ELISA metodi.



Graf 7: Odvisnost absorbance od vrste analiziranega vzorca: serum, plazma.

Vsi plazemski vzorci, pridobljeni z Zavoda Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, so bili odvzeti z antikoagulantom EDTA. S postopkom rekalifikacije, povzetem po protokolu smernic za serološko testiranje HIV-a (27), smo nato izvedli t.i. postopek rekalifikacije oz. pretvorbo plazme v serum. Na ploščico smo nanesti plazemske, serumske in rekalificirane vzorce dveh zdravih krvodajalcev in primerjali odzive. Pri osebi 'zdrav 7' smo dobili absorbanco plazemskega vzorca 2,0-krat višjo od pripadajočega vzorca seruma, absorbanco rekalificiranega plazemskega vzorca pa 1,3-krat višjo od pripadajočega vzorca seruma (graf 8). Pri osebi 'zdrav 8' je bila absorbanca plazemskega vzorca 2,1-krat višjo od pripadajočega vzorca seruma, absorbanca rekalificiranega plazemskega vzorca pa 1,4-krat višja od serumskega vzorca. Rekalificirana plazma da tako bistveno primerljivejše rezultate serumu kot neobdelana plazma, še vedno pa je razlika prevelika za neposredno uporabo. Ali bi bilo mogoče s korekcijskimi ukrepi rekalificirano plazmo uporabiti kot vzorec, primerljiv s serumom, pa bi morali potrditi na večjem številu analiziranih vzorcev.



Graf 8: Absorbanca pri različnih vrsta vzorca dveh zdravih krvodajalcev (serum, plazma, rekalificirana plazma).

Dodatno so se pri postopku rekalifikacije pojavljale težave – po tem, ko smo rekalificirane plazemske vzorce odtalili in centrifugirali ter s tem odstranili fibrinski strdek, so v vzorcu naknadno še nastajali novi strdki. To kaže na neenakomerno nastajanje

le-teh, zaradi česar je vprašljiva tudi ponovljivost postopka. Oborjeni proteini oz. kompleksi pa niso primerni za uporabo pri ELISA metodah.

Glede na dobljene rezultate in težave, ki so se pojavljale, smo se odločili, da rekalcificiranih plazemskih vzorcev krvodajalcev ne moremo uporabiti kot kontrolno skupino oz. niso primerni za določevanje neustrezno glikoziliranih IgA1.

4.6 Parametri vrednotenja imunokemijskih tehnik

Za vrednotenje imunokemijskih metod se uporabljajo različni parametri, npr. natančnost, občutljivost, točnost, specifičnost, linearnost (29). Pri naši ELISA metodi smo vrednotili analizno specifičnost, natančnost in linearnost.

Analizna specifičnost je opredeljena kot sposobnost metode, da razlikuje iskani analit od ostalih podobnih snovi v vzorcu. Natančnost določene metode podaja sipanje rezultatov pri posameznih meritvah izvedenih po predpisanih pogojih. Običajno jo opredelimo s ponovljivostjo, sipanje rezultatov pa izrazimo s statističnimi parametri – standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (CV) v odstotkih (25, 34). Po pregledu literature smo ugotovili, da so terminologija in priporočila za izračun, predvsem natančnosti metode, zelo raznoliki (25, 34, 35). Glede na priporočila organizacije Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), sta v uporabi termina "Within-run imprecision" oz. znotrajtestna natančnost/znotrajanalizna ponovljivost/repetabilnost in "Between-day imprecision" oz. medtestna natančnost/medanalizna ponovljivost/reproducibilnost, kjer gre za ponovljivost na kratek rok (znotraj iste serije meritev) in ponovljivost meritev na daljši rok (v različnih dnevih, v različnih serijah, med različnimi laboratoriji) (34, 35).

4.6.1 Analizna specifičnost

Pri naši ELISA metodi smo kot lovilno telo uporabili prečiščen F(ab')₂ fragment kozjega protitelesa proti humanemu serumskemu IgA, ki je specifičen za α verigo in veže samo protitelesa IgA, ne pa tudi IgG in IgM (37). Vežeta se oba podrazreda, IgA1 in IgA2, vendar ima samo IgA1 O-glikane, znotraj katerih se nahaja vezavno mesto za lektin (18).

Tomana in sodelavci so preiskovali 15 različnih lektinov ter ugotavljali njihovo reaktivnost s serumskim IgA1, po predhodni obdelavi z nevraminidazo, s katero so odstranili sialične kisline. Pri vseh lektinih, specifičnih za GalNAc, je bila reaktivnost vzorcev bolnikov z IgA nefropatijo večja v primerjavi z vzorci zdravih, največjo specifičnost pa so določili pri lektinu iz polža vrste *Helix aspersa* (24). Ob tem pa tudi opozarjajo na možno variabilnost

specifičnosti v odvisnosti od geografske lokacije vira in metode pridobivanja lektina (18). Pri naši ELISA metodi smo zato uporabili lektin iz *Helix aspersa* (konjugiran z biotinom) istega proizvajalca kot ostale raziskovalne skupine.

Na biotin smo nato vezali ExtrAvidin, ki predstavlja spremenjeno oz. izboljšano obliko avidina. ExtrAvidin se specifično in z visoko afiniteto veže na biotin ter za razliko od avidina iz jajčnega beljaka ne kaže nespecifičnih vezav pri fiziološkem pH. Uporabili smo obliko konjugirano z encimom hrenova peroksidaza (HRP) (28).

Na podlagi podatkov o specifičnosti lovilnega protitelesa, lektina iz *Helix aspersa*, konjugiranega z biotinom, in ExtrAvidina, konjugiranega s hrenovo peroksidazo, lahko utemeljimo analizo specifičnosti naše ELISA metode za določevanje neustrezno glikoziliranega IgA.

Poleg tega smo z vidika specifičnosti eksperimentalno preverili tudi dva tipa matriksa (serum, plazma), pri čemer smo ugotovili, da plazemski vzorec ni primeren za uporabo z našo metodo (poglavje 4.5). V nadaljnjih stopnjah vrednotenja metode pa bi bilo potrebno ovrednotiti tudi še morebitne interference v lipemičnih, hemoliziranih in ikteričnih vzorcih seruma.

4.6.2 Natančnost

Natančnost naše metode smo opredelili z znotrajtestno in medtestno natančnostjo po priporočilih podjetja Salimetrics (State College, PA, ZDA) (36).

4.6.2.1 Znotrajtestna natančnost

Za določitev znotrajtestne natančnosti smo izmerili absorbanco 48 vzorcev, nanešenih v dvojnikih (34 serumskih vzorcev bolnikov z IgA nefropatijo, 8 serumskih vzorcev zdravih krvodajalcev, 4 plazemski vzorci zdravih krvodajalcev in 2 vzorca merjenja analiznega ozadja). Za vsak dvojnik smo izračunali povprečno vrednost in standardno deviacijo ter iz tega izračunali koeficient variacije (CV) v % (standardna deviacija/povprečje*100). Za določitev znotrajtestne natančnosti smo izračunali povprečje vseh koeficientov variacije vzorcev (preglednica I).

Preglednica I: Določitev znotrajtestne natančnosti.

Ploščica 27					
Vzorci	Rezultat 1	Rezultat 2	Povprečje dvojnikov	Standardna deviacija	% CV
1	0,464	0,526	0,495	0,044	8,9
2	0,641	0,585	0,613	0,040	6,5
3	0,569	0,543	0,556	0,018	3,3
4	0,522	0,587	0,555	0,046	8,3
5	0,566	0,586	0,576	0,014	2,5
6	0,609	0,538	0,574	0,050	8,8
7	0,441	0,426	0,434	0,011	2,4
8	0,408	0,345	0,377	0,045	11,8
9	0,436	0,472	0,454	0,025	5,6
10	0,426	0,509	0,468	0,059	12,6
11	0,404	0,423	0,414	0,013	3,2
12	0,488	0,496	0,492	0,006	1,1
13	0,126	0,099	0,113	0,019	17,0
14	0,271	0,305	0,288	0,024	8,3
15	0,458	0,429	0,444	0,021	4,6
16	0,471	0,543	0,507	0,051	10,0
17	0,247	0,268	0,258	0,015	5,8
18	0,590	0,582	0,586	0,006	1,0
19	0,658	0,653	0,656	0,004	0,5
20	0,360	0,349	0,355	0,008	2,2
21	0,771	0,888	0,830	0,083	10,0
22	1,086	0,950	1,018	0,096	9,4
23	0,651	0,646	0,649	0,004	0,5
24	0,508	0,539	0,524	0,022	4,2
25	0,342	0,358	0,350	0,011	3,2
26	0,290	0,278	0,284	0,008	3,0
27	0,663	0,619	0,641	0,031	4,9
28	0,779	0,734	0,757	0,032	4,2
29	0,510	0,454	0,482	0,040	8,2
30	0,370	0,416	0,393	0,033	8,3
31	0,441	0,404	0,423	0,026	6,2
32	0,324	0,321	0,323	0,002	0,7
33	0,532	0,560	0,546	0,020	3,6
34	0,612	0,604	0,608	0,006	0,9
35	0,238	0,258	0,248	0,014	5,7
36	0,089	0,096	0,093	0,005	5,4
37	0,305	0,288	0,297	0,012	4,1
38	0,397	0,380	0,389	0,012	3,1
39	0,346	0,340	0,343	0,004	1,2
40	0,444	0,431	0,438	0,009	2,1
41	0,547	0,703	0,625	0,110	17,6
42	0,443	0,437	0,440	0,004	1,0
43	0,435	0,473	0,454	0,027	5,9
44	0,473	0,498	0,486	0,018	3,6
45	0,415	0,414	0,415	0,001	0,2
46	0,271	0,301	0,286	0,021	7,4
47	0,559	0,597	0,578	0,027	4,6
48	0,482	0,546	0,514	0,045	8,8

znotrajtestni CV (n = 48) = povprečje % CV = 5,5 %

znotrajtestni CV (n = 48) = povprečje % CV = 5,5 %

Znotrajtestni koeficient variacije, ki smo ga izračunali, je bil 5,5 %, kar bi ustrezalo celo nekaterim zelo strogim priporočilom za imunokemijske tehnike (CV < 10 %) (29, 36).

V medicinski diagnostiki pa se pogosto uporabljajo tudi metode z večjo razpršenostjo rezultatov. To velja tudi za ELISA metode, kjer na natančnost izrazito vplivajo dejavniki iz okolja (pH, temperatura, ionska moč, koncentracija protiteles) in značilnost samih reagentov in princip metode (afiniteta protiteles, koncentracija lovilnega protitelesa ...). Ob prehodu kritične meje sipanja rezultatov se analiza takšnih vzorcev ponovi ali pa se v izhodišču izvede večje število meritev istega vzorca (npr. triplikat). Oba pristopa se uporabljata v zgodnjih fazah klinične aplikacije imunokemijskih metod.

4.6.2.2 Medtestna natančnost

Za določitev medtestne natančnosti smo na več ploščic nanegli dva dvojnika serumskih vzorcev bolnikov z IgA nefropatijo in en dvojniki serumskih vzorcev zdravih krvodajalcev.

Izbrali smo:

- vzorec bolnika z visokim odzivom (bolnik 2),
- vzorec bolnika z nizkim odzivom (bolnik 9),
- vzorec zdravega z višjim odzivom (zdrav 8),
- vzorec zdravega z nižjim odzivom (zdrav 7),
- vzorec za merjenje analitskega ozadja (blokirni pufer).

Izračunali smo povprečno vrednost vseh vrednosti na posameznih ploščicah in nato še povprečje, standardno deviacijo in koeficient variacije (CV) v % (standardna deviacija/povprečje*100) vseh teh povprečij. Za določitev medtestne natančnosti vzorcev smo izračunali povprečje vseh koeficientov variacije pri vzorcih, za določitev medtestne natančnosti analiznega ozadja pa smo izračunali koeficient variacije vseh povprečnih vrednosti posameznih ploščic (preglednica II in III).

Preglednica II: Medtestna natančnost vzorcev.

Vzorec	Absorbanca		Ploščica	Povprečje ploščice
bolnik 2	0,590	0,582	27	0,617
	0,651	0,646		
bolnik 2	0,513	0,504	31	0,482
	0,468	0,444		
bolnik 2	0,509	0,501	32	0,511
	0,516	0,517		
povprečje povprečij				0,537
standardna deviacija povprečij				0,071
% CV povprečij				13,3

Vzorec	Absorbanca		Ploščica	Povprečje ploščice
bolnik 9	0,290	0,278	27	0,286
	0,271	0,305		
bolnik 9	0,222	0,230	31	0,231
	0,240	0,231		
bolnik 9	0,262	0,247	32	0,251
	0,255	0,241		
povprečje povprečij				0,256
standardna deviacija povprečij				0,028
% CV povprečij				10,9

Vzorec	Absorbanca		Ploščica	Povprečje ploščice
zdrav 7	0,305	0,288	27	0,297
zdrav 7	0,262	0,262	31	0,262
zdrav 7	0,448	0,454	32	0,451
povprečje povprečij				0,337
standardna deviacija povprečij				0,101
% CV povprečij				29,9

Vzorec	Absorbanca		Ploščica	Povprečje ploščice
zdrav 8	0,397	0,380	27	0,389
zdrav 8	0,262	0,262	31	0,262
zdrav 8	0,302	0,301	32	0,301
povprečje povprečij				0,317
standardna deviacija povprečij				0,065
% CV povprečij				20,4

medtestni CV vzorcev (n = 4) = povprečje % CV =	18,6
---	------

Preglednica III: Medtestna natančnost analiznega ozadja.

Vzorec	Absorbanca		Ploščica	Povprečje ploščice
analizno ozadje	0,128	0,103	26	0,099
	0,078	0,087		
analizno ozadje	0,089	0,096	27	0,103
	0,126	0,099		
analizno ozadje	0,053	0,037	31	0,042
	0,040	0,040		
analizno ozadje	0,043	0,030	32	0,038
	0,038	0,040		
analizno ozadje	0,048	0,035	33	0,047
	0,050	0,056		
povprečje povprečij				0,066
standardna deviacija povprečij				0,032
% CV povprečij				48,9

medtestni CV vzorcev (n = 4) = povprečje % CV = 18,6 %

medtestni CV analiznega ozadja (n = 5): povprečje % CV = 48,9 %

Izračunani koeficient variacije med različnimi ploščicami je pri obeh vzorcih bolnikov manjši od 15 % (preglednica II), pri obeh vzorcih zdravih krvodajalcev pa višji od 15%. Povprečje vseh teh koeficientov variacije je 18,6 %, kar je višje od splošno sprejemljive vrednosti (15 %) (36). Nekateri raziskovalci pri metodah v začetnih fazah razvoja sicer dopuščajo možnost variabilnosti absorbanc tudi do 20 %, pri vzorcih z nizkimi vrednostmi pa je ta lahko tudi višja. Vendar pri variabilnosti večine vzorcev nad 30 % svetujejo nadaljnja analiziranja (38).

Najvišji CV je pri vzorcu 'zdrav 7', predvsem zaradi do 70 % višje vrednosti na ploščici 32. Možen vzrok za to odstopanje je položaj vzorca na robu mikrotitrne ploščice, saj so zunanje vdolbinice na mikrotitrski ploščici bolj podvržene vplivom iz okolja, npr. višja temperatura, kar lahko ima pomemben vpliv na vse reakcije, ki potekajo, in s tem tudi na višino absorbance (29).

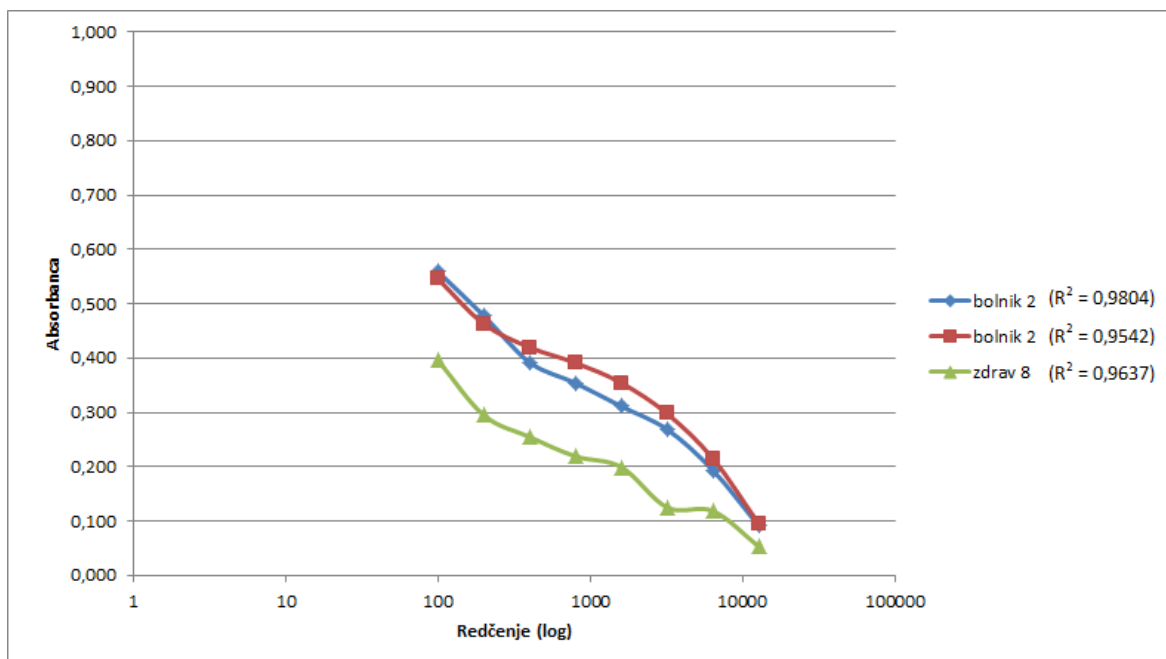
Pri določitvi medtestne natančnosti analiznega ozadja smo dobili koeficient variacije med posameznimi ploščicami 48,9 % (preglednica III). Vrednosti absorbanc analiznega ozadja so nizke (0,030–0,128), zato se vsako najmanjše odstopanje zelo odraža pri izračunu SD in posledično tudi pri izračunu CV, zato je primerno, da imamo na vsaki ploščici vsaj dva dvojnika meritve analiznega ozadja. Medanalizna primerjava ozadja pa dejansko v praksi nima velike teže, pomembnejše je, da je razmerje šum – signal ustrezno, torej da je absolutna vrednost analiznega ozadja zadosti nizka v primerjavi z izmerjenimi vrednostmi vzorcev.

4.6.3 Linearnost

Linearnost je parameter funkcijske odvisnosti med koncentracijo in merjenim signalom in se nanaša na razmerje med izmerjenimi in pričakovanimi rezultati v danem območju (25).

Linearnosti smo zaznali že v začetnih analizah pri določevanju optimalne koncentracije lovilnega protitelesa, kjer je absorbanca vzorca naraščala z višjo koncentracijo lovilnega protitelesa na ploščici (graf 2).

Za določitev linearnosti redčenja vzorcev smo serumski vzorca bolnika z IgA nefropatijo in zdravega krvodajalca serijsko redčili v razmerjih 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400, 1:12800. Serijsko redčenje serumskega vzorca bolnika 2 smo ponovili na dveh različnih ploščicah. Pričakovano je absorbanca z večanjem faktorja redčenja padala tako pri vzorcu bolnika kot tudi pri vzorcu zdravega, saj količina neustrezno glikoziliranega IgA1 z redčenjem pada (graf 9).



Graf 9: Serijsko redčenje serumskih vzorcev.

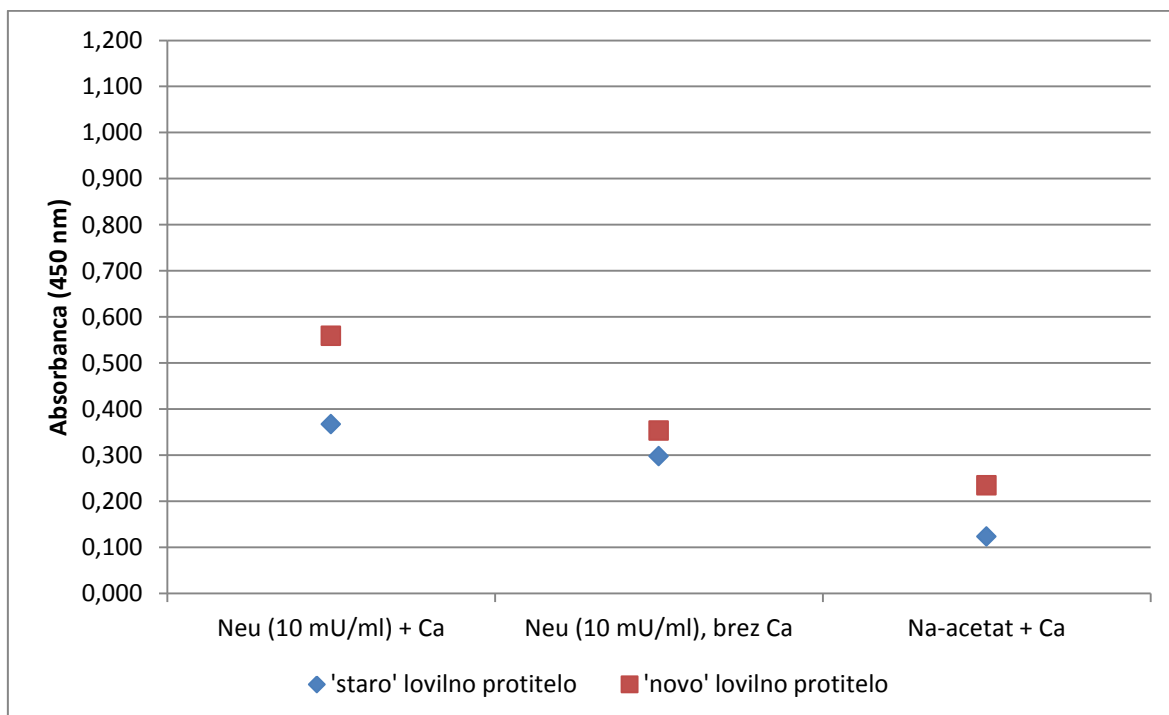
4.7 Problematika analize ravni določanja neustrezno glikoziliranih IgA

ELISA metoda, s katero smo določali koncentracijo neustrezno glikoziliranih IgA1 v serumu bolnikov z IgA nefropatijo in zdravih krvodajalcev, je metoda, v katero je vpleteno veliko število reagentov in različnih stopenj, ki zahtevajo celodnevne ali večurne inkubacije pri različnih temperaturah v posameznih stopnjah. Izvedba celotne analize traja tri dni. Vse to doprinese nizki robustnosti metode, kar smo tudi opazili po opravljenem večjem številu analiz, kjer se je, sploh v začetnih analizah, pokazala slaba ponovljivost. Zato je pri sami izvedbi analiz potrebno natančno nadzorovati vse pogoje ob izvedbi: ustrezna temperatura inkubacije reagentov in vzorcev, ustrezna jakost stresanja ploščice med inkubacijo in spiranjem, čim manjše variacije sobne temperature, ustrezna temperatura substrata pred nanosom, ustrezno pokrita ploščica med inkubacijami pri povišani temperaturi.

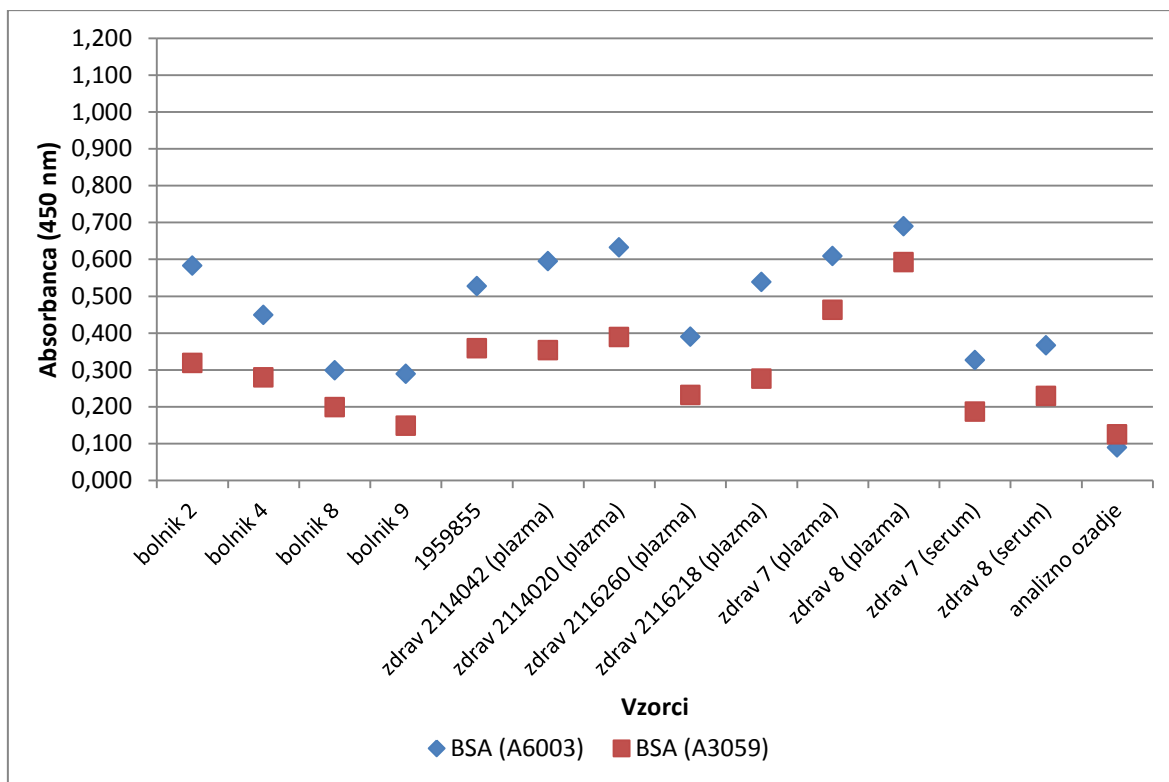
Hkrati smo pri izvedbi večjega števila analiz opazili tudi, da se lahko z daljšim časom uporabe reagentov (lovilno protitelo, encim nevraminidaza) zmanjša njihova aktivnost oz. pride do sprememb v strukturi proteina, kar lahko vpliva na potek vezave ali encimske reakcije, posledično pa vpliva tudi na vrednosti absorbance. Te domneve smo potrdili z izvedbo analize, v kateri smo primerjali absorbance pri uporabi 'starega' lovilnega protitelesa (lovilno protitelo, ki smo ga uporabljali približno 7 mesecev in je glede na rok uporabnosti še ustrezalo) in 'novega' protitelesa, ki smo ga prvič uporabili pri tej analizi. Pri

kombinacijah z 'novim' lovilnim protitelesom so bile izmerjene vrednosti absorbanc 1,2–1,9-krat višje kot pri 'starem' lovilnem protitelesu (graf 10).

Opazili smo tudi, da ima na vrednost absorbanc vpliv način pridobivanja govejega serumskega albumina (BSA), ki smo ga uporabili za pripravo blokirnega pufra, s katerim smo redčili vzorce in reagenta biotin-HAA in ExtrAvidin-HRP. Na eni ploščici smo zato primerjalno testirali dva različna produkta BSA istega proizvajalca, ki se razlikujeta v načinu čiščenja in zaostanku določenih substanc, oba pa sta specificirana za uporabo pri ELISA metodah (produkt A6003 – pridobljena z etanolno frakcionacijo, $\geq 96\%$ čistost; produkt A3059 – pridobljena s frakcionacijo s temperaturnim šokom, $\geq 98\%$ čistost) (39). Glede na podatke v specifikacijskih listih produktov ima produkt A6003 izredno nizek odstotek prostih maščobnih kislin (40), kar je priporočljivo za uporabo pri ELISA metodi (30), produkt A3059 pa lahko kot nečistote vsebuje še globuline (41). Pri uporabi produkta A6003 smo dobili višje absorbance kot pri produktu A3059 (graf 11). Možen razlog je lahko večja vsebnost nečistot, ki se lahko nespecifično vežejo s katerim od reagentov. Vendar se je glede na rezultate uporaba produkta A6003 izkazala kot primernejša za nadaljnje analize.



Graf 10: Primerjava absorbance pri uporabi 'starega' in 'novega' lovilnega protitelesa.



Graf 11: Absorbanca vzorcev pri dveh različnih serijah govejega serumskega albumina (BSA).

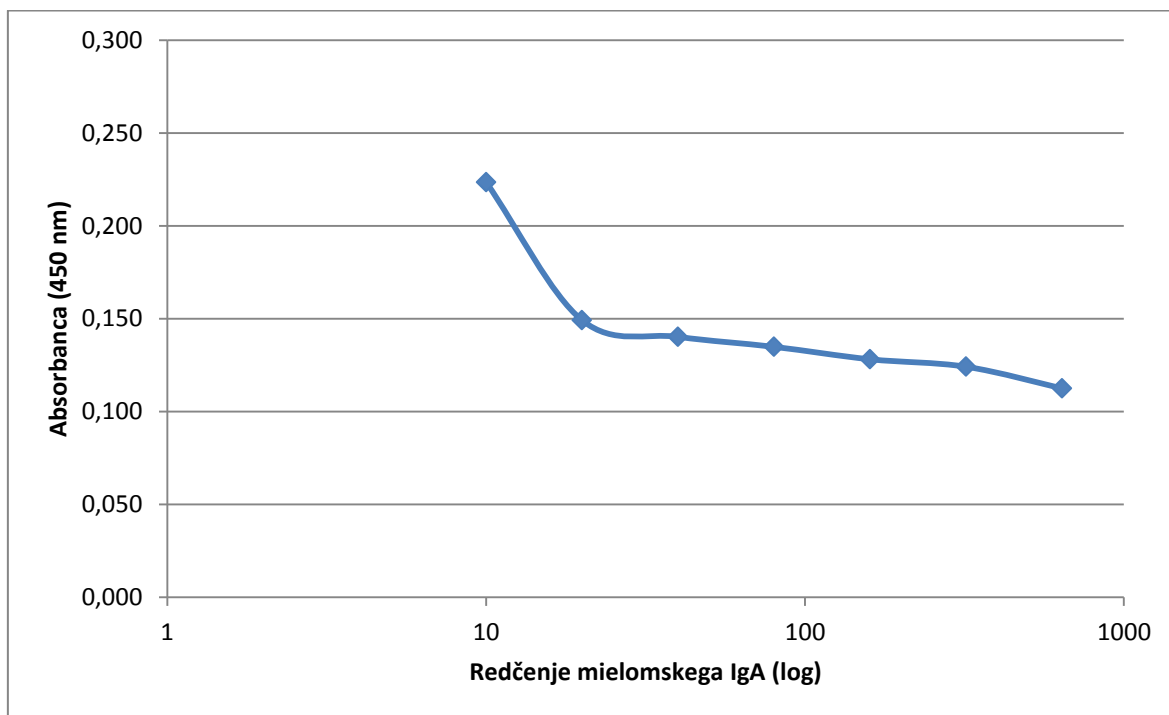
Na podlagi teh ugotovitev predlagamo uvedbo dodatnih kontrolnih vzorcev (v dvojnikih), s katerimi bi se preverjala aktivnost posameznih reagentov pri vsaki analizi:

- za kontrolo analiznega ozadja predlagamo uvedbo dveh dvojnikov, kjer namesto razredčenega vzorca naneseemo samo blokirni pufer (2% BSA-PBS-0,05% Tween 20);
- za kontrolo aktivnosti nevraminidaze predlagamo nanos vzorca bolnika in zdravega z nevraminidazo v 10 mM Na-acetatu s 3 mM Ca^{2+} ter oba vzorca brez dodane nevraminidaze (samo 10 mM Na-acetat s 3 mM Ca^{2+}).

Standard za določanje neustrezno glikoziliranega IgA1 še ni komercialno dostopen. Raziskovalne skupine, ki so razvile to metodo, so kot standard uporabljale neustrezno glikoziliran IgA1, ki so ga izolirale iz plazme (13) oz. seruma (18) bolnikov z IgA mielomom. Za ta neustrezno glikoziliran IgA1 mielomski protein so ugotovili, da posnema neustrezno glikoziliran IgA pri bolnikih z IgA nefropatijo, vendar ni v celoti brez galaktoze (18). Obstaja več oblik neustrezno glikoziliranih IgA1 mielomskih proteinov, ki se razlikujejo v vzorcu glikozilacije in posledično tudi stopnji vezave HAA lektina (42). Za določanje neustrezno glikoziliranih IgA1 v serumu bolnikov z IgA nefropatijo so raziskovalne skupine kot standard uporabljale dve obliki – v začetnih raziskovanjih so

uporabljali predvsem obliko Mce, ki so jo kasneje zamenjale z obliko Ale (43). Pri podrobnejših primerjalnih študijah so ugotovili, da je na Mce obliko v večji meri vezana sialična kislina in da se na Ale obliko HAA lektin veže z večjo afiniteto kot na Mce obliko (44).

Pri našem eksperimentalnem delu smo preverili, ali bi lahko kot standard uporabili humani IgA (oblika kappa, κ), izoliran iz humanega mielomskega seruma. Mielomski IgA smo redčili v razmerjih 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 in 1:640, vendar smo dobili nizke odzive (graf 12). Za obliko κ so Gomes in sodelavci ugotovili, da ima manjšo afiniteto za vezavo s HAA lektinom v primerjavi z obliko Ale in večjo v primerjavi z obliko Mce (44). Glede na naše delne rezultate se oblika κ ni izkazala kot najbolj ustrezna.



Graf 12: Odvisnost absorbance od redčenja mielomskega IgA.

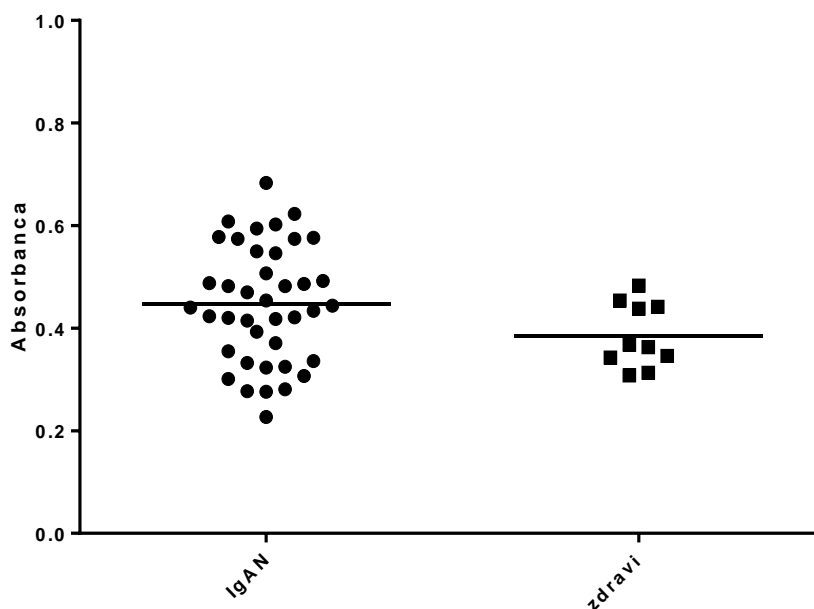
Ob dodatni prilagoditvi oz. optimizaciji preučevane metode, kjer bi dosegli predvsem boljšo medtestno natančnost, metoda nakazuje možnost uporabe pri diagnostiki IgA nefropatije. V nadaljnjih fazah bo potrebno nujno priskrbeti primeren standardni vzorec neustrezno glikoziliranega IgA1, s katerim bi vzpostavili standardno umeritveno krivuljo. Potrebna bo tudi analiza večjega števila serumov tako bolnikov kot zdravih.

4.8 Preliminarno preverjanje potencialne klinične uporabnosti rezultatov

Klinično uporabnost rezultatov lahko preverjamo s stabilno in preverjeno metodo za merjenje tarčnega analita in z zadosti velikim vzorcem zdravih preiskovancev in zadosti velikimi vzorci preiskovancev z različnimi boleznimi. Tako se preverja ne samo razlikovanje med zdravimi in bolnimi, temveč tudi med različnimi bolnimi (diferencialna diagnostika). V okviru diplomske naloge nismo imeli ustrezno velikih skupin, saj klinična uporabnost ni bil cilj naloge, vseeno pa smo izvedli pilotska testiranja.

4.8.1 Razlikovanje med zdravo in bolno skupino na osnovi neustrezno glikoziliranih IgA1

Z ovrednoteno metodo smo izmerili absorbance serumskih vzorcev 40 bolnikov z IgA nefropatijo in 10 zdravih krvodajalcev. Povprečna vrednost izmerjenih absorbanc bolnikov je bila 0,447 (območje od 0,227 do 0,683), povprečna vrednost vseh izmerjenih absorbanc zdravih pa 0,386 (območje od 0,308 do 0,483) (graf 13, priloga I). Opazili smo, da je med skupinam prišlo do določene stopnje prekrivanja vrednosti. Za statistično vrednotenje razlik med populacijama bi potrebovali večje število vzorcev, predvsem zdrave populacije. Slednje bo tudi omogočilo vrednotenje diagnostične občutljivosti in diagnostične specifičnosti, ki je v našem primeru ni bilo mogoče izračunati, saj prazne oz. referenčne vrednosti niso poznane.

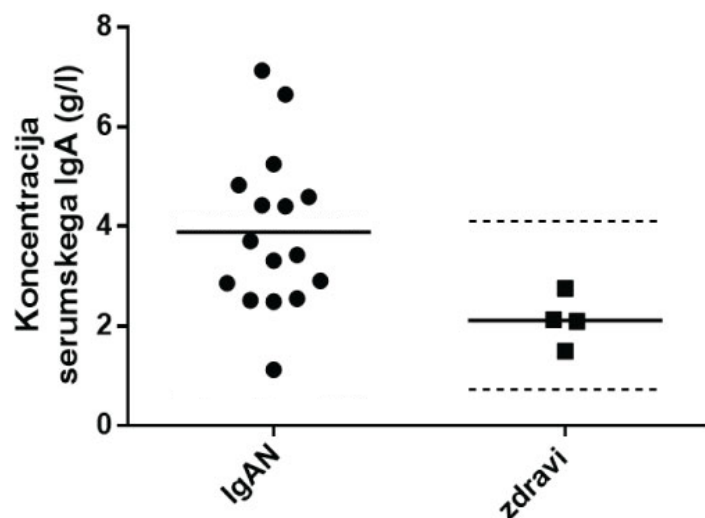


Graf 13: Porazdelitev absorbanc serumskih vzorcev bolnikov z IgA nefropatijo (IgAN;40 vzorcev) in zdravih krvodajalcev (10 vzorcev). Vodoravna črta označuje povprečno vrednost absorbance znotraj skupine.

4.8.2 Koncentracija serumskega IgA

V nekaterih študijah se omenja, da imajo bolniki z IgA nefropatijo, za razliko od zdrave populacije, povišano koncentracijo serumskega IgA, ki je povezana tudi s povišano serumsko koncentracijo neustrezno glikoziliranega IgA1. Vendar pa se merjenje serumskega IgA ni izkazalo kot dovolj dober samostojni biološki označevalec za diagnostiko IgA nefropatije, predvsem zaradi prenizke diagnostične občutljivosti (18). Uporabnost serumske koncentracije IgA pa se omenja v kombinaciji z drugimi parametri (mikroskopska hematurija in/ali proteinurija ter razmerje med serumskim IgA in komponento komplemента C3) za razlikovanje IgA nefropatije od drugih primarnih ledvičnih bolezní in diagnostiko IgA nefropatije (45).

Na Oddelku za laboratorijsko diagnostiko Splošne bolnišnice Jesenice so nam z nefelometrično metodo izmerili serumsko koncentracijo IgA pri 16 bolnikih z IgA nefropatijo in 4 zdravih krvodajalcih. Izmerjena povprečna serumska koncentracija IgA pri bolnikih z IgA nefropatijo je bila 3,88 g/l (območje 1,12–7,13 g/l), povprečna serumska koncentracija IgA pri zdravih krvodajalcih je bila 2,12 g/l (območje 1,50–2,75 g/l) (graf 14, priloga II). Po podatkih Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo (Univerzitetni klinični center Ljubljana) so referenčne vrednosti za serumsko koncentracijo IgA za slovensko populacijo 0,7–4,1 g/l (izmerjeno z nefelometrično metodo) (9). Glede na rezultate so bile vse vrednosti pri zdravih krvodajalcih v območju referenčnih vrednosti, pri 7 od 16 bolnikov z IgA nefropatijo pa je bila serumska koncentracija IgA povišana nad referenčnimi vrednostmi. Na podlagi tega lahko sklepamo, da je diagnostična občutljivost serumske koncentracije IgA prenizka, da bi lahko z njo neposredno diagnosticirali IgA nefropatijo. Za natančnejše statistično vrednotenje pa bi potrebovali meritve večjega števila vzorcev bolne in zdrave populacije.



Graf 14: Koncentracije serumskega IgA pri bolnikih z IgA nefropatijo (IgAN) in zdravih (polna vodoravna črta označuje povprečno vrednost pri vsaki skupini, prekinjena vodoravna črta označuje referenčne vrednosti za zdravo populacijo).

4.9 Zaključek

V okviru diplomske naloge smo prilagodili postopek izvedbe ELISA za določanje neustrezno glikoziliranih IgA1 in ovrednotili analizo specifičnost, natančnost in linearnost ELISA metode, s čimer smo dosegli namen naloge. Dodatno smo preliminarno preverili možno klinično uporabnost rezultatov, kar je izhodišče za nadaljnje študije na področju laboratorijske diagnostike neustrezno glikoziliranih IgA.

5 SKLEP

- V okviru diplomske naloge smo prilagodili in vrednotili ELISA metodo za določanje neustrezno glikoziliranih IgA1. Naši rezultati kažejo potencial za nadaljnjo uporabo v diagnostiki IgA nefropatije.
- Ob upoštevanju prilagoditev osnovne metode in z natančnim nadzorovanjem pogojev dela med samo izvedbo smo bistveno izboljšali robustnost metode. Kljub temu je metoda ob dobri znotrajtestni natančnosti (CV = 5,5 %) izkazovala relativno visoko medtestno natančnost (CV = 18,6 %).
- Po večjem številu izvedenih analiz smo opazili, da lahko pride do zmanjšane aktivnosti ali strukturnih sprememb določenih reagentov, zato je smiselna uvedba več dodatnih kontrolnih vzorcev: kontrola analiznega ozadja in kontrola aktivnosti nevraminidaze.
- Analizirani plazemski vzorci krvodajalcev niso pokazali primerljivih rezultatov s serumskimi vzorci istih oseb. Rekalificirani plazemski vzorci sicer nakazujejo primerljivost s serumskimi, vendar zaradi slabe ponovljivosti izvedbe ta postopek odsvetujemo in priporočamo uporabo vzorcev seruma.
- Za nadaljnje analize bo potrebno pridobiti ali pripraviti ustrezen standardni vzorec neustrezno glikoziliranega IgA1 za določitev standardne umeritvene krivulje.
- Preliminarni rezultati analiz serumov skupine bolnikov z IgA nefropatijo in majhne skupine zdravih kažejo na določeno stopnjo prekrivanja vrednosti med bolno in zdravo populacijo. Zato bo za določitev statističnih razlik med populacijama potrebno analizirati večje število vzorcev, kar bo omogočilo tudi nadaljnje vrednotenje diagnostične občutljivosti in specifičnosti.

6 LITERATURA

1. Obermajer N, Premzl A, Kos J: Terapevtska monoklonska protitelesa. V: Štrukelj B, Kos J: Biološka zdravila: od gena do učinkovine, 1. izdaja, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007: 531–578.
2. Vozelj M: Temelji imunologije, 1. izdaja, DZS, Ljubljana, 2000: 47–74.
3. Male D, Brostoff J, Roth DB, Roitt I: Immunology, 7. izdaja, Mosby Elsevier, Edinburgh, 2006, 59–86.
4. Lewis JB, Neilson EG: Glomerular Diseases: Disorders of the Kidney and Urinary Tract. V: Fauci AS, Kasper DL, Longo DL, Braunwald E, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J: Harrison's Principles of internal medicine, 17. izdaja, Mcgraw-Hill Health Professions, New York, 2008: 1782–97.
5. Arnold JN, Wormald MR, Sim RB, Rudd PM, Dwek RA: The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. Annual review of immunology 2007; 25: 21–50.
6. Lindič J: Bolezni ledvic: IgA nefropatija. V: Košnik M, Mrevlje F, Štajer D, Černelč P, Koželj M: Interna medicina, 4. izdaja, Littera picta, Ljubljana, 2011: 1045–47.
7. Mestecky J, Hammarström L: IgA-Associated Diseases. V: Kaetzel CS: Mucosal Immune Defense: Immunoglobulin A, Springer, New York, 321–344.
8. Novak J, Julian BA, Mestecky J, Renfrow MB: Glycosylation of IgA1 and pathogenesis of IgA nephropathy. Seminars in Immunopathology 2012; 34 (3): 365–82.
9. Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo, Univerzitetni klinični center. http://www2.kclj.si/kikkb/preiskave/tabele_i/imunoglobulin_a.htm. Dostop: 12. 5. 2013.
10. Barratt J, Smith AC, Feehally J: The pathogenic role of IgA1 O-linked glycosylation in the pathogenesis of IgA nephropathy. Nephrology (Carlton) 2007; 12 (3): 275–284.
11. Takahashi K, Wall SB, Suzuki H, Smith AD 4th, Hall S, Poulsen K, Kilian M, Mobley JA, Julian BA, Mestecky J, Novak J, Renfrow MB: Clustered O-glycans of IgA1: defining macro- and microheterogeneity by use of electron capture/transfer dissociation. Molecular & Cellular Proteomics 2010; 9 (11): 2545–57.
12. Tanaka M, Seki G, Someya T, Nagata M, Fujita T: Aberrantly Glycosylated IgA1 as a Factor in the Pathogenesis of IgA Nephropathy. Clinical and Developmental Immunology 2011; 2011 (9): 1–7.

13. Suzuki H, Moldoveanu Z, Hall S, Brown R, Vu HL, Novak L, Julian BA, Tomana M, Wyatt RJ, Edberg JC, Alarcón GS, Kimberly RP, Tomino Y, Mestecky J, Novak J: IgA1-secreting cell lines from patients with IgA nephropathy produce aberrantly glycosylated IgA1. *Journal of Clinical Investigation* 2008; 118 (2): 629–39.
14. Narita I, Gejyo F: Pathogenetic significance of aberrant glycosylation of IgA1 in IgA nephropathy. *Clinical and Experimental Nephrology* 2008; 12 (5): 332–8.
15. Lau KK, Wyatt RJ, Moldoveanu Z, Tomana M, Julian BA, Hogg RJ, Lee JY, Huang W-Q, Mestecky J, Novak J: Serum levels of galactose-deficient IgA in children with IgA nephropathy and Henoch-Schönlein purpura. *Pediatric Nephrology* 2007; 22 (12), 2067–72.
16. Zhao N, Hou P, Lv J, Moldoveanu Z, Li Y, Kiryluk K, Gharavi AG, Novak J, Zhang H: The level of galactose-deficient IgA1 in the sera of patients with IgA nephropathy is associated with disease progression. *Kidney International* 2012; 82 (7): 790-6.
17. Suzuki H, Kiryluk K, Novak J, Moldoveanu Z, Herr AB, Renfrow MB, Wyatt RJ, Scolari F, Mestecky J, Gharavi AG, Julian BA: The pathophysiology of IgA nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* 2011; 22 (10): 1795–803.
18. Moldoveanu Z, Wyatt RJ, Lee JY, Tomana M, Julian BA, Mestecky J, Huang W-Q, Anreddy SR, Hall S, Hastings MC, Lau KK, Cook WJ, Novak J: Patients with IgA nephropathy have increased serum galactose-deficient IgA1 levels. *Kidney International* 2007; 71 (11): 1148–54.
19. Suzuki H, Fan R, Zhang Z, Brown R, Hall S, Julian BA, Chatham WW, Suzuki Y, Wyatt RJ, Moldoveanu Z, Lee JY, Robinson J, Tomana M, Tomino Y, Mestecky J, Novak J: Aberrantly glycosylated IgA1 in IgA nephropathy patients is recognized by IgG antibodies with restricted heterogeneity. *Journal of Clinical Investigation* 2009; 119 (6): 1668–77.
20. Matousovic K, Novak J, Yanagihara T, Tomana M, Moldoveanu Z, Kulhavy R, Julian BA, Konecny K, Mestecky J: IgA-containing immune complexes in the urine of IgA nephropathy patients. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2006; 21 (9): 2478–84.
21. Gašperšič N, Rozman Blaž: *Revmatske bolezni: Vaskulitični sindromi*. V: Košnik M, Mrevlje F, Štajer D, Černelč P, Koželj M: *Interna medicina*, 4. izdaja, *Littera picta*, Ljubljana, 2011: 1520–1521.

22. Kočevar N, Kreft S, Obermajer N: Identifikacija in karakterizacija bioloških zdravil ter analiza bioloških vzorcev. V: Štrukelj B, Kos J: Biološka zdravila: od gena do učinkovine, 1. izdaja, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana: 2007, 135–84.
23. Wild DG: The Immunoassay Handbook: Theory and applications of ligand binding, ELISA and related techniques, 4. izdaja, Elsevier Science, Oxford, 2013, 7–10.
24. Tomana M, Matousovic K, Julian BA, Radl J, Konecny K, Mestecky J: Galactose-deficient IgA1 in sera of IgA nephropathy patients is present in complexes with IgG. *Kidney International* 1997; 52: 509–16.
25. Linnet K, Boyd JC: Selection and Analytical Evaluation of Methods – With Statistical Techniques. V: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE: Tietz fundamentals of clinical chemistry, 6. izdaja, Saunders Elsevier, St. Louis, 2006: 201–28.
26. Ravichandran V, Shalini S, Sundram KM, Harish R: Validation of analytical methods – strategies & importance. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2010; 2 (3): 18–22.
27. UNAIDS-WHO Joint National Program on HIV/AIDS. Guidelines for organizing national external quality assurance schemes for HIV serological testing. Ženeva: WHO; 1996.
28. ExtrAvidin-Peroxidase [product information]. St. Louis, MO, ZDA: Sigma-Aldrich; 2012.
29. Crowther JR: The ELISA guidebook, 1. izdaja, Humana Press, New York, 2009, 60–62, 305.
30. Gibbs J: ELISA Technical Bulletin No. 3 – Effective Blocking Procedure, Corning Incorporated Life Sciences, Massachusetts, 2001.
31. Slovenski medicinski e-slovar. <http://lsm1.amebis.si/lsmeds/novPogoj.aspx?pPogoj=nevraminidaza>. Dostop: 12. 5. 2103
32. Ada GL, French EL, Lind PE: Purification and Properties of Neuraminidase from *Vibrio cholerae*. *Journal of General Microbiology* 1961; 24 (3): 409–421.
33. TMB substrate kit [instructions]. Rockford, IL, ZDA: Thermo Fisher Scientific Inc; 2011.
34. Krouwer JS, Tholen DW, Garber CC, Goldschmidt HMJ, Harris Kroll M, Linnet K, Meier K, Robinowitz M: Preliminary Evaluation of Quantitative Clinical Laboratory Methods, Approved Guideline, 2. izdaja, NCCLS, Wayne, Pa, 2002: 22 (29).

35. Kotnik V: Imunološki priročnik, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Ljubljana, 2010: 123.
36. Salimetrics. Inter and Intra-Assay Coefficients of Variability. College Park, PA, ZDA; <http://www.salimetrics.com/documents/spit-tips/publications/Inter%20and%20Intra%20Assay%20Coefficients%20of%20Variability.pdf>. Dostop: 25. 4. 2013.
37. AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Human Serum IgA, α Chain Specific [product specifications]. West Grove, PA, ZDA: Jackson ImmunoResearch Laboratories.
38. Jacobson RH: Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases. *Revue scientifique et technique* 1998; 17 (2): 469–486.
39. Sigma-Aldrich. <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/biochemicals/biochemical-products.html?TablePage=103994915>. Dostop: 15. 5. 2013.
40. Albumin from bovine serum lyophilized powder, essentially fatty acid free, $\geq 96\%$ (A6003) [product specification]. St. Louis, MO, ZDA: Sigma-Aldrich.
41. Albumin from bovine serum lyophilized powder, essentially globulin free, essentially protease free, $\geq 98\%$ (A3059) [product specification]. St. Louis, MO, ZDA: Sigma-Aldrich.
42. Renfrow MB, Mackay CL, Chalmers MJ, Julian BA, Mestecky J, Kilian M, Poulsen K, Emmett MR, Marshall AG, Novak J: Analysis of *O*-glycan heterogeneity in IgA1 myeloma proteins by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: implications for IgA nephropathy. *Analytical and bioanalytical chemistry* 2007; 389 (5): 1397–407.
43. Hastings MC, Afshan S, Sanders JT, Kane O, Eison TM, Lau KK, Moldoveanu Z, Julian BA, Novak J, Wyatt RJ: Serum galactose-deficient IgA1 level is not associated with proteinuria in children with IgA nephropathy. *International journal of nephrology* 2012; 2012: 315467.
44. Gomes MM, Suzuki H, Brooks MT, Tomana M, Moldoveanu Z, Mestecky J, Julian BA, Novak J, Herr AB: Recognition of galactose-deficient *O*-glycans in the hinge region of IgA1 by *N*-acetylgalactosamine-specific snail lectins: a comparative binding study. *Biochemistry* 2010; 49 (27): 5671–82.
45. Maeda A, Gohda T, Funabiki K, Horikoshi S, Shirato I, Tomino Y: Significance of serum IgA levels and serum IgA/C3 ratio in diagnostic analysis of patients with IgA nephropathy. *Journal of clinical laboratory analysis* 2003; 17 (3): 73-6.

PRILOGE

Priloga I: Izmerjene absorbance pri določanju neustrezno glikoziliranega IgA1.

Vzorec	Absorbanca
bolnik 1	0,420
bolnik 2	0,550
bolnik 3	0,492
bolnik 4	0,418
bolnik 5	0,576
bolnik 6	0,574
bolnik 7	0,434
bolnik 8	0,307
bolnik 9	0,276
bolnik 10	0,444
bolnik 11	0,507
bolnik 12	0,227
bolnik 14	0,623
bolnik 15	0,355
bolnik 16	0,482
bolnik 17	0,393
bolnik 18	0,423
bolnik 19	0,323
bolnik 20	0,546
bolnik 21	0,608
bolnik 22	0,301
bolnik 23	0,602
bolnik 24	0,440
bolnik 25	0,454
bolnik 26	0,486

Vzorec	Absorbanca
bolnik 27	0,415
bolnik 28	0,281
bolnik 29	0,578
bolnik 30	0,683
bolnik 31	0,325
bolnik 32	0,482
bolnik 33	0,371
bolnik 34	0,336
bolnik 35	0,470
bolnik 36	0,421
bolnik 38	0,488
bolnik 39	0,574
bolnik 40	0,594
bolnik 41	0,277
bolnik 42	0,332
zdrav 1	0,454
zdrav 2	0,483
zdrav 3	0,363
zdrav 4	0,442
zdrav 7	0,313
zdrav 8	0,368
zdrav 9	0,343
zdrav 10	0,438
zdrav 11	0,346
zdrav 12	0,308

Priloga II: Rezultati izmerjene koncentracije serumskega IgA.

Vzorec	Koncentracija (g/l)
bolnik 2	2,86
bolnik 8	3,42
bolnik 9	4,59
bolnik 10	4,40
bolnik 12	4,42
bolnik 14	1,12
bolnik 22	5,25
bolnik 23	7,13
bolnik 25	3,31
bolnik 28	2,49
bolnik 30	3,70
bolnik 31	6,65
bolnik 36	2,52
bolnik 39	2,55
bolnik 40	2,90
bolnik 41	4,83
zdrav 3	2,75
zdrav 7	2,13
zdrav 8	1,50
zdrav 11	2,10