

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TINKA ŠVEC

**Uvedba metode za določanje protiteles proti
dvojnoverižni DNA z uporabo neradioaktivnih
reagentov**

**Implementation of a nonradioactive method for
determination of autoantibodies against
doublestranded DNA**

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2014

Magistrsko nalogo sem opravljala v Laboratoriju za imunologijo revmatizma, Klinični oddelek za revmatologijo, SPS Interna klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana pod mentorstvom prof. dr. Borut Božiča, mag. farmacije in somentorstvom dr. Tanje Kveder, univ. dipl. ing. kemije.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju in somentorici za izkazano strokovno pomoč in nasvete pri opravljanju magistrske naloge. Hvala tudi vsem sodelavkam v Laboratoriju za imunologijo revmatizma. Posebna zahvala gre Katji Lakota, mag.farm., ki je veliko svojega časa žrtvovala v ta namen.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Borut Božiča, mag. farm. in somentorstvom dr. Tanje Kveder, univ. dipl. ing. kemije.

Ljubljana, 2014

Predsednik komisije: prof. dr. Marija Sollner Dolenc

Mentor: prof. dr. Borut Božič

Somentor: dr. Tanja Kveder

Član komisije: doc. dr. Simon Žakelj

KAZALO

POVZETEK.....	I
ABSTRACT	II
SEZNAM OKRAJŠAV	III
SEZNAM SLIK	IV
SEZNAM PREGLEDNIC	IV
SEZNAM GRAFOV	IV
1 UVOD.....	1
1.1 SISTEMSKI LUPUS ERITEMATOZUS.....	1
1.1.1 DIAGNOZA SLE.....	2
1.1.2 VLOGA IN PROGNOŠTIČNA VREDNOST ANTI-dsDNA PROTITELES PRI SLE	4
1.1.3 PROTITELESA ANTI-dsDNA IN TERAPIJA.....	4
1.2 INTERAKCIJE dsDNA IN PROTITELES.....	5
1.2.1 ANTIGEN dsDNA.....	5
1.2.2 PROTITELESA PROTI DNA IN NJIHOVA AVIDNOST.....	6
1.2.3 IMUNSKI KOMPLEKSI dsDNA - anti-dsDNA	7
1.3 METODE ZA DOLOČANJE ANTI-dsDNA IN NJIHOVA PROBLEMATIKA	8
1.3.1 INDIREKTNA IMUNOFLUORESCENCA S CHRITHIDIO LUCILIAE (CLIF).....	8
1.3.2 RADIOIMUNSKA METODA (RIA)	9
1.3.3 ENCIMSKO IMUNSKA METODA NA TRDNEM NOSILCU (ELISA)	9
1.3.4 PROBLEMATIKA DOLOČANJA PROTITELES ANTI-dsDNA	10
1.4 UVEDBA METODE.....	11
2 NAMEN DELA.....	13
3 MATERIALI IN METODE	14
3.1 BIOLOŠKI MATERIAL.....	14
3.1.1 HUMANI VZORCI	14
3.1.2 KONTROLNI MATERIAL.....	14
3.2 KEMIKALIJE	15
3.3 PUFRI IN RAZTOPINE	16
3.4 APARATURE IN PRIBOR	17
3.5 METODE	17
3.5.1 RIA	17
3.5.2 FIA.....	18

3.5.3	IZOLACIJA DNA	19
3.6	ENAČBE ZA RAČUNANJE PARAMETROV VREDNOTENJA METOD IN REZULTATOV.....	20
3.7	STATISTIČNE METODE	21
4	REZULTATI	22
4.1	PRIMERJALNO VREDNOTENJE METOD FIA IN RIA.....	22
4.1.1	PRAKTIČNOST OZIROMA UPORABNOST	22
4.1.2	ANALIZNA NATANČNOST	22
4.1.3	ANALIZNA TOČNOST.....	24
4.1.4	ANALIZNA OBČUTLJIVOST	24
4.2	VREDNOTENJE REZULTATOV FIA IN RIA METODE.....	25
4.2.1	PORAZDELITEV TESTIRANIH VZORCEV	25
4.2.2	DIAGNOSTIČNA OBČUTLJIVOST IN DIAGNOSTIČNA SPECIFIČNOST	27
4.2.3	DIAGNOSTIČNA UPORABNOST REZULTATOV.....	28
4.3	PRIMERJAVA REZULTATOV METOD FIA IN RIA	29
4.3.1	KORELACIJA	29
4.3.2	PRIMERJAVA VREDNOSTI IZMERJENIH REZULTATOV Z METODO RIA IN FIA.....	31
5	RAZPRAVA	32
5.1	PRIMERJALNO VREDNOTENJE METOD FIA IN RIA.....	32
5.2	PRIMERJAVA REZULTATOV METOD FIA IN RIA	34
5.3	KLINIČNA UPORABNOST.....	35
6	SKLEP	37
7	LITERATURA.....	38
8	PRILOGE.....	41
8.1	PRILOGA 1	41
8.2	PRILOGA 2	42

POVZETEK

Protitelesa proti dvojnoverižni deoksiribonukleinski kislini (dsDNA) so eden od diagnostičnih kriterijev za sistemski lupus eritematozus, sledenje njihove koncentracije, ki sledi aktivnosti bolezni, pa pomembna pomoč zdravniku pri sledenju bolezni.

Za merjenje anti-dsDNA protiteles se uporablja več metod, ki imajo svoje prednosti in slabosti. To so predvsem radioimunske metode (RIA), imunofluorescenca (CLIF) in encimsko imunske metode na trdnem nosilcu (ELISA), s katerimi pa ne določamo nujno iste skupine ali istih podskupin protiteles proti dsDNA. Ta so praviloma poliklonska in se v afiniteti in v izotipu razlikujejo v epitopski specifičnosti do istega antigena. Za določitev anti-dsDNA radioimunska metoda po FARR-u, s katero določamo samo visoko avidna protitelesa, še vedno velja za zlati standard. Za izvedbo te metode poleg radioaktivnega materiala uporabljamo tudi organska topila in druge zelo toksične kemikalije. Imunofluorescenca CLIF pa je samo polkvantitativna metoda in zato neprimerna za spremljanje bolezni. ELISA so sicer kvantitativne, ponovljive, lahko tudi avtomatizirane, vendar zaznajo tudi nizko avidna protitelesa proti dsDNA in tudi protitelesa proti ssDNA. Zato imajo najnižjo diagnostično uporabnost.

Namen našega dela je bil ugotoviti, ali namesto radioaktivnega izotopa ^{14}C -DNA pri RIA, lahko uporabimo fluorescenčni označevalec PicoGreen, kako to vpliva na lastnosti drugače nespremenjene metode in posledično na klinično uporabnost.

Z obema metodama smo testirali 759 vzorcev. Od tega je bilo 146 vzorcev krvodajalcev, 70 s sistemskim lupusom eritematozusom, 25 z antifosfolipidnim sindromom, 28 z revmatoidnim artritisom, 25 s Sjogrenovim sindromom, ter 465 vzorcev bolnikov, ki so bili poslani na preiskavo anti-dsDNA protitelesa s sumom na SLE ali z namenom izključitve SLE.

Za mejno vrednost FIA smo izbrali isto vrednost, kot se uporablja pri rutinski RIA po Farru (0,35). Ugotovili smo primerljivo medanalizno natančnost obeh metod pri visoko pozitivnem rezultatu ($KV_{\text{RIA}} = 11\%$, $KV_{\text{FIA}} = 12\%$) in mejno pozitivnem rezultatu ($KV_{\text{RIA}} = 29\%$, $KV_{\text{FIA}} = 18\%$). Ugotovili smo tudi primerljivo znotrajanalizno ponovljivost pri visoko pozitivnem rezultatu (pri obeh metodah $KV = 2\%$) in mejno pozitivnem rezultatu ($KV_{\text{RIA}} = 33\%$, $KV_{\text{FIA}} = 28\%$). Pri visoko in mejno pozitivnem rezultatu sta imeli tudi primerljivo analizo točnost, medtem ko je bila analizo občutljivost pri FIA večja, saj smo signal pri titriranju visoko pozitivnega vzorca zaznali do zadnjega titra. ssDNA in RNA nista vplivali na določitev dsDNA.

Preverili smo tudi diagnostično uporabnost obeh metod z diagnostično občutljivostjo (DO) in diagnostično specifičnostjo (DS). Pri mejnih vrednostih 0,35 sta bili DO in DS pri obeh metodah primerljivi (DS pri obeh metodah je 100%, $DO_{\text{RIA}} = 50\%$, $DO_{\text{FIA}} = 53\%$), medtem ko je bila diagnostična uporabnost FIA nekoliko manjša ($DU_{\text{RIA}} = 0,887$, $DU_{\text{FIA}} = 0,781$).

Primerjava vrednosti samo pozitivnih rezultatov je pokazala največjo moč povezave obeh metod ($r = 0,63$, $p < 0,01$), kar smo potrdili tudi z neparametričnim testom. Glede na merilno negotovost v negativnem območju (pod 0,35), je bila moč povezave, po pričakovanju slaba. Zaradi nepomembnosti rezultatov pod prazno vrednostjo smo obe metodi statistično vrednotili samo v pozitivnem območju in ugotovili statistično značilno povezavo ($p = 0,23$).

Na podlagi naših rezultatov lahko zaključimo, da lahko RIA za določanje anti-dsDNA v celoti nadomestimo s FIA.

ABSTRACT

Antibodies against double stranded deoxyribonucleic acid (dsDNA) are one of the diagnostic criteria for systemic lupus erythematosus. Their serum concentration follows the activity of the disease and as such is useful assistance for treatment. Few methods to measure anti-dsDNA antibodies are used, each having its own advantages and disadvantages. Most commonly used are radioimmunoassays (RIA), immunofluorescence (CLIF) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), but those methods do not necessarily determine the same type or subtypes of antibodies against dsDNA. Antibodies against dsDNA are usually polyclonal and they differ in affinity, isotype and epitope specificity on the same antigen. RIA by FARR used for determining only high avidity antibodies is still the gold standard for anti-dsDNA antibody determination. To perform this method radioactive material as well as organic solvents and other highly toxic chemicals are used. CLIF is only being qualitative method and therefore unsuitable for monitoring the disease activity. ELISA methods are quantitative, repeatable and they can as well be automated, but they recognize also low avidity antibodies against dsDNA and also antibodies against ssDNA. Therefore they have the lowest diagnostic utility.

The purpose of our work was to find out if it is possible to use fluorescent dye PicoGreen instead of radioactive isotope ^{14}C -DNA by RIA, to find out how does this affect the properties of otherwise unchanged method and consequently how does it affect the clinical utility.

With RIA by Farr and fluoroimmunoassay (FIA) methods we tested 759 samples, consisting of 146 blood donors, 70 systemic lupus erythematosus, 25 antiphospholipid syndrome, 28 rheumatoid arthritis, 25 Sjogren syndrome samples and 465 samples of patients without known diagnosis, that were sent to anti-dsDNA antibodies test with suspicion of SLE or with intention to exclude SLE. For the cut-off value FIA we have chosen same value as it is used by routinely done RIA by Farr (0,35). We found comparable inter accuracy of both methods in high positive results ($KV_{\text{RIA}} = 11$, $KV_{\text{FIA}} = 12\%$) and low positive results ($KV_{\text{RIA}} = 29\%$, $KV_{\text{FIA}} = 18\%$). We as well confirmed comparable intra repeatability in high positive results (at both methods $KV = 2\%$) and low positive results ($KV_{\text{RIA}} = 33\%$, $KV_{\text{FIA}} = 28\%$). At high and low positive result they as well had comparable analytical accuracy, while analytical sensitivity was higher in FIA as we detected signal at titrating highly positive sample to the last titer. ssDNA and RNA did not affect the determination of dsDNA.

We also checked the diagnostic accuracy of both methods with diagnostic sensitivity and diagnostic specificity. At cut-off value 0.35, diagnostic sensitivity and diagnostic specificity were comparable for results of both methods (diagnostic specificity of results 100%, diagnostic sensitivity results by RIA = 50%, by FIA = 53%), while diagnostic accuracy of results by FIA was lower (by RIA = 0,89, by FIA = 0,78). Comparison of values of only positive results showed the greatest correlation for both methods (0.63, $p < 0.01$), which we also confirmed by the nonparametric test. As expected due to big measurement uncertainty in the negative area (under 0.35), the correlation there, was weak. Due to the insignificance of the results under cut-off value we statistically evaluated both methods only in positive area and found a statistically significant association ($p = 0,23$).

Based on our results we can conclude that RIA for determination of anti-dsDNA can be completely replaced by FIA according to presented procedure.

SEZNAM OKRAJŠAV

ANA	proti jedrna protitelesa (ang Antinuclear Antibodies)
APS	antifosfolipidni sindrom
BBS	boratni pufer
CLIF	indirektna imunofluorescenca na Crithidii luciliae (ang Chrithidia Luciliae Immunofluorescence Assay)
cpm	število impulzov na minuto (ang counts per minutes)
DO	diagnostična občutljivost
DS	diagnostična specifičnost
dsDNA	dvojnoverižna deoksiribonukleinska kislina (ang Double-stranded Deoksiribonucleic Acid)
EKG	elektrokardiogram
ELISA	encimsko imunska metoda na trdnem nosilcu (ang Enzyme-linked Immunosorbent Assay)
FIA	fluorescenčno imunska metoda (ang Fluorescent Immuno Assay)
GIT	gastrointestinalni trakt
Hep-2	humane epiteljske celice (ang. Human epitheloid cells)
HLA-B	človeški levkocitni antigen B (ang Humane Leukocyte Antigen B)
HLA-D3	človeški levkocitni antigen DR3 (ang Humane Leukocyte Antigen DR3)
HLA-DR2	človeški levkocitni antigen DR2 (ang Humane Leukocyte Antigen DR2)
KV	koeficient variacije
LOD	meja detekcije (ang Level of Detection)
LOQ	meja določitve (ang. Level of Quantification)
P	oborina (ang Precipitate)
POPOP	1,4-bis(4-metil-5-fenil-2-oksazolil) benzen
PPO	2,5-difenil-oksazol
RA	revmatoidni artritis
RCF	relativna centrifugalna sila (ang Relative Centrifugal Force)
RIA	radioimunska metoda (ang Radio-immuno Assay)
RNA	ribonukleinska kislina (ang Ribonucleic Acid)
ROC	krivulja diagnostične občutljivosti in specifičnosti (ang Receiver Operating Characteristic Curve)
S	supernatant
SD	standardni odmik (ang Standard Deviation)
SJS	Sjogrenov sindrom
SLE	sistemski lupus eritematozus
ssDNA	eno verižna deoksiribonukleinska kislina (ang Single-stranded Deoksiribonucleic Acid)
U1RNP	U1 ribonukleoprotein
UV	ultravijolična svetloba
zNK	zunaj celična nukleinska kislina

SEZNAM SLIK

Slika 1 - Patogeneza SLE (5).....	2
Slika 2 - Simptomi SLE (9).....	3
Slika 3 - Vpliv velikosti molekule dsDNA na stopnjo vezave protiteles	6
Slika 4 - Vpliv količine dsDNA na določanje protiteles anti-dsDNA.....	7
Slika 5 - Prikaz pozitivnega obarvanja s CLIF (21).....	9
Slika 6 - Prikaz pozitivne obarvanosti pri ELISA (23)	10

SEZNAM PREGLEDNIC

Preglednica I - Znotrajanalizna ponovljivost rezultatov pri različnih vrednostih z radioimunsko (RIA) in fluoroimunsko (FIA) metodo.....	22
Preglednica II - Medanalizna ponovljivost pri kontrolnih vzorcih z radioimunsko (RIA) in fluoroimunsko (FIA) metodo	23
Preglednica III – Analizna točnost radioumske (RIA) in fluoroimunske (FIA) metode pri različnih vrednostih	24
Preglednica IV - Analizna občutljivost pri radioimunski (RIA) in fluorometrični (FIA) metodi.....	24
Preglednica V - Statistični kazalci porazdelitve rezultatov za krvodajalce pri radiomunski (RIA) in fluoroimunski (FIA) metodi.....	27
Preglednica VI - Diagnostična specifičnost (DS) in diagnostična občutljivost (DO) pri različnih praznih vrednostih	27
Preglednica VII - Površina pod ROC krivuljo za radioimunsko (RIA) in fluoroimunsko (FIA) metodo	28
Preglednica VIII - Wilcoxonov test predznačenih rangov za vse vzorce.....	31
Preglednica IX - Wilcoxonov test predznačenih rangov za pozitivne vzorce.....	31
Preglednica X - Z statistika	31

SEZNAM GRAFOV

Graf 1 - Analizna specifičnost pri fluoroimunski metodi (FIA) (36).....	19
Graf 2 - Grafični prikaz analize občutljivosti pri radioimunski (RIA) in fluoroimunski (FIA) metodi.....	25
Graf 3 - Frekvenčna porazdelitev rezultatov anti-dsDNA protiteles določenih z radioimunsko metodo (RIA) pri krvodajalcih	26
Graf 4 - Frekvenčna porazdelitev rezultatov anti-dsDNA protiteles določenih s fluoroimunsko metodo (FIA) pri krvodajalcih	26
Graf 5 - Primerjava diagnostične uporabnosti rezultatov z radioimunsko (RIA) in fluoroimunsko (FIA) metodo	28
Graf 6 - Razsevni diagram za parno izmerjene rezultate z radioimunsko (RIA) in fluoroimunsko (FIA) metodo	29
Graf 7 - Razsevni diagram za parno izmerjene negativne rezultate z radioimunsko (RIA) in fluoroimunsko (FIA) metodo	30
Graf 8 - Razsevni diagram za parno izmerjene pozitivne rezultate z radioimunsko (RIA) in fluoroimunsko (FIA) metodo	30

1 UVOD

1.1 SISTEMSKI LUPUS ERITEMATOZUS

Sistemski lupus eritematozus (SLE) je sistemska vezivnotkivna vnetna bolezen neznanega izvora, pri kateri pride do imunskega neravnovesja. Vzrok za imunsko neravnovesje je splet različnih dejavnikov, med katere spadajo genska dovzetnost, imunski odkloni, dejavniki okolja in spolni hormoni (Slika 1) (1).

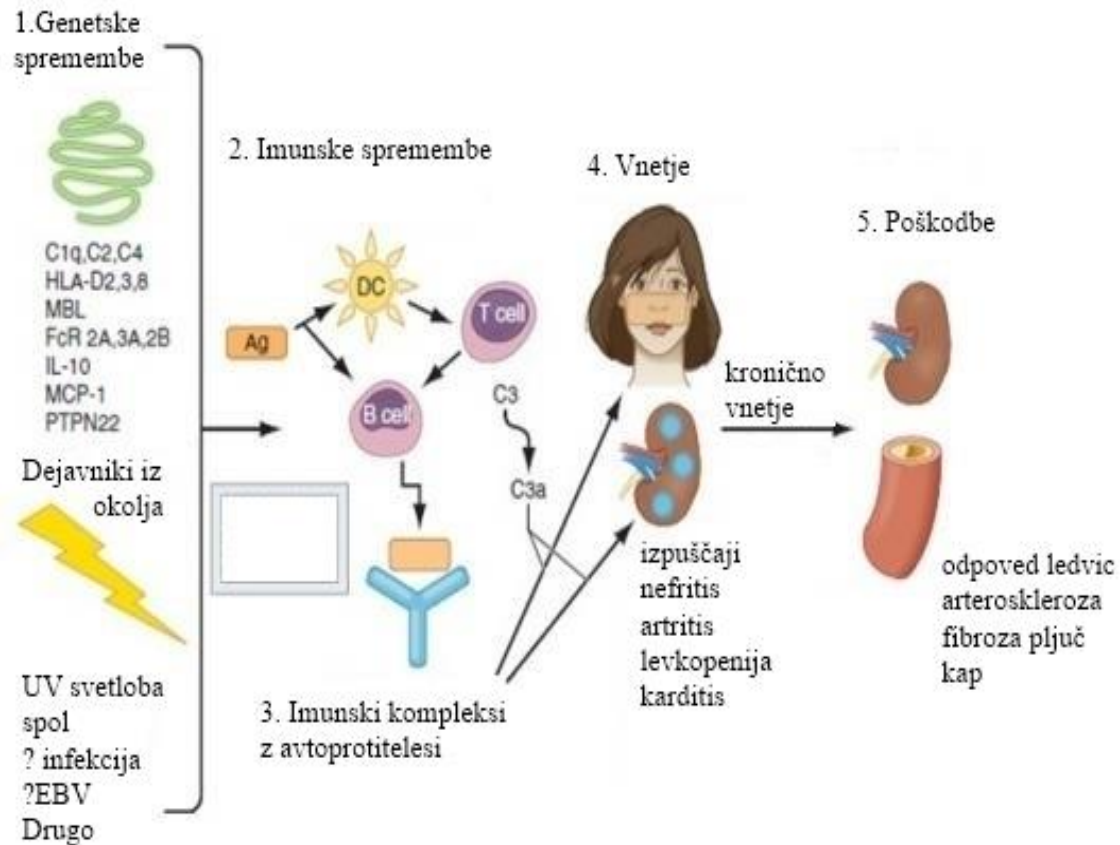
Za izbruh SLE naj bi bila odgovorna tudi prisotnost določenih genov v kromosomski regiji, ki kodirajo antigene, kot so npr. HLA-B, HLA-DR2 in HLA-D3 ali njihova odsotnost kot npr. za antigene C1q in C4. Osebe z antigenom HLA-DR2 sintetizirajo v večini primerov avtoprotitelesa proti dvojnoverižni deoksiribonukleinski kislini (dsDNA), ki so eden od laboratorijskih diagnostičnih označevalcev za SLE, osebe s HLA-DR3 pa protitelesa proti antigenu Ro (1). Pri pomanjkanju C4 imajo osebe zmanjšano odstranjevanje avtoreaktivnih B celic. Pomanjkanje C1q pa povzroči pomanjkljivo odstranjevanje snovi, ki so posledica nekroze (2).

Motnje v imunskem odzivu so posledica znižanega števila citotoksičnih celic T in celic T zaviralk, povečane aktivnosti celic T pomagalk, motene tolerance celic B, poliklonske aktivacije limfocitov B. Prisotne so motnje v imunski regulaciji, ki so posledica izgube tolerance za lastne antigene. Posledica je tudi nastanek avtoprotiteles proti sestavinam celičnega jedra npr. DNA, jedrnim ribonukleoproteinom (Ro, La, U1RNP) itd. (1).

Med okoljske dejavnike prištevamo bakterije, viruse (npr. Epstein-Barr), ultravijolično svetlobo in kajenje, ki sicer ne povzročijo bolezni, jo pa lahko sprožijo pri dovzetni osebi. Tudi nekatera zdravila npr. hidralazin, prokainamid, isoniazid, diltiazem lahko povzročijo lupusu podoben sindrom (1).

Prevalenca SLE je višja pri ženskah, kar povezujejo s spolnimi hormoni, saj so estrogeni tisti, ki podpirajo avtoimunost. Nizek nivo estrogenov zavira delovanje celic B, medtem ko jih visok nivo pospešuje, kar ima za posledico pospešeno nastajanje protiteles, vključno z avtoprotitelesi. Pri bolnikih je metabolizem estrogenov spremenjen, zato nastajajo metaboliti z dolgotrajnejšim in močnejšim estrogenskim učinkom (3). Nosečnost, splavi in porod lahko sprožijo ali poslabšajo bolezen (1).

Prevalenca oz. pojavnost SLE med prebivalstvom je približno 4 do 250 bolnikov na 100.000 oseb. Bolezen je do desetkrat pogostejša pri ženskah, zlasti v rodnem obdobju (med 15. in 49. letom). Incidenca ali razširjenost se giblje med 0,4 do 27 bolnikov na 100.000 oseb (1). Pojavnost in razširjenost variirata glede na karakteristike posamezne populacije: starost, spol, etnični ali nacionalni izvor (4).



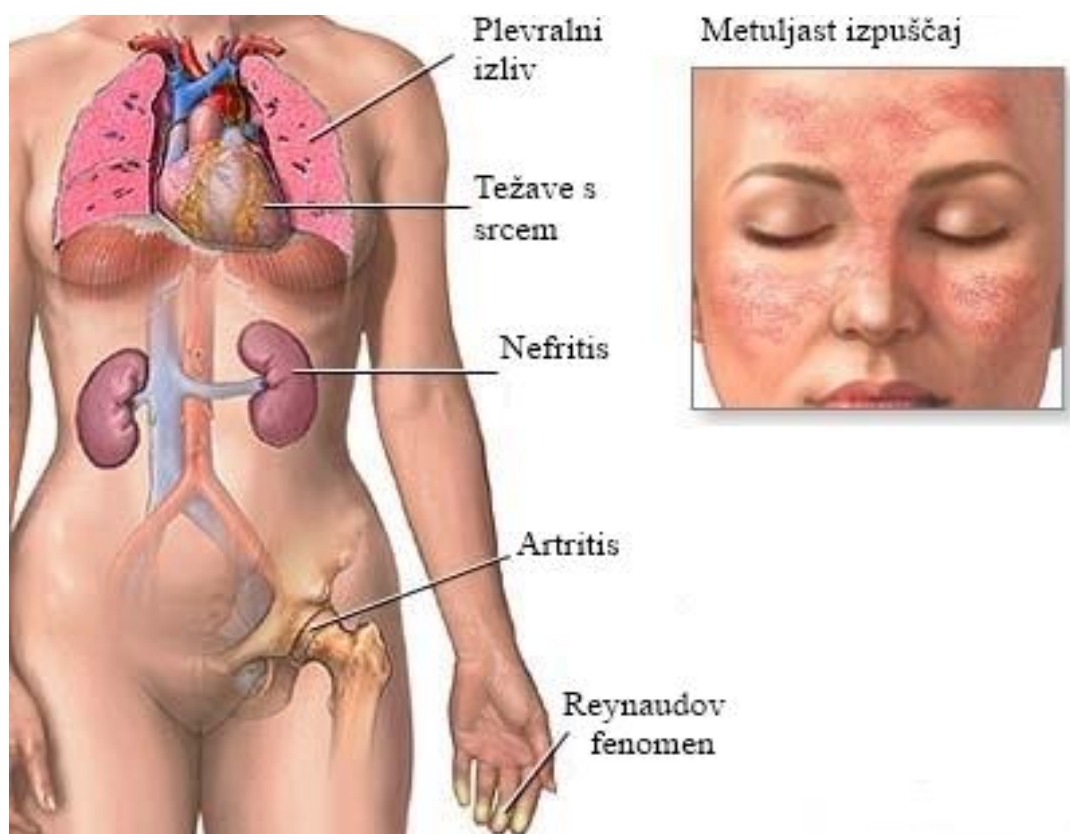
Slika 1 - Patogeneza SLE (5)

1.1.1 DIAGNOZA SLE

Diagnozo SLE postavimo na podlagi enajstih diagnostičnih meril, med katerimi so tri laboratorijska: hematološke motnje (hemolitična anemija, levkopenija, limfopenija ali trombocitopenija), imunološke motnje (protitelesa proti dvojnoverižni DNA, proti antigenu Sm, antifosfolipidna protitelesa), protijedrna protitelesa. Prisotnost katerihkoli 4 meril omogoča postavitev diagnoze s 96% diagnostično občutljivostjo in diagnostično specifičnostjo (1). Avtoprotitelesa proti dsDNA so bila odkrita leta 1957 (6). Od leta 1982 so uvrščena med diagnostične kriterije za SLE (7). Podatki o pojavnosti in prav tako razširjenosti so zelo odvisni od metod, ki jih uporabljamo za določitev avtoprotiteles proti-dsDNA (4). Z razvojem občutljivejših metod se je izkazalo, da na rezultate lahko vpliva tudi metoda sama. Tako so predvsem z encimsko imunskimi metodami na trdnem nosilcu (ELISA) izmerili povišane koncentracije avtoprotiteles proti dsDNA tudi pri krvodajalcih in drugih boleznih: uveitis, diskoidni SLE, revmatoidni artritis. Pri bolnikih, kjer so jih dokazali z RIA metodo, vendar diagnoze SLE niso mogli postaviti, so po prvem letu opazovanj odkrili, da so ti bolniki v 70% v tem letu zboleli za SLE. Nadaljnje raziskave so ugotovile, da se je ta delež dvignil na 85% v treh letih. Samo 15% jih po petih letih ni zadostilo kriterijem za SLE (4).

1.1.1.1 KLINIČNI ZNAKI

SLE je bolezen, pri kateri so lahko prizadeti vsi organi, saj nastala avtoprotitelesa in imunski kompleksi okvarijo različne organe (8). Najpogosteje prizadeta organa sta ledvice in možgani. Bolniki imajo povišano telesno temperaturo, so utrujeni, izgubljajo telesno težo. Prizadete imajo sklepe (artritis), kožo (metuljast izpuščaj, fotosenzitivnost, razjede sluznic, urtikarija, Raynaudov fenomen), ledvice (glomerulonefritis), pljuča (plevritis, pneumonitis), srce (perikarditis, šumi na srcu, elektrokardiogram (EKG) spremembe), živčevje (glavoboli, motnje spomina, spremembe značaja in koncentracije, konvulzije), prebavila (bolečina, slabost, povečana jetra ali vranica) (Slika 2) (1).



Slika 2 - Simptomi SLE (9)

1.1.1.2 SEROLOŠKI KAZALCI

Poleg kliničnih znakov imajo bolniki tudi spremenjene laboratorijske kazalce. Imajo povišano sedimentacijo eritrocitov, normokromno normocitno anemijo, limfopenijo in trombocitopenijo (8). Znižani sta tudi koncentraciji sestavin komplemента C3c in C4 (1). Osnovni imunoserološki bolezenski kazalci so protitelesa proti jedrnim antigenom, **protitelesa proti dsDNA** in protitelesa proti antigenu Sm (8). Pri 95% SLE bolnikov so prisotna protitelesa proti jedrnim antigenom, kar opazujemo kot pozitivno jedrno imunofluorescenco na humanih epitelijskih celicah (HEp-2 celice). Bolnike s pozitivnim

testom na Hep-2, je potrebno testirati tudi na specifične antigene (SS-A/Ro, SS-B/La, Sm, U1RNP itd). Protitelesa anti-Sm so diagnostično specifična za SLE in so poleg pozitivnih protiteles proti jedrnim antigenom in dsDNA eden od diagnostičnih kriterijev za SLE. Titer protiteles anti-Sm se le redko spreminja, medtem ko se titer anti-dsDNA protiteles spreminja z aktivnostjo bolezni. Pri tretjini bolnikov s SLE so prisotne tudi povišane koncentracije antifosfolipidnih protiteles (8).

1.1.2 VLOGA IN PROGNOŠTIČNA VREDNOST ANTI-dsDNA PROTITELES PRI SLE

Anti-dsDNA protitelesa tvorijo imunske komplekse v krvi in v tkivih. Zaradi zmanjšanega števila in zmanjšane funkcije receptorjev Fc in komplementnih receptorjev je njihovo odstranjevanje pomanjkljivo in povzročajo vnetja. V ledvicah se imunski kompleksi dsDNA-anti-dsDNA kopičijo in nalagajo v subendoteliju in mezanglijskem prostoru. Imunski kompleksi vsebujejo anti-dsDNA protitelesa, ki se vežejo preko nukleosomov na glomerularno bazalno membrano in povzročajo vnetje, kar se kaže kot nefritis. Visoko avidna anti-dsDNA so povezana z boleznimi ledvic (7). Nekatera anti-dsDNA križno reagirajo z receptorji N-metil-D-aspartata, ki se večinoma nahajajo v možganih. Vežejo se na nevronske celice in jih uničijo, kar naj bi vodilo k nevrokognitivnim okvaram (2). Nizko avidna anti-dsDNA protitelesa naj bi bila povezana z okvarami v možganih (4).

Potek in prognoza SLE sta odvisna od prizadetosti posameznih organov in tkiv. Ko so prizadeti ledvice, srce, pljuča in osrednji živčni sistem, je prognoza slabša in lahko privede do odpovedi organov (8). Bolniki s SLE imajo različna avtoprotitelesa, od katerih so anti-dsDNA najbolj specifična in jih zaznamo pri skoraj vseh bolnikih z aktivno boleznijo. Ugotovili so, da je količina protiteles povezana z aktivnostjo bolezni, vendar je ta korelacija dokazana samo za visoko avidna protitelesa, ki se določajo z RIA. Nizko avidna protitelesa niso tako pomembna za SLE, saj imajo majhno prognoštično vrednost. Pri teh bolnikih ima bolezen precej blag potek brez prizadetosti ledvic. Avidnost protiteles se tekom bolezni ne spreminja, kar kaže na to, da ima avidnost veliko prognoštično vrednost (4).

1.1.3 PROTITELESA ANTI-dsDNA IN TERAPIJA

SLE je kronična avtoimunska bolezen, katere potek ima občasne zagone in vmesne faze mirovanja bolezni. Nivo protiteles anti-dsDNA napoveduje aktivnost bolezni – njihova količina v serumu se zviša med zagonom bolezni (6), čeprav nekatere študije kažejo, da se to zgodi samo pri 40 % bolnikih (7). Protitelesa anti-dsDNA se uporabljajo tako za diagnostiko kot za spremljanje aktivnosti bolezni. Zagon bolezni lahko preprečimo z uporabo agresivnih zdravil, ki pa imajo mnogo neželenih učinkov. Zdravila, ki se uporabljajo za zdravljenje SLE, zavirajo vnetje ali imunski odziv ter zmanjšujejo bolečino. Zaradi preprečevanja dodatne obremenitve organizma bolnikov je zelo pomembno, da so metode za določanje protiteles proti dsDNA analizo natančne in analizo specifične. Ob spremljanju protiteles anti-dsDNA se odmerek zdravil optimizira tako, da se zmanjšajo

stranski učinki zdravil (10). Priporočajo spremljanje anti-dsDNA na 4-6 tednov, s čimer se lahko zazna in pravočasno prepreči ponovni zagon bolezni (4).

Za zdravljenje SLE se uporabljajo:

- nesteroidna protivnetna zdravila npr. acetilsalicilna kislina, ki se uporabljajo proti bolečinam ob vnetju sklepov. Pogosti stranski učinki so bolečine v trebuhu in nagnjenost h krvavitvam.
- zdravila proti malariji npr. hidoksiklorokin, ki se uporabljajo za zdravljenje kožnih izpuščajev. Povzročijo lahko spremembe v očesni mrežnici, zato morajo bolniki opravljati kontrolne preglede pri okulistu.
- kortikosteroidi npr. prednizon, ki delujejo protivnetno in zavirajo aktivnost imunskega odziva. So osnovna zdravila za zdravljenje SLE. Začetni odmerek in pogostost dajanja sta odvisna od stopnje bolezni in prizadetosti notranjih organov. Kortikosteroidi imajo veliko stranskih učinkov. Pojavlja se spremenjen zunanji izgled (dvig telesne teže, prekomerna poraščenost, aknavost), večje tveganje za okužbe, težave z želodcem, povišan krvni tlak, motnje v presnovi glukoze, depresije, težave z očmi (katarakta, glavkom), osteoporoza, zastoj v rasti. Večina stranskih učinkov je prehodnih in izzvenijo, ko se zmanjša odmerek ali se preneha zdravljenje.
- imunosupresijska zdravila npr. metotreksat, ciklofosamid zmanjšujejo vnetje in zavirajo imunski odziv. Uporabljajo se takrat, ko s kortikosteroidi ne morejo umiriti bolezni in je zdravljenje s kortikosteroidi povezano z resnimi stranskimi učinki ali pa, če se s kombinacijo zdravil doseže boljši nadzor nad boleznijo. Ta zdravila zavirajo sintezo DNA in preprečujejo normalno delitev celic. Posledica je zaviranje delovanja kostnega mozga (levkopenija, anemija, trombocitopenija), pljučnica, pljučna fibroza, driska, GIT razjede, krvavitve, bolezni jeter, ledvična odpoved, menstrualne motnje, impotenca, povzročajo neplodnost. Zdravila so tudi teratogena (10,11).

Nekatera zdravila npr. prokainamid, kloropromazin, metildopa so lahko neposreden vzrok za z zdravili povzročen SLE. Poznanih je že več kot 80 zdravil, ki sprožijo to bolezen. V manj kot 5% se lahko pojavijo protitelesa proti dsDNA (12), vendar je pri detekciji protiteles proti dsDNA in interpretaciji rezultatov tudi to potrebno upoštevati.

1.2 INTERAKCIJE dsDNA IN PROTITELES

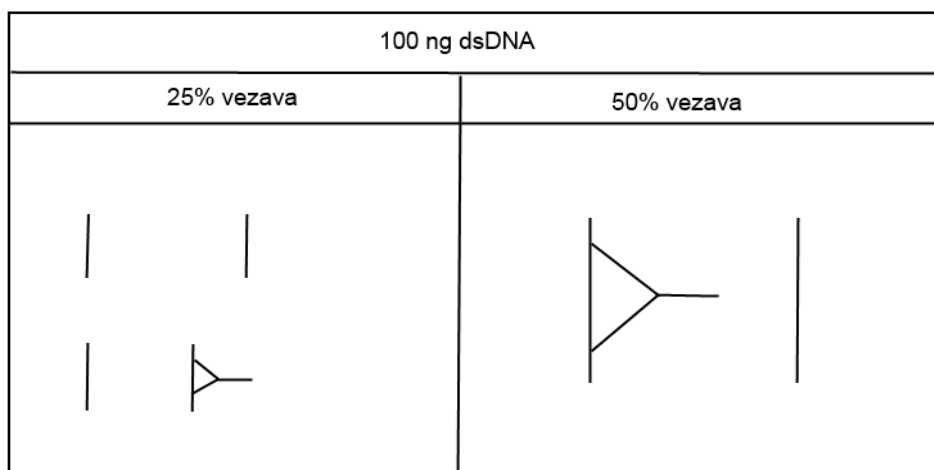
1.2.1 ANTIGEN dsDNA

dsDNA je biološki polimer s ponavljajočimi se enotami nukleotidov, konformacijsko urejenih v zavoje, kar omogoči protitelesom vezavo na ponavljajoče antigenske determinante. Za stabilno interakcijo med protitelesi in dsDNA je potrebno 40 do več 100 baznih parov, pri čemer je konformacijska urejenost pomembnejša od sekvence baznih parov. Obenem je dsDNA polianion zaradi povezovalne verige iz fosfatnih ostankov med nukleotidi. To napravi dsDNA dovezetnejšo za vezavo serumskih proteinov, saj se mnogo serumskih proteinov (komplement, različni tipi imunoglobulinov) lahko veže na dsDNA pri fizioloških pogojih, kar povzroča težave pri določanju protiteles anti-dsDNA.

Nespecifične reakcije preprečimo predvsem z inaktivacijo komplementa in z uporabo nefizioloških pufrov z visoko ionsko jakostjo in višjim pH npr. boratni pufer s pH=8,0 (14).

DNA se kot antigen lahko pojavlja kot dsDNA ali kot ssDNA. Molekula dsDNA lahko po segrevanju in hitrem zamrzovanju denaturira in nastanejo enoverižne regije, kar lahko vodi k lažno pozitivnim rezultatom pri določitvi protiteles anti-dsDNA, hkrati pa je ta denaturirana oblika različna od naravno prisotne ssDNA (14).

Za določanje protiteles anti-dsDNA je pomembna velikost antigena. Stopnja vezave protiteles proti dsDNA je linearno odvisna od velikosti dsDNA. Pri RIA metodi obarjamo nastale imunске komplekse med dodano dsDNA markirano s ^{14}C in protitelesi – proteini v serumu bolnika, ter merimo signal ^{14}C na dsDNA. Vezava protiteles na daljše molekule dsDNA da več signala, na krajše pa manj (Slika 3) (15).



Slika 3 - Vpliv velikosti molekule dsDNA na stopnjo vezave protiteles

Za analizo specifičnost metode je zelo pomembna čistost antigena. Nečistoče, ki se lahko pojavljajo pri pripravi antigena dsDNA, so lahko proteini, predvsem nukleoproteini in ssDNA. Serumi bolnikov s SLE lahko vsebujejo protitelesa proti nukleoproteinom in ssDNA, kar vodi k lažno pozitivnim rezultatom pri določanju protiteles proti dsDNA (15).

1.2.2 PROTITELESA PROTI DNA IN NJIHOVA AVIDNOST

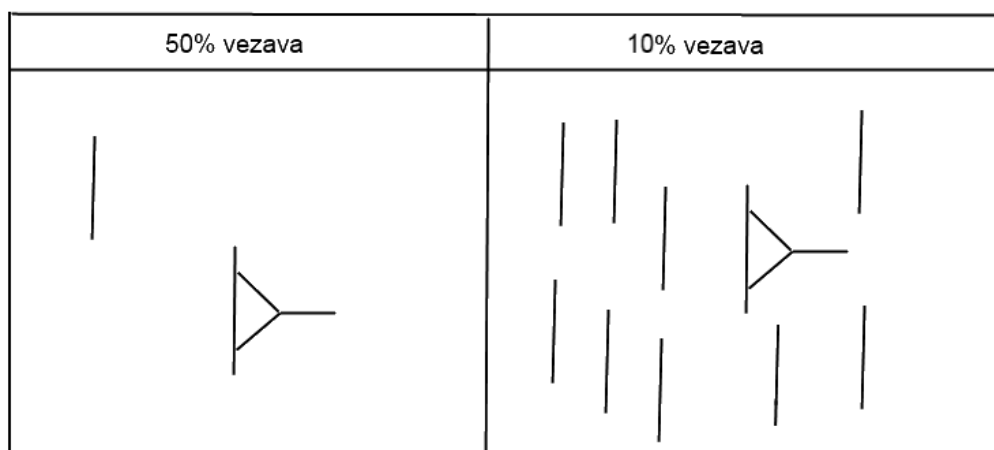
Pri SLE nastanejo različni razredi in podrazredi protiteles (IgG, IgM in IgA) proti dsDNA (16). Pri 70-80% bolnikov s SLE, ko je bolezen aktivna, so prisotna visoko avidna IgG dsDNA protitelesa (17). Nekateri bolniki s SLE imajo večinoma IgM protitelesa ali nizko avidna IgG protitelesa, ki pa niso uporabna za diagnostiko SLE, saj se pojavljajo tudi pri drugih boleznih (z zdravili povzročeni SLE, revmatoidni artritis, kronične jetrne bolezni, kronične infekcije). Protitelesa proti dsDNA, ki so prisotna pri aktivnem nefritisu, se lahko idiotipsko razlikujejo od tistih, ki so prisotna pri neaktivni bolezni (17).

Protitelesa proti DNA lahko razdelimo v dve skupini. Tista, ki reagirajo z denaturirano ssDNA in tista, ki reagirajo z nativno dsDNA. Anti-ssDNA niso diagnostično specifična za SLE, saj se pojavljajo tudi pri drugih avtoimunskih boleznih (revmatoidni artritis, z zdravili povzročeni SLE) in pri zdravih ljudeh (17). Anti-ssDNA protitelesa tudi ne sledijo dobro aktivnosti bolezni, zato niso primerna za spremljanje bolezni. Večinoma prepoznajo purinske in pirimidinske baze, v manjši meri pa tudi nukleozide, nukleotide in ribozafosfatne konce. Ker so ti epitopi na dsDNA zakriti, anti-ssDNA protitelesa ne morejo z njimi reagirati v imunski kompleks in tako ne prispevajo k pozitivnim rezultatom pri določanju protiteles proti dsDNA, v kolikor je antigen prisoten samo v obliki dsDNA (17,18).

1.2.3 IMUNSKI KOMPLEKSI dsDNA - anti-dsDNA

Analizna občutljivost in specifičnost metod za določanje protiteles proti dsDNA je zelo odvisna od reakcijskih pogojev. Najpomembnejša reakcijska pogoja sta ionska jakost in pH pufrov. Interakcija med antigenom dsDNA in protitelesi anti-dsDNA oz. nastanek imunskih kompleksov je inhibirana, ko sta ionska jakost in pH pufrov zvišana (19).

V metodi je zaradi podajanja rezultata pomembno tudi razmerje med antigenom in protitelesi. V kolikor povečamo količino antigena pri isti količini protiteles, dobimo manjši delež vezave, kar zmanjša analizo občutljivost metode (Slika 4) (19). Pri tem pa se poveča tudi delež napake.



Slika 4 - Vpliv količine dsDNA na določanje protiteles anti-dsDNA

Za nastanek imunskih kompleksov je pomembno razmerje med antigenom in protitelesi (20). Z uporabo manjše količine antigena dsDNA se poveča analizna občutljivost metode, saj so pri normalnih serumih opazili povečano stopnjo vezave na dsDNA. Težko pa je pripraviti majhno količino antigena z dovolj visoko specifično aktivnostjo, kar posledično vpliva na fizikalne lastnosti dsDNA (19).

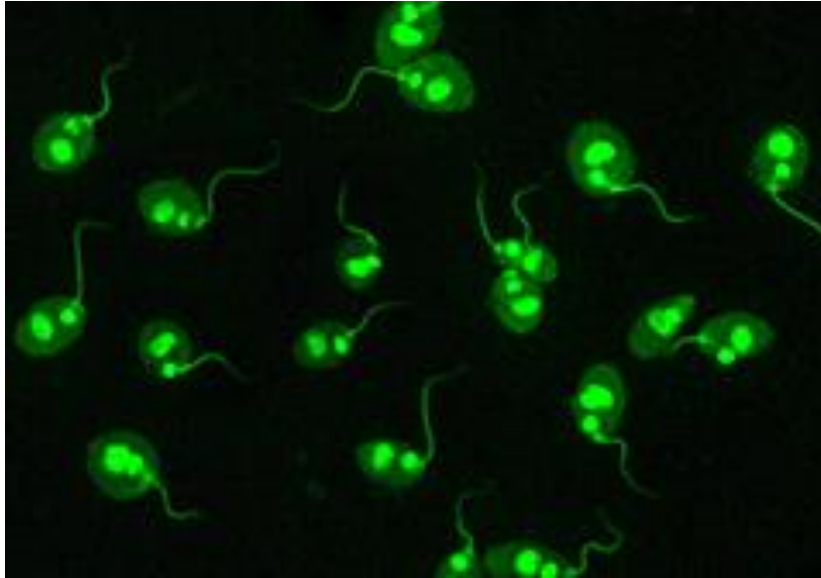
Ionska jakost in pH imata velik vpliv na reakcijske pogoje pri nastanku imunskih kompleksov. Pri nefizioloških pufrih, nefizioloških ionskih jakostih in nefiziološkem pH-ju se antigen dsDNA veže s sestavino komplementa C1q, kar daje lažno negativne rezultate pri določanju protiteles proti dsDNA. Temu se izognemo s segrevanjem seruma v vodni kopeli pri $T=56^{\circ}\text{C}$ 30 minut, pri čemer se C1q delno inaktivira pa tudi z ustrežno ionsko jakostjo in ustreznim pH. To so tudi pogoji, kjer zajamemo samo visoko avidna protitelesa (19).

1.3 METODE ZA DOLOČANJE ANTI-dsDNA IN NJIHOVA PROBLEMATIKA

Za merjenje protiteles proti dsDNA je razvitih več metod na osnovi različnih tehnik. Med starejše uvrščamo tehniko precipitacije s polietilenglikolom, fiksacijo komplementa in hemaglutinacijo, ki so vse analizo zelo slabo občutljive (4). Danes se uporabljajo predvsem indirektna imunofluorescenca s *Crithidio luciliae* (CLIF), radioimunske metode (RIA) in encimsko imunske metode na trdnem nosilcu (ELISA), ki so bolj analizo specifične in analizo občutljive (6). Vsaka od metod ima svoje prednosti in slabosti zaradi uporabe različnih pogojev, načinov detekcije in podajanja rezultatov.

1.3.1 INDIREKTNA IMUNOFLUORESCENCA S CHRITHIDIO LUCILIAE (CLIF)

Z metodo indirektna imunofluorescence se lahko določajo avtoprotitelesa proti dsDNA z obarvanjem kinetoplasta znotraj organizma *Crithidia luciliae*. *Crithidia luciliae* je hemoflagelat, parazit mesarske muhe in ni patogen za človeka. Kinetoplast je cirkularna DNA znotraj velikega mitohondrija in vsebuje veliko količino dsDNA. Ne vsebuje pa ssDNA, histonov ali drugih podobnih antigenov in tako se izognemo lažno pozitivnim rezultatom. Kinetoplast se nahaja med centralno lociranim jedrom in bazalnim telescem bička. Protitelesa v bolnikovem serumu se z dsDNA v kinetoplastu med inkubacijo vežejo v imunske komplekse. Po dodatku konjugata t.j. sekundarnih konjugiranih protiteles, označenih s fluoresceinom, nastanejo imunski kompleksi. Pozitiven rezultat je rumenozelena fluorescenca, ki jo opazujemo z UV mikroskopom (Slika 5) (21).



Slika 5 - Prikaz pozitivnega obarvanja s CLIF (21)

1.3.2 RADIOIMUNSKA METODA (RIA)

Izvedba metode je nekompetitivna. Anti-dsDNA v serumu se vežejo kvantitativno v imunske komplekse z antigenom, ki je radioaktivno označena dsDNA. Imunski kompleksi se oborijo z dodatkom nasičenega amonijevega sulfata in se tako ločijo od nevezane dsDNA. Supernatant po centrifugiranju ločimo od oborine, dodamo scintilacijsko tekočino in izmerimo količino sevanja v obeh delih. Rezultat podajamo kot delež sevanja vezane radioaktivno označene dsDNA v oborini glede na sevanje cele količine dodane dsDNA (22).

1.3.3 ENCIMSKO IMUNSKA METODA NA TRDNEM NOSILCU (ELISA)

Encimsko imunska metoda na trdnem nosilcu (ELISA) se lahko uporablja tudi za določanje protiteles proti dsDNA (indirektna ELISA). Na mikrotitersko ploščico vežemo dsDNA kot antigen, dodamo serum s protitelesi, ki se vežejo na dsDNA. Po spiranju nevezanih snovi, vežemo protitelesa v nastalem imunskem kompleksu s sekundarnimi protitelesi, konjugiranimi z encimom. Nevezana sekundarna protitelesa speremo in dodamo substrat za reakcijo z encimom. Intenziteto obarvanega produkta reakcije oziroma absorbanco merimo spektrofotometrično (Slika 6) (6,20).



Slika 6 - Prikaz pozitivne obarvanosti pri ELISA (23)

1.3.4 PROBLEMATIKA DOLOČANJA PROTITELES ANTI-dsDNA

Metode za merjenje anti-dsDNA se med seboj razlikujejo po principu detekcije imunske reakcije in po izvoru in čistoči antigena. Razlike v antigenu lahko privedejo do detekcije različnih protiteles. Kot antigen se lahko uporabljajo DNA iz *E. coli*, telečja DNA, bakteriofagi, plazmidi, kinetoplast (16). Pri anti-dsDNA RIA je zelo pomembna velikost dsDNA, ki mora biti večja od 10^5 toda manjša od 10^7 kDa. S takšno velikostjo dosežemo primerno izpostavljenost antigenskih epitopov (7). Nove generacije encimsko imunskih metod uporabljajo sintetični oligonukleotid, rekombinantno DNA, ki pa ne izpostavlja vedno pomembnega epitopa (7,24). Zaradi nečistoč antigena lahko pride do razlik zaradi vezave med protitelesi in neimunoglobulinskimi proteini. Nečistoče so lahko na DNA (predvsem telečji) vezani proteini npr. histoni in motijo določitev anti-dsDNA protiteles. Tako lahko pride do detekcije drugih protiteles, celo imunskih kompleksov (6).

Posebna izvedba RIA, metoda po Farru (FARR RIA) še vedno velja za zlati standard in z njo lahko določamo samo visoko avidna protitelesa proti dsDNA. Metoda je relativno dolgotrajna, nikoli ni bila avtomatizirana, zahteva pa tudi uporabo radioaktivne s ^{14}C označne dsDNA in velike količine toksičnih kemikalij kot so dioksan, naftalen in scintilatorji. Zato je škodljiva za ljudi in okolje, zahteva posebej usposobljeno osebje (25) in poseben režim za odstranjevanje odpadkov. Trenutno velja CLIF kot prvostopenjska metoda z rezultati, ki imajo višjo diagnostično specifičnost kot rezultati, dobljeni z anti-dsDNA ELISA, vendar nižjo diagnostično občutljivost kot rezultati s FARR RIA. Ker pa CLIF ni kvantitativna metoda, ni primerna za spremljanje aktivnosti bolezni. Različne izvedbe anti-dsDNA ELISA so kvantitativne, ponovljive, lahko tudi avtomatizirane metode z rezultati s sicer najvišjo diagnostično občutljivostjo toda ob najnižji diagnostični specifičnosti in s tem najnižjo diagnostično uporabnostjo (24,26). Bertolaccini in sod. navajajo, da ima 60-80 % SLE bolnikov anti-DNA protitelesa pozitivna v istem času tekom bolezni, izmerjena s testi anti-dsDNA RIA, CLIF in ELISA (8).

Metode lahko zaznajo različne izotipe ali kombinacijo protiteles. Za RIA je značilno, da zazna IgG, IgM in IgA, CLIF zazna IgG, medtem ko ELISA IgG in/ali IgM (6). Visoko avidna protitelesa proti dsDNA v serumu SLE bolnikov so diagnostično specifična pri prizadetosti ledvic. RIA določa samo visoko avidna protitelesa. Zaradi visoke ionske moči amonijevega sulfata zajamemo samo stabilne imunske komplekse z visoko avidnimi anti-dsDNA, medtem ko imunski kompleksi z nizko in srednje avidnimi protitelesi razpadejo in jih ne določimo (27). Srednje in/ali nizko avidna avtoprotitelesa, ki se določajo z metodami CLIF in encimsko imunskimi metodami se lahko pojavljajo tudi pri drugih revmatičnih obolenjih (4). Pri metodah ELISA, ki uporabljajo kot antigen izolirano telečjo DNA, je zelo verjetno, da bomo velikokrat zaznali tako anti-dsDNA kot anti-ssDNA protitelesa. Za odstranitev ssDNA (razgrajena telečja dsDNA) bi morali obdelati telečjo DNA z nukleazo S1 tik pred testiranjem, vendar se ta korak v rutini ne izvaja. Anti-ssDNA protitelesa pa ne reagirajo s plazmidno in bakteriofagno DNA, ki se uporablja pri nekaterih ELISA testih (28). Pri CLIF imamo v kinetoplastu samo dsDNA, pri nekaterih primerih so dobili lažne pozitivne rezultate zaradi vezave antihistonskih protiteles (25). Poleg tega se na tržišču pojavljajo analizni kompleti različnih proizvajalcev, z različnimi karakteristikami, kar še otežuje neekspertnim laboratorijem uvedbo preiskave v rutino, oziroma zmanjšuje diagnostično uporabnost rezultatov.

1.4 UVEDBA METODE

In vitro diagnostični medicinski pripomočki so posebna skupina medicinskih pripomočkov med katere spadajo: instrumenti, aparati, reagenti, reagenčni izdelki, umerjevalci, kontrolni material, analizni kompleti in so namenjeni za preiskavo bioloških vzorcev. In vitro diagnostični medicinski pripomočki se lahko dajo v promet ali v uporabo, če izpolnjujejo zahteve predpisane s Pravilnikom o in vitro diagnostičnih pripomočkih (29) in ne ogrožajo zdravja in varnosti uporabnikov. Dosegati morajo ustrezno stopnjo analitične in diagnostične občutljivosti, analitične in diagnostične specifičnosti, natančnosti, meje zaznavnosti, mejo določljivosti (29). Pravilnik o in vitro diagnostičnih pripomočkih pa se ne uporablja za pripomočke, izdelane in uporabljene samo znotraj iste zdravstvene ustanove (30).

Validacija metode je proces, s katerim potrdimo, da metoda dosega predpisane rezultate in ustreza namenu uporabe (31). Laboratorij lahko z njeno uporabo zagotovi, da so metode, ki jih uporablja pri svojem delu, primerne in vključujejo vse posebne zahteve. To so: analizna natančnost, analizna točnost, analizna občutljivost, analizna specifičnost, linearnost, meja določljivosti (32,33).

Ponovljivost rezultatov je merilo za *analizno natančnost*, ki ga podajamo kot relativni standardni odmik (SD) ali koeficient variacije (KV). Koeficient variacije je kvocient med SD in srednjo vrednostjo. Manjša vrednost SD pomeni večjo natančnost, večja vrednost SD pa manjšo natančnost opravljenih analiz (32,33).

Analizna točnost je merilo pravilnosti metode oz. stopnje ujemanja izmerjenih rezultatov s pravo vrednostjo. Manjša kot je razlika med dobljeno in pravo vrednostjo, bolj je metoda

točna. Točnost lahko določimo tudi s testom dodatka. Preizkus točnosti izvedemo z več meritvami pri vsaj treh različnih vrednostih in se izraža kot relativna napaka (32,33).

Analizna občutljivost je najmanjša koncentracija oz. količina analita v vzorcu, ki jo metoda zazna. Analizna občutljivost je lahko tudi meja zaznavnosti (LOD), ni pa nujno, da jo kvantitativno določimo. Metoda, ki zazna nižje koncentracije je bolj analizno občutljiva. Statistično se lahko določi tako, da se izračuna točka, pri kateri se signal loči od ozadja (na podlagi razmerja signal/šum) ali empirično z redčenjem vzorca znane koncentracije. Analizna občutljivost je tudi najmanjša sprememba koncentracije ali količine analita, ki jo z metodo še zaznamo (32,33).

Analizna specifičnost ali selektivnost podaja stopnjo ločitve analita od drugih komponent, ki so prisotne v vzorcu (32,33).

Linearnost je lastnost metode, da v določenem območju, daje proporcionalne rezultate, ki so odvisni od koncentracije analita v vzorcu. Linearnost se določi na podlagi umeritvene krivulje standardnih raztopin v različnih koncentracijskih območjih. S Pearsonovim koeficientom r oziroma korelacijskim koeficientom se oceni odnos med koncentracijo analita in odzivom. V primeru linearnosti mora biti r večji od 0,99 (32,33).

Meja določljivosti ali LOQ (Limit of quantification) je najnižja koncentracija analita v vzorcu, ki zagotavlja dovolj visok signal, da ga lahko kvantitativno določimo z ustrezno natančnostjo in točnostjo (32,33).

Pri uvajanju novih metod, ki določajo diagnostične parametre je potrebno preveriti diagnostično uporabnost rezultatov. Diagnostična uporabnost je določena z diagnostično občutljivostjo in diagnostično specifičnostjo (34).

Diagnostična občutljivost (DO) predstavlja delež bolnikov s preiskovano boleznijo, pri katerih je rezultat pozitiven. *Diagnostična specifičnost* (DS) predstavlja delež oseb brez preiskovane bolezni, pri katerih je rezultat negativen (34).

Optimalna preiskava, ko sta zdrava in bolna populacija ločeni, bi imela DS in DO 100%. Izbira prazne vrednosti zato zelo vpliva na diagnostično občutljivost in diagnostično specifičnost. Ponavadi nimamo v celoti ločenih vrednosti zdrave in bolne populacije in se delno prekrivajo. Pri znižanju prazne vrednosti se poveča diagnostična občutljivost, vendar se zmanjša diagnostična specifičnost. Pri zvišanju prazne vrednosti se zviša diagnostična specifičnost, ampak zniža se diagnostična občutljivost (več lažno negativnih rezultatov) (34).

Uvajanje nove metode ali nadomeščanje obstoječe je kompleksen proces, pri katerem praviloma primerjamo lastnosti obeh metod. Pri metodah, s katerimi določamo protitelesa v imunokemijski reakciji pa je potrebno upoštevati tudi to, da z različnimi metodami ne določamo nujno iste skupine ali istih podskupin protiteles. Protitelesa bolnikov so praviloma poliklonska in se razlikujejo v epitopski specifičnosti do istega antigena, v afiniteti in v izotipu (11). Zaradi tega tudi lastnosti rezultatov (diagnostična specifičnost in občutljivost) niso vedno primerljive, saj gre za podobne, ne pa enake skupine protiteles. Pomembno je, da ob uvedbi posamezne imunokemijske metode izračunamo parametre diagnostične uporabnosti ločeno za rezultate, pridobljene z različnimi metodami.

2 NAMEN DELA

Magistrska naloga obravnava področje laboratorijske diagnostike sistemskih avtoimunskih bolezni z vidika obvladovanja orodij za detekcijo specifičnih avtoprotiteles.

Namen dela je bil :

Ugotoviti, ali lahko za detekcijo protiteles proti dsDNA namesto radioaktivnega označevalca antigena dsDNA enakovredno uporabimo fluorescentno barvilo PicoGreen. V okviru osnovnega namena smo se osredotočili na ožja vprašanja, kot so:

- ali uporaba fluorescentnega označevalca vpliva na lastnosti metode, kot so izvedbeni čas, določanje različno avidnih protiteles in posledično
- ali uporaba fluorescentnega označevalca vpliva na klinično uporabnost rezultatov
- ali se z uporabo fluorescentnega označevalca lahko v celoti izognemo delu z radioaktivnim izotopom in organskimi topili, ki so izjemno škodljivi za ljudi in okolje, ter zahtevajo posebno skladiščenje in kontrolirano uničevanje odpadkov

3 MATERIALI IN METODE

3.1 BIOLOŠKI MATERIAL

3.1.1 HUMANI VZORCI

Kri krvodajalcev smo dobili iz krvne banke Zavoda Republike Slovenije za transfuzijsko medicino (Priloga 1). V Laboratoriju za imunologijo revmatizma obstaja banka serumov bolnikov z različnimi sistemskimi boleznimi, katere smo uporabili pri nalogi (Priloga 2). Uporabili smo tudi vzorce, ki so prihajali dnevno v obdelavo v laboratorij. Kri brez dodanih antikoagulantov smo pustili koagulirati na sobni temperaturi. Nato smo jih centrifugirali pri sobni temperaturi pri RCF=1800xg. Serume smo do analize hranili v hladilniku na $T=4^{\circ}\text{C}$ ali pa so bili shranjeni v zamrzovalniku $T= -80^{\circ}\text{C}$.

Analizirali smo 759 vzorcev:

- 146 serumov krvodajalcev
- 70 serumov bolnikov s SLE
- 25 serumov bolnikov z APS
- 25 serumov bolnikov s SJS
- 28 serumov bolnikov z RA
- 465 serumov bolnikov, ki so bili poslani v Laboratorij za imunologijo revmatizma na preiskavo anti-dsDNA protitelesa s sumom na SLE ali z namenom izključitve SLE

3.1.2 KONTROLNI MATERIAL

Za kontrole smo uporabili serume bolnikov, ki so bili poslani v Laboratorij za imunologijo revmatizma na preiskavo anti-dsDNA protitelesa s sumom na SLE ali z namenom izključitve SLE. Kontrole so bile shranjene v zamrzovalniku na $T=-20^{\circ}\text{C}$, alikvotirane po 30 μl . Uporabili smo:

- serume bolnikov z visoko pozitivnim rezultatom (0,90)
- serume bolnikov s srednje pozitivnim rezultatom (0,60)
- serume bolnikov z negativnim rezultatom (manj kot 0,35)

3.2 KEMIKALIJE

1. ^{14}C -DNA, Amersham, Pharmacia Biote, Little Chalfont, Velika Britanija
2. boratna kislina (H_3BO_3), p.a.
3. natrijev tetraborat ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), Lex d.o.o., Koper, Slovenija
4. natrijev klorid (NaCl), p.a.
5. demineralizirana H_2O
6. 1,4-bis (4-metil-5-fenil-2-oksazolil) benzen ($\text{C}_{26}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$), (POPOP), Fluka, Sigma-Aldrich Chemie, Nizozemska
7. 2,5-difenil-oksazol ($\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{NO}$), (PPO), Fluka, Sigma-Aldrich Chemie, Nizozemska
8. naftalen, p.a.
9. metanol, p.a.
10. 1,4-dioksan za HPLC, Lex d.o.o., Koper, Slovenija
11. etilenglikol 99+%, Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA
12. amonijev sulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), p.a.
13. HCl 37%, Merck, Darmstadt, Nemčija
14. analizni komplet QIAmp DNA mini kit, QIAGEN, Duesseldorf, Nemčija (35), ki vsebuje:
 - proteinazo K,
 - pufer za raztapljanje proteinaze K
 - pufer za lizo celic (AL)
 - pufer za spiranje (AW1)
 - pufer za spiranje (AW2)
 - pufer za izpiranje (AE)
 - 2 ml epruvetke
 - kolone
15. absolutni etanol, p.a.
16. analizni komplet Qub-iT dsDNA HS ASSAY KIT, Invitrogen, Eugene, Oregon, ZDA (36), ki vsebuje:
 - Qub-iT dsDNA HS reagent (komponenta A)
 - Qub-iT dsDNA HS pufer (komponenta B)
 - standard 1 (0 ng/ μl v TE pufu)
 - standard 2 (100 ng/ μl v TE pufu)

3.3 PUFRI IN RAZTOPINE

Boratni pufer BBS, pH 8,0

- H_3BO_3 0,05 M
- $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$ 5 mM
- NaCl 0,1 M
- dH_2O do 1L
- pH uravnamo z 2M HCl

Brayeva scintilacijska raztopina

- POPOP 5 mM
- PPO 0,09 M
- naftalen 2,34 M
- metanol 0,5L
- dioksan 4,4L
- etilenglikol 0,1L

Nasičena raztopina amonijevega sulfata

Amonijevemu sulfatu dodamo toliko destilirane vode, da se amonsulfat pri 4°C ne topi več (topnost pri 4°C je 706g/L vode). V steklenički mora biti na dnu vsaj za 1cm neraztopljenega amonijevega sulfata.

Delovna raztopina ^{14}C -DNA pri RIA

1 ml originalne raztopine ^{14}C -DNA redčimo s 5 ml boratnega pufera, da je koncentracija DNA 2mg/L.

Delovna raztopina DNA pri FIA

BBS-u dodamo količino izolirane DNA (volumen je odvisen od koncentracije), da je koncentracija DNA 2mg/L.

Delovna raztopina fluorescenčnega barvila PicoGreen

Originalno raztopino fluorescenčnega barvila redčimo 1:200 s pufrom (QubitTM dsDNA, Invitrogen, Eugene, Oregon, ZDA).

3.4 APARATURE IN PRIBOR

- centrifuga Universal 320R, Hettich, Tuttlingen, Nemčija
- tehtnica Mettler Toledo, type PM2500, Mettler Toledo AG, Greifensee, Švica
- scintilacijski števec za merjenje beta sevanja
- fluorometer Qubit, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA
- mikroskop Nikon ECLIPSE E400, NICON Instruments Europe BV, AE Badhoevedorp, Nizozemska
- mešalo za mešanje vzorcev Assistant, Karl Hecht KG, Nemčija
- vodna kopel Eco Temp TWS, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Nemčija
- UV spektrofotometer, Cam Spec M501, Cambrige, Velika Britanija
- pH meter Mettler Toledo, SevenEasy, Corning Science Products, New York, ZDA
- droben laboratorijski material: pipete, nastavki za pipete, stojalo za epruvete, steklovina (čša, erlenmajerica, steklene epruvete, stekleničke), staničevina

3.5 METODE

3.5.1 RIA

Postopek RIA smo izvajali po navodilih T. Pincusa (37).

1.dan

Serum smo najprej dekomplementirali v vodni kopeli $T=56^{\circ}\text{C}$ 30 minut. V steklene epruvete smo dodali serum in BBS v razmerju 1:10, delovno raztopino ^{14}C -DNA, premešali in zamašili. Inkubirali smo v vodni kopeli pri $T=37^{\circ}\text{C}$ eno uro. Stojalo z epruvetami smo postavili v hladilnik na $T=4^{\circ}\text{C}$ čez noč (18-20h).

2.dan

V vsako epruveto smo dodali nasičeni amonijev sulfat v količini enaki izhodni mešanici in premešali z mešalom. Inkubirali smo eno uro pri $T=4^{\circ}\text{C}$ in oborino odcentrifugirali v ohlajeni centrifugi. Polovico tekočine smo odpipetirali v stekleničke, dodali BBS in po 10 ml Brayeve scintilacijske tekočine. Stekleničke smo dobro zamašili in jih označili s S. Preostanku v epruveti smo dodali BBS, premešali in tekočino kvantitativno prenesli v stekleničke ter dodali po 10 ml Brayeve scintilacijske tekočine. Stekleničke smo dobro zamašili in jih označili s P. Stekleničke smo postavili v stojalo in s stojalom v prenosno torbo ter jih pustili do naslednjega dne v hladni sobi $T=4^{\circ}\text{C}$. Štetje impulzov (cpm) v beta scintilacijskem števcu so izvedli na Kliničnem oddelku za nuklearno medicino Kliničnega centra v Ljubljani.

Rezultat smo podali v obliki deleža dodane ^{14}C -DNA, ki se veže v imunski kompleks s protitelesi iz seruma. Izračunali smo ga iz prešteti impulzov v oborini P in supernatantu S po formuli:

$$\frac{cpm P - cpm S}{cpm P + cpm S}$$

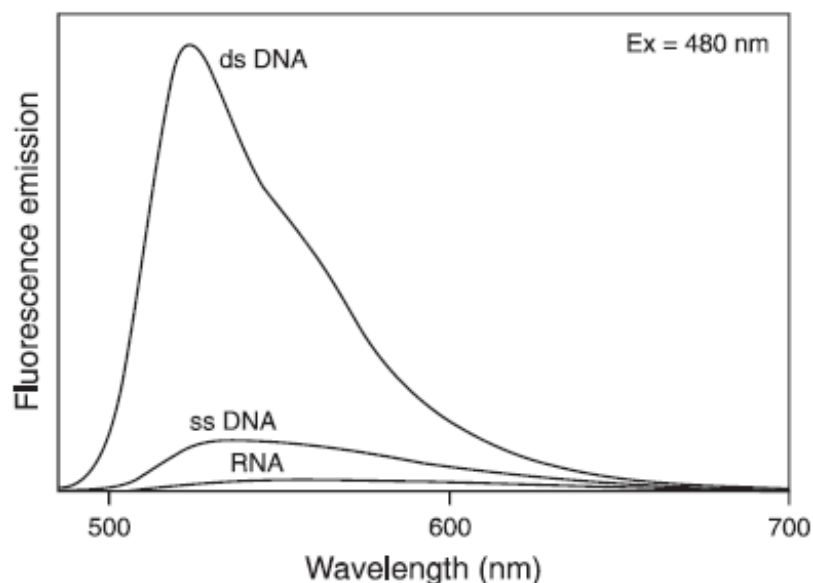
Negativen rezultat predstavljajo vrednosti $< 0,35$, pozitivne pa $> 0,35$. Celoten postopek oz. čas pridobitve rezultata je 1 teden do 10 dni. Ob ponavljanju izvedbe postopka se ta čas še podaljša. Pri vsaki seriji smo poleg vzorcev delali še tri interne kontrole: visoko pozitivno, srednje pozitivno in negativno kontrolo.

3.5.2 FIA

Postopek FIA smo izvajali po modificiranem postopku za RIA. Kot antigen smo uporabili izolirano človeško DNA iz venske krvi, kot marker pa fluorescenčno barvilo PicoGreen, ki izkazuje visoko specifično vezavo na dsDNA (Graf 1). Serum smo najprej dekomplementirali v vodni kopeli $T=56^{\circ}\text{C}$ 30 minut. V steklene epruvete smo prenesli mešanico BBS in izolirane DNA (volumen je odvisen od koncentracije izolirane DNA), premešali in zamašili. Epruvete smo za eno uro prestavili v vodno kopel na $T=37^{\circ}\text{C}$. Stojalo z epruvetami smo prenesli v hladilnik pri $T=4^{\circ}\text{C}$ čez noč (18-20h). Naslednji dan smo v vsako epruveto dodali nasičeni amonijev sulfat, premešali z mešalom, inkubirali eno uro v hladilniku ter centrifugirali v ohlajeni centrifugi. Pripravili smo mikrocentrifugirke, ki so priložene analiznemu kompletu in delovno raztopino fluorescenčnega reagenta PicoGreen. Supernatant smo odpipetirali v steklene epruvete označene s S. Del supernatanta smo prenesli v mikrocentrifugirke in dodali delovno raztopino fluorescenčnega barvila. Preostanek v stekleni epruveti smo premešali, epruvete označili s P in del prenesli v mikrocentrifugirke in dodali delovno raztopino fluorescenčnega barvila. Pripravili smo tudi dve standardni raztopini za umeritveno krivuljo. Fluorescenco v S in P smo izmerili s fluorometrom po 5 minutah (fluorescenca je stabilna 3 ure na sobni temperaturi). Iz izmerjenih fluorescenc S in P smo izračunali rezultat po formuli:

$$\frac{\text{fluorescenca } P - \text{fluorescenca } S}{\text{fluorescenca } P + \text{fluorescenca } S}$$

Celoten postopek oz. čas pridobitve rezultata je 2 dni. Pri vsaki seriji smo poleg vzorcev delali še tri interne kontrole: visoko pozitivno, srednje pozitivno in negativno kontrolo.



Graf 1 - Analizna specifičnost pri fluoroimunski metodi (FIA) (36)

3.5.3 IZOLACIJA DNA

Izolacijo DNA smo naredili s QIAmp DNA mini kitom. Za izolacijo DNA smo uporabili vensko kri, odvzeto s citratom, heparinom ali EDTA, ki jo lahko hranimo 10 dni na 2-8°C, nad 10 dni na -80°C. Glavni cilj je odstranitev motečih snovi (proteinov). Izolacijo smo izvedli na kolonah po navodilu proizvajalca (Qiagen) (35). DNA smo ob prisotnosti visoke koncentracije kaotropne soli vezali (adsorpcija z elektrostatskimi silami, vodikovimi vezmi in z dehidracijo) na silikagelsko membrano, ostale snovi smo odstranili s spiranjem s pufri. Čisto DNA smo nato izpirali s pufrom za izpiranje.

Priprava reagentov:

- 1,2 ml proteaznega topila smo dodali k liofolizirani proteazi
- AW1 pufri smo dodali etanol (96-100%) po navodilu proizvajalca
- AW2 pufri smo dodali etanol (96-100%) po navodilu proizvajalca

Postopek:

- 20 µl proteaze K smo napipetirali na dno 1,5 ml minicentrifugirne epice
- dodali smo 200 µl venske krvi
- dodali smo 200 µl pufra AL (pufer za lizo celic) in premešali na mešalniku 15 sekund
- vzorec smo inkubirali v vodni kopeli na 56°C 10 minut
- vzorec smo kratko centrifugirali, da se je tekočina zbrala na dnu

- vzorcu smo dodali 200 µl etanola (96-100%), premešali 15 sekund in kratko centrifugirali
- celotno mešanico smo prenesli v 2ml epruvete s kolono, ki so priložene kompletu in centrifugirali 1 minuto pri RCF=6000xg, da je vsa tekočina prešla v spodnji del
- kolono smo prenesli v 2ml epruveto (iz kompleta), prejšnjo s filtratom smo zavrgli
- dodali smo 500 µl pufra AW1 (pufer za spiranje) na kolono in centrifugirali pri maksimalni hitrosti RCF=6000xg 3 minute
- dodali smo 500 µl pufra AW2 (pufer za spiranje) na kolono in centrifugirali pri maksimalni hitrosti RCF=6000xg 3 minute
- po centrifugiranju smo kolono prenesli v 1,5ml epruveto (iz kompleta) in dodali 200 µl pufra AE (pufer za izpiranje DNA)
- po inkubaciji 1 minuto na sobni temperaturi (22-26°C) smo kolono ponovno centrifugirali pri RCF=6000xg
- koncentracijo DNA smo določili s spektrofotometrom

3.6 ENAČBE ZA RAČUNANJE PARAMETROV VREDNOTENJA METOD IN REZULTATOV

- a) analizno natančnost metode merimo s ponovljivostjo, ki je opredeljena s koeficientom variacije:

$$KV (\%) = \frac{s}{x} * 100$$

s = standardni odmik
x = povprečna vrednost

- b) analizno točnost metode opredelimo z relativno napako:

$$RN (\%) = \frac{x - \mu}{\mu} * 100$$

x = dobljena vrednost
µ = prava vrednost

- c) diagnostično specifičnost opredelimo kot delež resnično negativnih, ki nimajo bolezni

$$DS (\%) = \frac{\text{število resnično negativnih}}{\text{število resnično negativnih} + \text{število lažno pozitivnih}} * 100$$

- d) diagnostično občutljivost opredelimo kot delež resnično pozitivnih, ki imajo bolezen

$$DO (\%) = \frac{\text{število resnično pozitivnih}}{\text{število resnično pozitivnih} + \text{število lažno negativnih}} * 100$$

3.7 STATISTIČNE METODE

Statistično analizo rezultatov smo izvedli s pomočjo računalniškega programa SPSS/PASW v. 18.0.0.(IBM, Chicago, IL, ZDA) in Microsoft Excell (Microsoft, ZDA).

Pražno vrednost oziroma najnižjo smiselno koncentracijo, ki ima še klinični pomen, smo določili tako, da smo analizirali 146 krvodajalcev, ki predstavljajo zdravo populacijo. S testom Kolmogorov-Smirnov in koeficientoma sploščenosti in asimetrije smo najprej preverili porazdelitev rezultatov meritev anti-dsDNA protiteles. Pražna vrednost je bila določena kot 99 percentil izmerjenih rezultatov.

Za statistično analizo povezanosti dveh spremenljivk, v našem primeru dveh metod, smo uporabili metodo korelacije. Zaradi nenormalne porazdelitve meritev krvodajalcev smo uporabili Spearmanov koeficient korelacije.

Za primerjavo posameznih vzorcev smo zaradi nenormalne porazdelitve vrednosti meritev uporabili Wilcoxonov test predznačenih rangov, ki obravnava razlike pri posameznem paru.

Diagnostično uporabnost smo določili s krivuljo ROC tako, da smo na x os nanašali 1-specificitnost, na y os občutljivost. S pomočjo SPSS smo izračunali površino pod obema krivuljama.

4 REZULTATI

4.1 PRIMERJALNO VREDNOTENJE METOD FIA IN RIA

4.1.1 PRAKTIČNOST OZIROMA UPORABNOST

Praktičnost in uporabnost metode je ocenjena z vidika izvajalca – posameznika oz. laboratorija. S FIA se izognemo uporabi radioaktivnega izotopa, organskih topil in drugih škodljivih snovi, ki so škodljivi za zdravje in okolje. Za delo z radioaktivnim izotopom je potrebna ustrezna usposobljenost osebja in poseben prostor z digestorijem. Pri tej metodi ni radioaktivnih odpadkov, organskih topil, ki zahtevajo posebno skladiščenje, odvoz in uničenje. S FIA skrajšamo čas pridobitve rezultatov.

4.1.2 ANALIZNA NATANČNOST

Analizno natančnost v seriji smo določili s ponovljivostjo vzorcev. Ponovljivost smo za vsako metodo izračunali na osnovi treh serij, z desetimi ponovitvami v vsaki seriji. S KV smo ocenili razpršenost meritev v seriji. KV pri visoko pozitivnem vzorcu je pri obeh metodah 2%. Pri mejno pozitivnem vzorcu je KV pri FIA 28% (22-34%), pri RIA je 33% (11-61%) (Preglednica I).

Preglednica I - Znotrajanalizna ponovljivost rezultatov pri različnih vrednostih z radioimunsko (RIA) in fluoroimunsko (FIA) metodo

a) pri enem visoko pozitivnem vzorcu (rezultat izmerjen z rutinsko RIA: 0,93)

	FIA	FIA	FIA	RIA	RIA	RIA
	0,85	0,83	0,85	0,84	0,93	0,93
	0,84	0,80	0,86	0,88	0,91	0,89
	0,82	0,81	0,83	0,88	0,91	0,89
	0,81	0,83	0,84	0,91	0,91	0,89
	0,80	0,78	0,84	0,88	0,89	0,90
	0,86	0,80	0,84	0,88	0,91	0,91
	0,85	0,82	0,87	0,91	0,92	0,89
	0,83	0,78	0,84	0,89	0,92	0,91
	0,84	0,83	0,84	0,91	0,90	0,87
	0,84	0,80	0,88	0,88	0,89	0,91
POVP	0,83	0,81	0,85	0,88	0,91	0,90
SD	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01	0,02
KV (%)	2	2	2	3	2	2

b) pri enem mejno pozitivnem vzorcu (rezultat izmerjen z rutinsko RIA: 0,39)

	FIA	FIA	FIA	RIA	RIA	RIA
	0,27	0,18	0,19	0,15	0,27	0,37
	0,29	0,18	0,30	0,00	0,19	0,41
	0,30	0,17	0,33	0,28	0,20	0,39
	0,27	0,17	0,30	0,17	0,20	0,35
	0,23	0,18	0,09	0,05	0,29	0,36
	0,11	0,09	0,17	0,17	0,14	0,40
	0,29	0,13	0,29	0,40	0,20	0,39
	0,22	0,18	0,40	0,30	0,25	0,27
	0,23	0,26	0,31	0,18	0,17	0,35
	0,28	0,28	0,31	0,31	0,12	0,32
POVP	0,25	0,18	0,27	0,20	0,20	0,36
SD	0,06	0,05	0,09	0,12	0,05	0,04
KV (%)	22	30	34	61	27	11

Medanalizno natančnost smo določili s ponovljivostjo kontrolnih vzorcev. S KV smo ocenili razpršenost meritev med desetimi serijami. KV pri visoko pozitivni kontroli je pri obeh metodah enak 11-12%. Pri mejno pozitivni kontroli je KV pri RIA 29%, pri FIA je 18%. (Preglednica II).

Preglednica II - Medanalizna ponovljivost pri kontrolnih vzorcih z radioimunsko (RIA) in fluoroimunsko (FIA) metodo

	VISOKA		MEJNA	
	RIA	FIA	RIA	FIA
	0,87	0,81	0,65	0,39
	0,82	0,86	0,64	0,52
	0,77	0,71	0,54	0,46
	0,80	0,98	0,20	0,43
	0,80	0,80	0,60	0,34
	0,67	0,71	0,53	0,49
	0,61	0,97	0,32	0,46
	0,84	0,97	0,42	0,38
	0,87	0,80	0,61	0,33
	0,82	0,87	0,57	0,29
POVP	0,79	0,85	0,51	0,41
SD	0,08	0,10	0,15	0,07
KV (%)	11	12	29	18

4.1.3 ANALIZNA TOČNOST

Točnost metode smo določili s primerjavo izmerjene vrednosti s pričakovano vrednostjo vzorcev (izmerjena z RIA), ki so bili predhodno določeni v rednem diagnostičnem postopku. Izrazili smo jo z relativno napako. Naredili smo deset ponovitev v treh serijah. Za vsak vzorec smo izračunali aritmetično sredino in povprečno relativno napako. Točnost pri visoko pozitivnem rezultatu pri RIA je 96% in pri FIA 89%. Pri mejno pozitivnem rezultatu je točnost pri RIA 79%, pri FIA 58%. (Preglednica III).

Preglednica III – Analizna točnost radioumske (RIA) in fluoroimunske (FIA) metode pri različnih vrednostih

a) pri enem visoko pozitivnem vzorcu (rezultat izmerjen z rutinsko RIA: 0,93)

Metoda	Prava vrednost	Dobljena vrednost	RN (%)	Točnost (%)
RIA	0,93	0,84	4 (2-5)	96
FIA	0,93	0,83	11 (9-13)	89

b) pri enem mejno pozitivnem vzorcu (rezultat izmerjen z rutinsko RIA: 0,39)

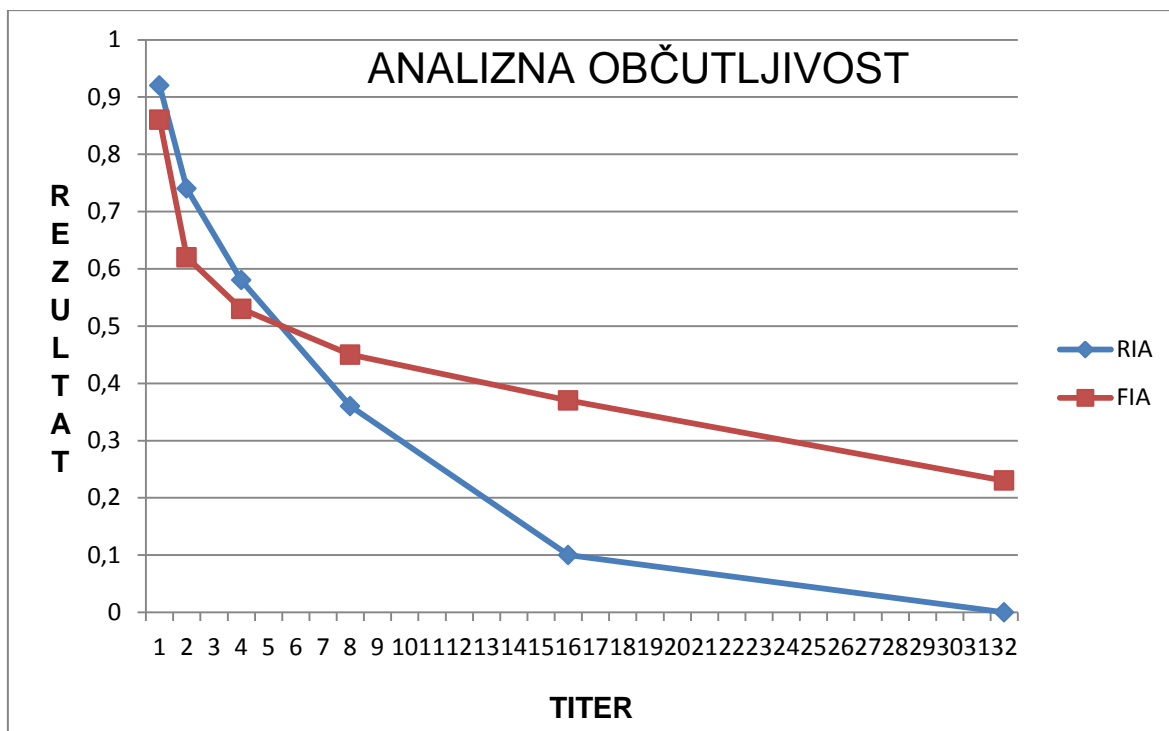
Metoda	Prava vrednost	Dobljena vrednost	RN (%)	Točnost (%)
RIA	0,39	0,25	21 (7-48)	79
FIA	0,39	0,23	42 (31-53)	58

4.1.4 ANALIZNA OBČUTLJIVOST

Analizno občutljivost smo določili tako, da smo visoko pozitiven vzorec (0,96) redčili do titra 32. Pripravili smo osnovno redčitev 50 μ l seruma + 450 μ l BBS in redčili do titra 32. To smo ponovili trikrat in izračunali povprečne vrednosti rezultatov. Analizna občutljivost pri RIA je pri titru 16, pri FIA imamo signal še pri zadnjem titru (Preglednica IV).

Preglednica IV - Analizna občutljivost pri radioimunske (RIA) in fluorometrični (FIA) metodi

	RIA	FIA
Vzorec 0,96	0,92	0,86
1:2	0,74	0,62
1:4	0,58	0,53
1:8	0,36	0,45
1:16	0,10	0,37
1:32	0,00	0,23



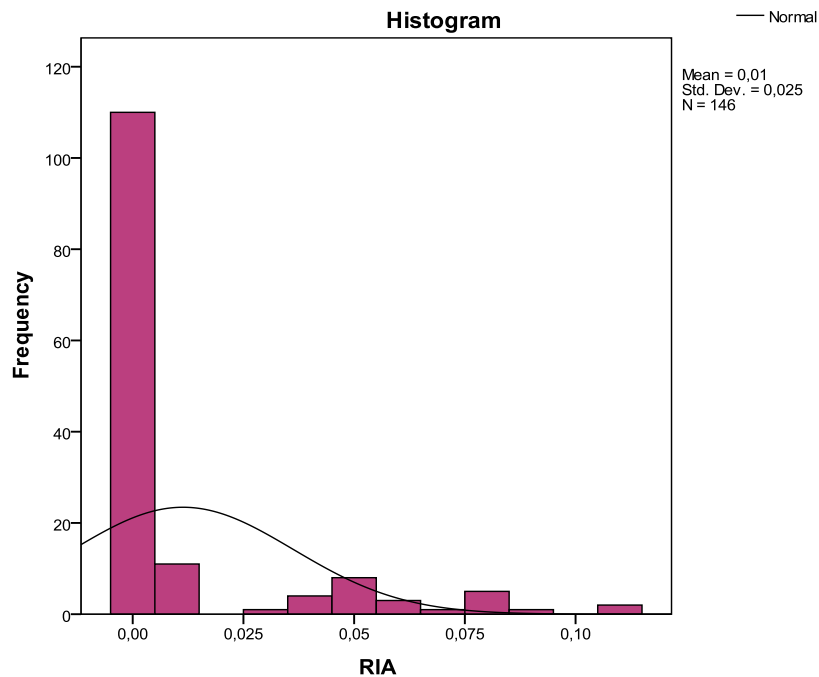
Graf 2 - Grafični prikaz analizne občutljivosti pri radioimunski (RIA) in fluoroimunski (FIA) metodi

Modra krivulja predstavlja analizo občutljivost pri RIA, rdeča krivulja predstavlja analizo občutljivost pri FIA (Graf 2).

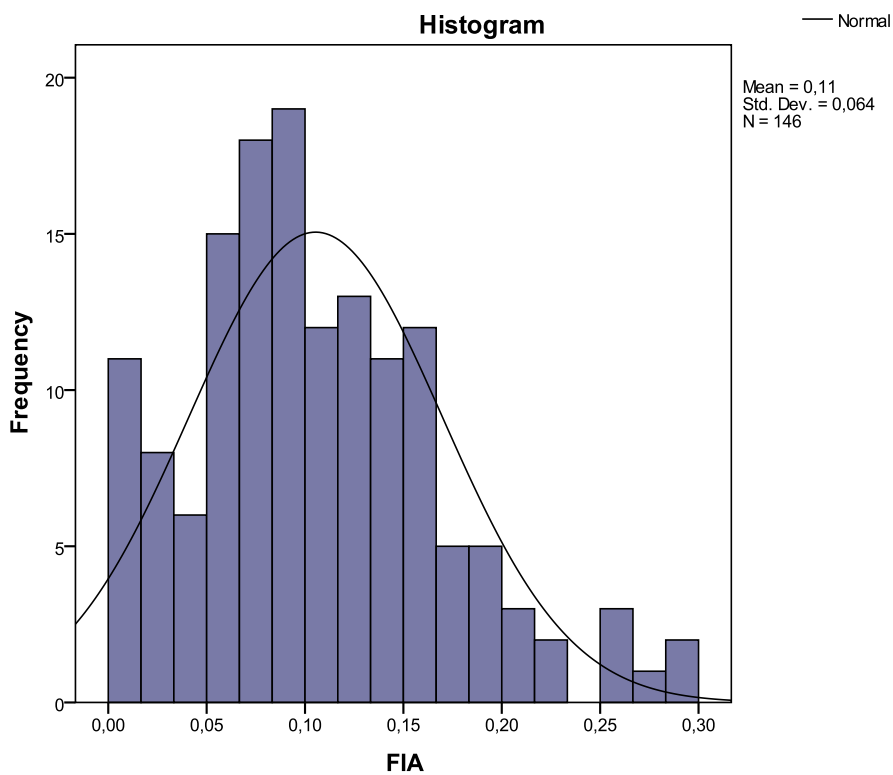
4.2 VREDNOTENJE REZULTATOV FIA IN RIA METODE

4.2.1 PORAZDELITEV TESTIRANIH VZORCEV

Normalnost porazdelitve meritev avtoprotiteles proti dsDNA pri krvodajalcih smo preverili s Kolmogorov-Smirnov testom in s koeficientoma asimetrije in sploščenosti. Krivulja za RIA metodo je desno asimetrična in sploščena (Graf 3). Koeficienta asimetrije in sploščenosti sta bila večja od 1 (Preglednica V), kar pomeni, da so se meritve krvodajalcev porazdelile nenormalno. To smo potrdili tudi s Kolmogorov-Smirnov testom, saj je bila izračunana stopnja značilnosti nižja od 0,01 ($p < 0,01$). Krivulja za FIA je desno asimetrična in koničasta (Graf 4). Koeficienta asimetrije in sploščenosti sta bila manjša od 1, kar pomeni, da so se meritve krvodajalcev porazdelile normalno. S Kolmogorov-Smirnov testom smo potrdili, da so se meritve krvodajalcev porazdelile normalno, saj je bila izračunana stopnja značilnosti večja od 0,01 ($p > 0,01$). Za določitev prazne vrednosti smo zaradi nenormalne porazdelitve rezultatov pri RIA metodi izračunali 99 percentilo za obe metodi. Za RIA je 0,11, za FIA pa 0,29. Pri obeh metodah smo poiskali minimalno in maksimalno vrednost, izračunali povprečno vrednost in SD (Preglednica V).



Graf 3 - Frekvenčna porazdelitev rezultatov anti-dsDNA protiteles določenih z radioimunsko metodo (RIA) pri krvodajalcih



Graf 4 - Frekvenčna porazdelitev rezultatov anti-dsDNA protiteles določenih s fluoroimunsko metodo (FIA) pri krvodajalcih

Preglednica V - Statistični kazalci porazdelitve rezultatov za krvodajalce pri radiomunski (RIA) in fluoroimunski (FIA) metodi

Statistični kazalci	RIA	FIA
Skewness	2,26	0,64
Kurtosis	4,28	0,49
K-Smirnov test (p)	0,00	0,09
99 percentila	0,11	0,29
SD	0,03	0,06
MIN	0,00	0,00
MAX	0,11	0,29
POVP	0,01	0,11

4.2.2 DIAGNOSTIČNA OBČUTLJIVOST IN DIAGNOSTIČNA SPECIFIČNOST

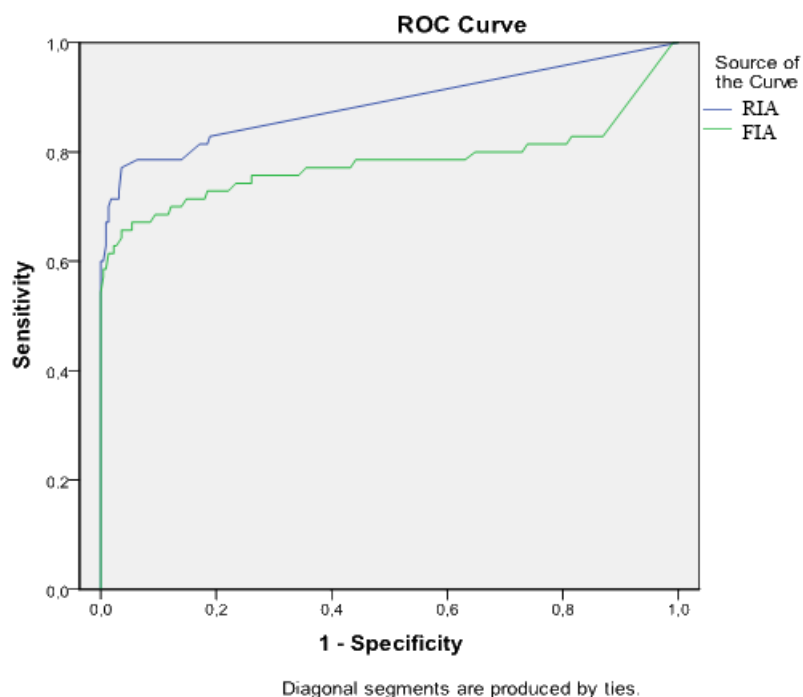
Diagnostično občutljivost in diagnostično specifičnost smo določili glede na izmerjene vrednosti pri štirih različnih avtoimunskih boleznih in krvodajalcih. Ob mejni vrednosti 0,35 je bila diagnostična občutljivost rezultatov RIA 50%, rezultatov FIA pa nekoliko višja (53%). Diagnostična specifičnost rezultatov obeh metod je bila 100%. Diagnostično občutljivost rezultatov RIA pri mejni vrednosti 0,11 (99 percentila) je bila 71%, rezultatov FIA ob mejni vrednosti 0,29 (99 percentila) pa 61%. Diagnostična specifičnost rezultatov RIA ob mejni vrednosti 0,11 je bila 97%, rezultatov FIA ob mejni vrednosti 0,29 pa 99%. Rezultati obeh metod so imeli primerljivo diagnostično občutljivost in primerljivo diagnostično specifičnost (Preglednica VI).

Preglednica VI - Diagnostična specifičnost (DS) in diagnostična občutljivost (DO) pri različnih praznih vrednostih

		SLE		DO	DS
		neg	poz		
RIA 0,35	neg	223	35	50	100
	poz	0	35		
FIA 0,35	neg	223	33	53	100
	poz	0	37		
RIA 0,11	neg	216	20	71	97
	poz	7	50		
FIA 0,29	neg	222	27	61	99
	poz	3	43		

4.2.3 DIAGNOSTIČNA UPORABNOST REZULTATOV

Uporabnost rezultatov, dobljenih s posamezno metodo, smo preverili s krivuljo ROC. Slednja prikaže razmerje med diagnostično občutljivostjo, izraženo z deležem pričakovano pozitivnih rezultatov in diagnostično specifičnostjo, izraženo kot razlika med deležem nepričakovano pozitivnih rezultatov in 1 (Graf 5). Večja površina pod krivuljo pomeni večjo diagnostično uporabnost. Površina pod ROC krivuljo za rezultate RIA je 0,89, za rezultate FIA je 0,78 (Preglednica VII).



Graf 5 - Primerjava diagnostične uporabnosti rezultatov z radioimunsko (RIA) in fluoroimunsko (FIA) metodo

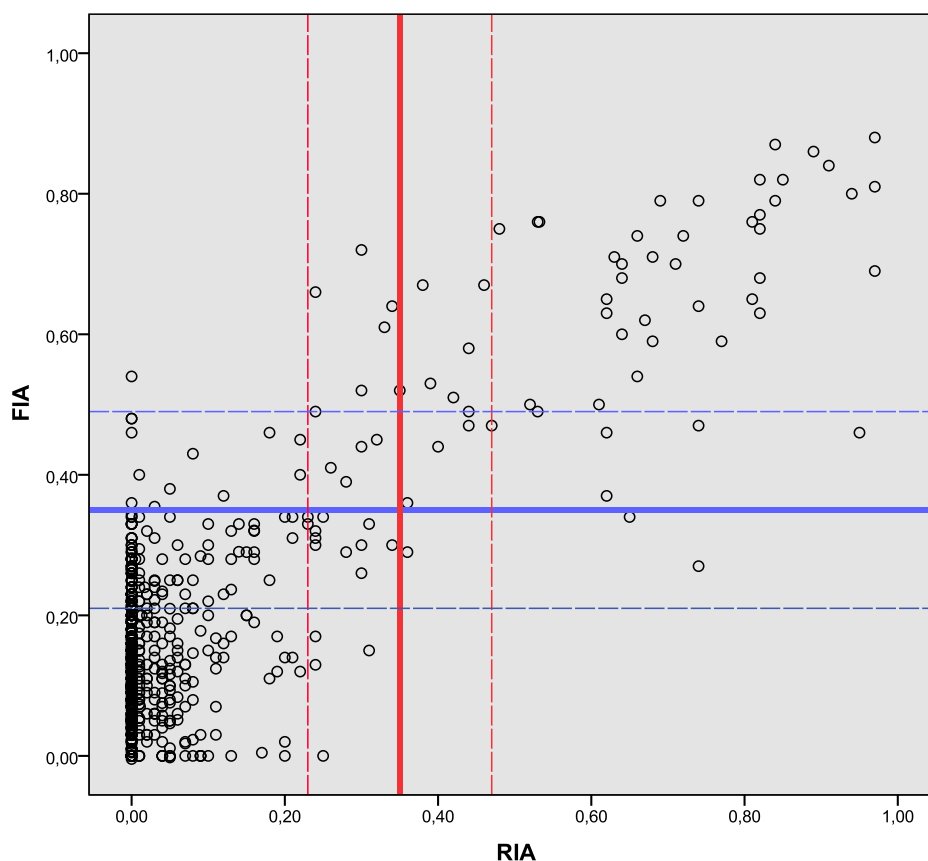
Preglednica VII - Površina pod ROC krivuljo za radioimunsko (RIA) in fluoroimunsko (FIA) metodo

METODA	POVRŠINA POD KRIVULJO
RIA	0,89
FIA	0,78

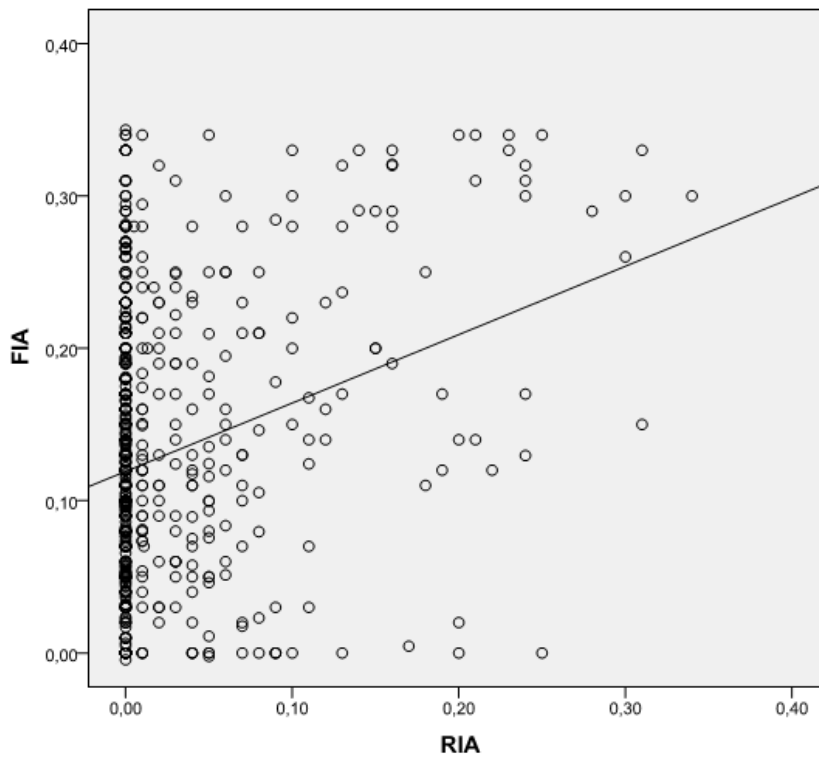
4.3 PRIMERJAVA REZULTATOV METOD FIA IN RIA

4.3.1 KORELACIJA

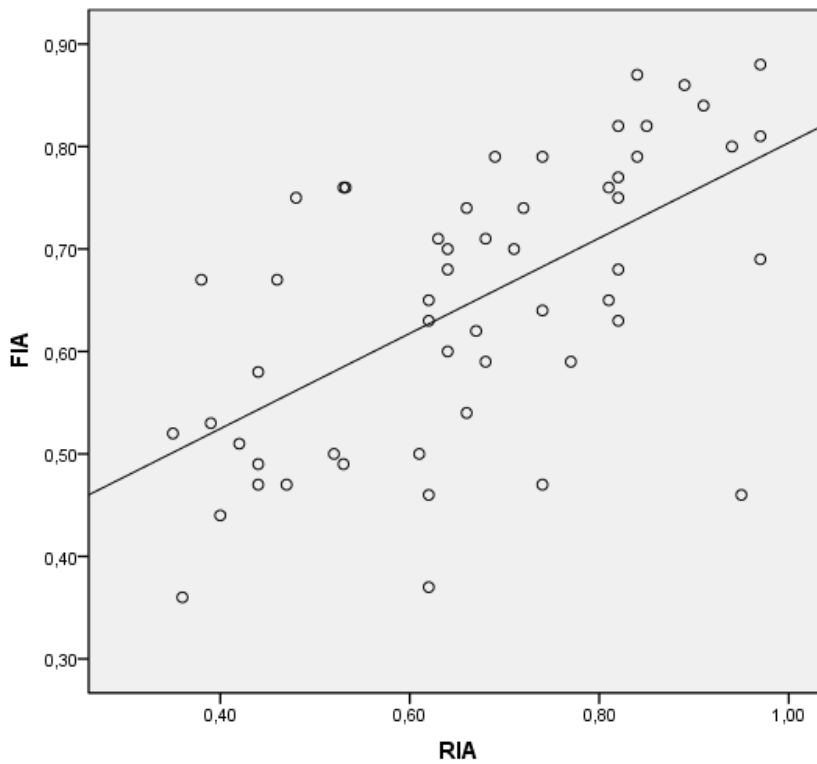
Moč povezave med metodama smo določili s Spearmanovim koeficientom. Ob upoštevanju 759 rezultatov znaša koeficient 0,41, kar pomeni, da je povezanost slabša, vendar je še vedno statistično značilna ($p < 0,01$). Območje merilne negotovosti (rdeče in modro območje na Grafu 6) je pri FIA med 0,21-0,49, pri RIA med 0,23-0,47. Ob upoštevanju negativnih rezultatov (679) pri obeh metodah je Spearmanov koeficient 0,17, vendar je povezava še vedno statistično značilna ($p < 0,01$). Razsevni diagram (Graf 7) nam prikazuje razpršenost rezultatov samo negativnih meritev. Ob upoštevanju pozitivnih rezultatov pri obeh metodah je Spearmanov koeficient 0,63, povezava je statistično značilna ($p < 0,01$). Razsevni diagram (Graf 8) nam prikazuje razpršenost samo pozitivnih rezultatov meritev.



Graf 6 - Razsevni diagram za parno izmerjene rezultate z radioimunsko (RIA) in fluoroinmnsko (FIA) metodo



Graf 7 - Razsevni diagram za parno izmerjene negativne rezultate z radioimunsko (RIA) in fluoroimunsko (FIA) metodo



Graf 8 - Razsevni diagram za parno izmerjene pozitivne rezultate z radioimunsko (RIA) in fluoroimunsko (FIA) metodo

4.3.2 PRIMERJAVA VREDNOSTI IZMERJENIH REZULTATOV Z METODO RIA IN FIA

Z neparametričnim Wilcoxonovim testom predznačenih rangov smo ugotavljali, ali prihaja do razlik med posameznimi vzorci oziroma ali dajeta metodi enake rezultate. Za statistično analizo smo obdelali 759 vzorcev. Postavili smo si hipotezi:

H_0 : metodi dajeta primerljive rezultate, razlika je enaka nič

H_a : metodi dajeta različne rezultate, razlika ni enaka nič

74 vzorcev je imelo nižje rezultate s FIA. 611 vzorcev je imelo višje rezultate s FIA. 74 vzorcev je imelo enak rezultat z obema metodama (Preglednica VIII). Izračunali smo vrednosti Z ($Z=-19,263$) in p (Preglednica X). p je manjši od stopnje tveganja ($p<0,01$), zato privzamemo H_a , metodi dajeta različne rezultate.

Preglednica VIII - Wilcoxonov test predznačenih rangov za vse vzorce

	Rangi	n	Srednji rang	Vsota rangov
FIA-RIA	Negativna razlika	74	238,91	17679
	Pozitivna razlika	611	355,61	217276
	Ni razlike	74	/	/

Primerjali smo tudi pozitivne vzorce pri obeh metodah. 29 vzorcev je imelo nižje rezultate s FIA. 23 vzorcev je imelo višje rezultate s FIA. 3 vzorci so imeli enak rezultat z obema metodama (Preglednica IX). Izračunali smo Z vrednost ($Z=-1,175$) in $p=0,24$ ($p>0,01$) (Preglednica X). p je večji od stopnje tveganja, zato privzamemo H_0 , metodi dajeta ob upoštevanju samo pozitivnih rezultatov primerljive rezultate.

Preglednica IX - Wilcoxonov test predznačenih rangov za pozitivne vzorce

	Rangi	n	Srednji rang	Vsota rangov
FIA-RIA	Negativna razlika	29	28,21	818
	Pozitivna razlika	23	24,35	560
	Ni razlike	3	/	/

Preglednica X - Z statistika

	vsi vzorci	pozitivni vzorci
Z statistika	-19,26 ^a	-1,17 ^b
p	0,00	0,24

^atemelji na negativni vsoti rangov

^btemelji na pozitivni vsoti rangov

5 RAZPRAVA

Avtoprotitelesa proti dsDNA so eden od diagnostičnih kriterijev za SLE (1,8). Za določanje obstaja več metod, ki se razlikujejo v tehniki izvedbe in detekcijskem sistemu (4,6,7). V Laboratoriju za imunologijo revmatizma določamo avtoprotitelesa proti dsDNA z radioimunsko metodo FARR-RIA, ki velja za zlati standard (37). Pri tej metodi se za detekcijo protiteles proti dsDNA uporablja kupljena DNA iz E.coli, na timinu označena z radioaktivnim izotopom ^{14}C . V laboratoriju smo se odločili, da v izvedbenem postopku zamenjamo radioaktivni izotop ^{14}C -DNA in organska topila, ki so škodljiva za zdravje in okolje z detekcijskim sistemom, kjer se uporablja fluorescentni označevalec.

Namen dela je bil ugotoviti, ali uporaba fluorescentnega označevalca namesto izotopa ^{14}C na DNA vpliva na lastnosti metode in posledično na klinično uporabnost rezultatov anti-dsDNA protiteles. V kolikor tega vpliva ni, bi lahko opustili uporabo radioaktivnega izotopa in organskih topil. Princip metode ostaja nespremenjen, drugačen je le izvor antigena in detekcijski sistem. ^{14}C -DNA iz E. Coli smo zamenjali z dsDNA, izolirano iz človeške krvi. Za detekcijo dsDNA smo uporabili Qubit dsDNA HS ASSAY KIT, ki vsebuje fluorescentno barvilo PicoGreen. PicoGreen je interkalator. Po interkalaciji v dsDNA se fluorescenca dvigne za več 1000 krat, kar je primerno tudi za določanje mikrogramskih koncentracij dsDNA. Za razliko od ostalih fluorescenčnih barvil PicoGreen interkalira v dsDNA s tremi skupinami. Kinolinska skupina interkalira v dsDNA in van der Waalsove interakcije stabilizirajo kompleks. Benzotiazolna skupina PicoGreena je odgovorna za elektrostatske interakcije z negativno nabito fosfatno skupino v dsDNA. Dimetilaminopropilna veriga pa se vrine v manjši žleb dsDNA. PicoGreen ekscitira pri valovni dolžini 485 nm, oddaja pa fluorescenco pri 520 nm. To barvilo ima sposobnost, da interkalira ne samo v visoko polimerno dsDNA, ampak tudi v duplekse, krajše od 20 baznih parov (38).

Čeprav ne gre za zamenjavo metode v celoti, ampak samo za spremembo detekcijskega sistema, ima slednje lahko velik vpliv na lastnosti rezultatov metode in njihovo klinično uporabnost. Zato smo v študiji postopali, kot da gre za uvedbo nove metode. Vsako novo analizno metodo moramo ovrednotiti, ne glede na to ali smo jo razvili sami ali jo uvajamo po navodilih druge institucije. Z vrednotenjem metode prikažemo, da je metoda ustrezna za analizo določenega analita v danem vzorcu in daje zanesljive in verodostojne analizne rezultate (29). Pri tem se praviloma uporablja zunanje kontrolne materiale s sledljivostjo do primarnega ali do referenčnega standarda (odvisno od analita). Prvi in edini mednarodni standardni material za protitelesa proti dsDNA je bil WHO standard Wo/80, na katerega je umerjenih večina analiznih kompletov (39). Žal ni več dostopen, zato ga nismo mogli uporabiti pri validaciji FIA, kar je zahtevalo nekatere dodatne postopke.

5.1 PRIMERJALNO VREDNOTENJE METOD FIA IN RIA

Lastnosti metode vrednotimo z analizno natančnostjo, z analizno točnostjo, z analizno občutljivostjo in specifičnostjo, z linearnostjo in mejo določljivosti (33,34). Znotrajanalizna natančnost nam pove, koliko rezultati meritev znotraj skupine meritev med

seboj nihajo. Določili smo jo s ponovljivostjo v seriji pri visoko pozitivnem, srednje pozitivnem in negativnem rezultatu in jo podali s KV. Ponovljivost pri visoko pozitivnem rezultatu je pri obeh metodah 2-3%, kar je odlično. Ponovljivost pri mejno pozitivnem rezultatu je sicer slabša, vendar pri obeh metodah približno enaka, saj je povprečni KV pri FIA 28%, pri RIA 33% (Preglednica I). Pri negativnem rezultatu je ponovljivost pri obeh metodah slabša, saj so KV pri obeh metodah visoki: še vedno pa so bili vsi dobljeni rezultati v negativnem območju. Razlog za tako veliko razliko KV pri negativnem rezultatu med obema izvedbama je verjetno razlika v analizni občutljivosti. S FIA zaznavamo višje vrednosti in so zato rezultati številčno višji, medtem ko so rezultati z RIA nižji in torej bližje ničli. To pa bistveno vpliva na izračun KV, pri čemer dajo majhne razlike vsebinsko nesorazmerno velika odstopanja. V literaturi zasledimo samo podatke za KV pri ELISA (do 18%) (40), medtem ko za CLIF nismo našli nobenega podatka.

Določili smo tudi medanalizno ponovljivost pri visoko, mejno pozitivni in negativni kontroli. Medanalizna ponovljivost pri visoko pozitivni kontroli je pri obeh metodah enaka in dobra ($KV_{RIA}=11\%$, $KV_{FIA} = 12\%$). Pri mejno pozitivni kontroli je ponovljivost slabša vendar pri obeh skoraj enaka ($KV_{RIA} = 29\%$, $KV_{FIA} = 18\%$) (Preglednica II). Pri negativni kontroli je KV pričakovano višji pri obeh metodah. Na medanalizno ponovljivost vpliva tudi zamrzovanje in odmrzovanje kontrolnih materialov. Kontrole so namreč alikvotirane za 5 kratno uporabo v plastičnih epruvetah. Pri rutinskem postopku smo ugotovili, da zamrzovanje vpliva na vzorec in posredno tudi na rezultat. Objavljenih je veliko študij predvsem na monoklonalnih protitelesih, pri katerih so dokazali različne vplive na protitelesa (41). Za protitelesa so ugotovili, da so bolj stabilna od ostalih proteinov, so pa najbolj občutljiva na zamrzovanje in visoko temperaturo. Pri zamrzovanju lahko pride do agregacije protiteles. Možen vzrok je lahko tudi adsorpcija protiteles na plastiko (41). Čeprav je natančnost v negativnem delu zelo slaba, to območje ni diagnostično pomembno, zato teh rezultatov nismo upoštevali pri odločitvi o sprejemljivosti metode.

S kontrolo točnosti odkrivamo sistematične napake. To so tiste, ki nastanejo zaradi nepravilnega postopka same analize ali pa v tehnični izvedbi samega postopka. Pri tem so vrednosti rezultatov usmerjene v eno smer, rezultati so ali previsoki ali prenizki. Točnost metode oziroma ujemanje rezultatov lahko določamo s testom ponovne pridobitve (Recovery test), pri katerem dodamo znano količino analita v vzorec in določimo količino analita v vzorcu (34). Dobljeno vrednost primerjamo s teoretično in izračunamo delež izkoristka. WHO standard W0/80, ki ima znano količino protiteles, ni več dobavljiv, zato tega testa nismo mogli izvesti. Lahko bi sicer zmešali dva vzorca z izmerjeno vrednostjo in izračunali izkoristek, vendar tega ne moremo, ker nimamo znanih količin protiteles. Merjenje anti-dsDNA protiteles namreč ne poteka po postopku meritev količine protiteles, temveč meritev razmerja med vezanim in nevezanim antigenom in dobimo samo relativno vrednost, ne pa absolutno (znana količina). Točnost metode smo zato določili s primerjavo izmerjene vrednosti s pričakovano vrednostjo internega standarda. Analizirali smo vzorce, ki so bili poslani na testiranje v laboratorij. Posamezen vzorec smo analizirali desetkrat v treh serijah in izračunali relativno napako glede na pravo vrednost in izračunali povprečno vrednost relativne napake. Pri visoko pozitivnem vzorcu je pri FIA točnost 89%, pri RIA 96%. Pri mejno pozitivnem vzorcu smo dobili nižjo točnost, vendar sta sprejemljivi. Pri FIA je 58% pri RIA pa 79% (Preglednica III). Meritev v negativnem vzorcu zaradi diagnostične nepomembnosti nismo upoštevali.

Tudi pri meritvi analizne občutljivosti (predvsem meje zaznavanja) smo se srečali s problemom neobstoja zunanega kontrolnega materiala z znano količino protiteles, zato smo se naloge lotili z redčenjem visoko pozitivnega vzorca. Z metodo RIA je signal izginil pri redčitvi 1:16, z metodo FIA pa je bil signal prisoten še pri zadnji redčitvi, to je 1:32 (Graf 2). Glede na visoko analizno specifičnost interkalacije PicoGreena, kaže rezultat merjenja na višjo analizno občutljivost metode FIA. Tudi sicer sodi FIA med visoko občutljive metode, saj je 1000 krat bolj občutljiva od ostalih spektrofotometričnih metod (42). Po drugi strani pa bi bil rezultat lahko tudi posledica nižje analizne specifičnosti v primerjavi z RIA. Fluorescenčni signal bi lahko bil posledica drugih snovi v biološkem vzorcu, ki fluorescirajo. Sestavine vzorca, ki vsebujejo aromatske obročje, disulfidne vezi lahko posnemajo ali spreminjajo spektralne lastnosti analita. To so nekateri proteini (AK z aromatskim obročem), bilirubin, ki največkrat doprinesejo k ozadju (43). Večina organskih molekul absorbira in fluorescira med 200-550 nm (44) v območju PicoGreena (485-520 nm). Razlog bi lahko bil tudi prisotnosti zunaj celičnih nukleinskih kislin. Pri bolnikih s SLE so odkrili, da je koncentracija zNK lahko zelo zvišana (45). zNK so nukleinske kisline, ki se nahajajo v serumu in imajo lastnosti celičnih nukleinskih kislin, le da so fragmentirane (0,5 do 21 kb) (46). Pri FIA se barvilo veže na dsDNA in to bi bilo lahko posledica signala, ki ga imamo do zadnjega titra. Teh razlik med metodama in morebitnih razlogov zanje nismo podrobneje analizirali, saj se pojavljajo v območju klinično nepomembnih rezultatov.

Analizna specifičnost je sposobnost metode, da loči analit od ostalih komponent, ki so prisotne v vzorcu. Pri obeh metodah je osnova specifična reakcija med antigenom (dsDNA) in protitelesom (anti-dsDNA). Nastali imunski kompleks se pri obeh metodah z amonijevim sulfatom enako obori, način detekcije je pa drugačen. Pri RIA je antigen v imunskem kompleksu radioaktivno označen. Pri FIA nam analizno specifičnost za barvilo PicoGreen zagotavlja proizvajalec. Fluorescentno barvilo se sicer veže na ssDNA in RNA, kar bi lahko bil vzrok za lažno pozitiven rezultat. Proizvajalec zagotavlja, da z uporabo PicoGreena ssDNA in RNA, ki bi lahko bili moteči snovi, v ekvimolarni koncentraciji z dsDNA minimalno vplivata na določitev dsDNA (36). RNA se tudi zelo hitro razgradijo. Eksogeno dodana RNA se razgradi z RNA nukleazami v nekaj sekundah. RNA je lahko prisotna v samem serumu in se razgradi v 24 urah pri 4°C (47). To pa pomeni, da ekvimolarnih koncentracij RNA ni v sistemu z dodano dsDNA, zato so ti vplivi še bistveno nižji in torej zanemarljivi za klinično uporabnost rezultatov.

5.2 PRIMERJAVA REZULTATOV METOD FIA IN RIA

Na tržišču obstaja več metod za določanje anti-dsDNA protiteles, ki se med seboj razlikujejo. Vendar pa še vedno ni nobene metode, ki bi nadomestila RIA, katera najbolj sledi titru anti-dsDNA protiteles predvsem pri bolnikih s SLE, ki imajo težave z ledvicami. Z razvojem nove metode smo se poskušali približati RIA. Po primerjavi značilnosti metod smo primerjali še lastnosti rezultatov.

Primerjali smo rezultate 759 vzorcev, analiziranih z obema metodama. Moč povezave smo ocenili s Spearmanovim koeficientom korelacije ranga, ki se uporablja za oceno stopnje povezanosti, če spremenljivki nista porazdeljeni normalno. Spearmanov koeficient je 0,41, kar kaže na nizko korelacijo med metodama, vendar je še vedno statistično značilna

($p < 0,01$). Odločili smo se, da preverimo, kakšna je korelacija oziroma moč povezave pri različnih kombinacijah rezultatov. Če smo upoštevali samo negativne rezultate (679 vzorcev) z obema metodama, je moč povezave med obema metodama 0,17, kar kaže na neznatno korelacijo, vendar je povezava med metodama še vedno statistično značilna ($p < 0,01$). Če smo upoštevali samo pozitivne rezultate (54 vzorcev) pri obeh metodah je bil Spearmanov koeficient najvišji 0,63 ($p < 0,01$) (Graf 8), kar je za področje bioloških pojavov močna povezanost. To je tudi območje, ki nas najbolj zanima. V praksi se za določitev anti-dsDNA protiteles uporablja prvostopenjska metoda CLIF, ki zazna visoko in srednje avidna anti-dsDNA protitelesa. Pozitivni vzorci se naprej potrjujejo z RIA, s katero se določa samo visoko avidna protitelesa.

Vrednosti meritev anti-dsDNA smo statistično obdelali z Wilcoxonovim testom predznačenih rangov. To je parni neparametrični test, ki se uporablja za primerjavo rezultatov v primeru, ko imamo odvisen vzorec in nenormalno porazdelitev. Ob primerjavi vseh 759 vzorcev smo ugotovili, da med metodama obstajajo statistično značilne razlike ($p < 0,01$). Če smo primerjali samo pozitivne rezultate pri obeh metodah, pa metodi dajeta primerljive rezultate ($p > 0,01$). To je tudi območje, ki nas najbolj zanima. V tem primeru bi metoda FIA lahko nadomestila metodo RIA.

5.3 KLINIČNA UPORABNOST

V klinični praksi se v UKC KOR uporablja v diagnostičnih postopkih prazna vrednost anti-dsDNA protiteles 0,35, ki je bila pridobljena glede na klinične izkušnje in želje po 100% diagnostični specifičnosti. S testiranjem 146 krvodajalcev smo določili prazno vrednost pri krvodajalcih. S Kolmogorov-Smirnovim testom, koeficientoma sploščenosti in asimetrije krivulje smo ugotovili, da se rezultati, dobljeni z RIA metodo, ne porazdeljujejo normalno. Distribucija rezultatov za avtoprotitelesa je običajno nenormalna, zato se za postavitev praznih vrednosti uporabljajo percentile, običajno med 95 in 99 (28). Za anti dsDNA protitelesa se priporoča 99 percentila (28). Izračunana prazna vrednost pri RIA je 0,11, kar je bistveno nižje od uporabljene prazne vrednosti. Pri FIA smo ugotovili, da se rezultati krvodajalcev porazdeljujejo normalno. Za enoten pristop pri obeh metodah smo tudi tukaj določili prazno vrednost 99 percentilo (0,29). Pri FIA imamo višje vrednosti rezultatov pri krvodajalcih, kar nam pokaže tudi povprečna vrednost meritev. Do razlike verjetno prihaja zaradi drugega detekcijskega sistema, kot smo že pojasnili pri analizi občutljivosti.

Za določitev diagnostične občutljivosti in diagnostične specifičnosti smo testirali skupino bolnikov s SLE in 3 skupine bolnikov s tremi različnimi avtoimunskimi boleznimi (APS, SJS, RA), ter krvodajalce. Idealno bi bilo imeti diagnostično občutljivost in diagnostično specifičnost pri izbrani prazni vrednosti 100%. Takrat sta bolna in zdrava populacija popolnoma ločeni. Pri primerjavi naših rezultatov ne moremo dobiti 100% diagnostične občutljivosti, ker so v skupini prisotni tudi bolniki s SLE, ki nimajo zagona bolezni in takrat imajo lahko tudi negativen rezultat prisotnosti anti-dsDNA. Zato se posledično zniža diagnostična občutljivost. Vendar pa mora biti metoda dovolj analizo občutljiva, da lahko zazna porast protiteles tudi že pred vnovičnim zagonom bolezni. Rezultati obeh metod imajo primerljivo diagnostično občutljivost. Diagnostična občutljivost rezultatov RIA in prazni vrednosti 0,35 je 50%, rezultatov FIA pa 53%. Z metodo FIA smo tako dobili dva dodatna pozitivna rezultata oziroma bolnika s SLE. Diagnostična specifičnost rezultatov

obeh metod je 100%, kar pomeni, da ne dobimo nobenega lažno pozitivnega rezultata. Če bi upoštevali izračunani prazni vrednosti, ki sta bili pri obeh metodah nižji od uporabljene v rutinskem postopku določanja anti-dsDNA, bi se zmanjšala diagnostična specifičnost in zvišala diagnostična občutljivost. Diagnostična občutljivost rezultatov bi bila pri RIA 71%, kar pomeni, da bi dobili 7 lažno pozitivnih rezultatov. Pri FIA bi bila izračunana prazna vrednost 0,29 in diagnostična občutljivost rezultatov 61%, dobili bi tri lažno pozitivne rezultate. Diagnostična specifičnost rezultatov RIA ob izračunani prazni vrednosti je 97%, pri FIA 99% (Preglednica VI). Čeprav bi bilo pravilno uporabiti izračunane prazne vrednosti, se v tem primeru pokaže, da je boljše, če privzamemo prazno vrednost iz rutinskega postopka, da dosežemo 100% diagnostično specifičnost.

Diagnostično specifičnost in diagnostično občutljivost lahko ovrednotimo z ROC krivuljo (Graf 5), ki nam pokaže razmerje občutljivost v odvisnosti z 1-specifičnost. Popoln test bi imel površino pod krivuljo 1. Površina pod krivuljo za RIA je večja kot pri FIA, kar pomeni da imajo rezultati RIA večjo diagnostično uporabnost.

Nova metoda FIA ima podobne lastnosti kot RIA. Obe metodi imata podobno analizno natančnost in točnost, le v analizni občutljivosti v nizkem območju se razlikujeta. To območje ni diagnostično pomembno, zato bi lahko FIA nadomestila RIA. Metodi imata sicer slabo korelacijo, če upoštevamo vse rezultate; vendar pa v pozitivnem območju, ki nas najbolj zanima, ne prihaja do razlik. V klinični praksi se najprej uporablja prvostopenjska metoda CLIF in tukaj naredimo selekcijo med negativnimi in pozitivnimi rezultati. Z novo metodo se izognemo tudi uporabi radioaktivnega materiala, organskih topil in drugih izjemno toksičnih kemikalij, ki so škodljiva za okolje in ljudi. Danes je pomembno tudi, kako hitro pridemo do rezultata. Zato prihaja do razvoja novih metod, s katerimi želimo pridobiti čim bolj analizno natančen in točen rezultat, ki pa mora biti na voljo hitro in tudi klinično uporaben. Ugotovili smo, da FIA z uporabo fluorescenčnega barvila PicoGreen lahko nadomesti RIA za določanje avtoprotiteles proti dsDNA v diagnostiki in spremljanju SLE.

6 SKLEP

Na osnovi rezultatov smo prišli do naslednji sklepov:

1. FIA je bolj praktična kot RIA, saj se izognemo uporabi radioaktivnega izotopa, organskih topil in drugih toksičnih kemikalij ter hitreje pridobimo rezultat.
2. Medanalizna in znotrajanalizna natančnost je pri obeh metodah podobna, metodi sta primerljivo natančni.
3. Analizna točnost je pri obeh metodah podobna, metodi sta primerljivo točni.
4. Metodi se med seboj razlikujeta v analizni občutljivosti, vendar je to v diagnostično nepomembnem območju.
5. Analizna specifičnost: ssDNA in RNA ne motita določanja dsDNA pri FIA, vendar smo opazili nekoliko višje rezultate pri krvodajalcih, kar je lahko posledica matriksa vzorca, vendar je to v diagnostično nepomembnem območju.
6. Če upoštevamo samo pozitivne rezultate, metodi močno korelirata.
7. Če upoštevamo samo pozitivne rezultate, dajeta metodi primerljive rezultate.
8. Če obdržimo prazno vrednost 0,35, imamo zagotovljeno 100% diagnostično specifičnost in primerljivo diagnostično občutljivost rezultatov anti-dsDNA protiteles pri FIA.
9. Rezultati potrjujejo, da nova metoda FIA za določitev anti-dsDNA protiteles lahko nadomesti RIA, njeni rezultati pa se lahko enakovredno uporabljajo kot pomoč pri diagnostiki SLE.

7 LITERATURA

1. Tomšič M, Praprotnik S. Revmatske bolezni. V: Košnik M, Mrevlje F, Štajer D, Koželj M, Černelč P. Interna medicina. Založba Littera Picta d.o.o., 2011, 13:1395-1527
2. Tsokos GC. Mechanisms of disease: Systemic Lupus Erythematosus. The New England Journal of Medicine 2011; 365:2110-21
3. Straub RH. The Complex Role of Estrogens in Inflammation. Endocrine Reviews 2007; 28(5):521-574
4. Swaak AJG, Smeenk RJT. Clinical aspects of antibodies to double-stranded DNA. In: Maini RN, van Venrooij WJ (eds). Manual of Biological Markers of Disease, Dodrecht, Kluwer Academic Publishers, 1993; AMAN C2.1: 1-17
5. <http://dualibra.com/wp-content/uploads/2012/04/037800~1/Part%2014.%20Disorders%20of%20the%20Immune%20System,%20Connective%20Tissue,%20and%20Joints/Section%202.%20Disorders%20of%20Immune-Mediated%20Injury/313.htm>; 25.2.2012
6. Žigon P, Lakota K, Čučnik S, Švec T, Ambrožič A, Sodin-Šemrl S, Kveder T. Comparison and evaluation of different methodologies and tests for detection of anti-dsDNA antibodies on 889 Slovenian patient's and blood donor's sera. CMJ 2011; 52:692-704
7. Hamann D, Smeenk RJT. dsDNA autoantibodies In: Shoenfeld Y, Gershwin ME, Meroni P. Autoantibodies, Elsevier 2007; 159-167
8. Bertolaccini ML, Hughes GRV, Khamashta MA. Systemic Lupus Erythematosus In: Shoenfeld Y. et al. Diagnostic Criteria in Autoimmune Diseases. Humana Press, 2008; 3-7
9. <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/imagepages/17134.htm>; 25.2.2012
10. Schiffer LE, Hussain N, Wang X, Huang W, Sinha J, Ramanujam M, Davidosn A. Lowering anti-dsDNA antibodies-whats new? Lupus 2002; 11:885-894
11. Hahn B, Tsao B. Antibodies to DNA. In: Wallace D, Hahn B. Dubois Lupus Erythematosus, 6th ed, Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, PA 2002; 424-445
12. <http://www.printo.it/pediatric-rheumatology/information/Slovenia/15.htm>; 26.2.2012
13. Vasoo S. Drugs and hormones: Drug-induced lupus: an update. Lupus 2006; 15:757-761
14. Eilat D. Anti-DNA antibodies: problems in their study and interpretation. Clinical & Experimental Immunology 1986; 65:215-222
15. Aarden LA, Lakmaker F, Feltkamp TEW. Immunology of DNA II. The effect of size and structure of the antigen on the Farr assay. Journal of Immunological Methods 1976, 10:39-48
16. Egner W. The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE. Journal of Clinical Patology 2000; 53:424-432
17. Bloch D. Antibodies to DNA, Sm and RNP. Dosegljivo na: <http://www.uptodate.com/contents/antibodies-to-dna-sm-and-rnp>, 24.3.2012
18. von Muhlen CA, Tan EM. Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. Seminars in arthritis and rheumatism 1995; 24(5): 323-358

19. Aarden LA, Lakmaker F, Feltkamp TEW. Immunology of DNA I. The influence of the reaction conditions of the Farr assay as used for the detection of anti-dsDNA. *Journal of Immunological Methods* 1976; 10:27-37
20. Vozelj M. Merjenje in uporaba protiteles. V: *Temelji imunologije*. DZS d.d., Ljubljana, 2000; 91-120
21. Immunoconcepts. Fluorescent nDNA Test System Cat:3000-I, 4.11.02.003.093-En-Rev 2.0 © Copyright 2011. Tehnična dokumentacija. Dosegljivo na: <http://www.immunoconcepts.com/inserts/DNA%20FA%20En.pdf> ; 22.12.2011
22. Smeenk R. Measurement of antibodies to DNA. In: Maini RN, van Venrooij WJ (eds). *Manual of Biological Markers of Disease*, Dodrecht, Kluwer Academic Publishers, 1993; AMAN A8: 1-12
23. <http://www.eco4life.info/biomedro-231.html>; 25.2.2012
24. Antico A, Platzgummer S, Bassetti D, et al. Diagnosing systemic lupus erythematosus for measurement of anti-dsDNA antibodies are an effective alternative to the Farr technique and the *Chrithidia luciliae* immunofluorescence test. *Lupus* 2010; 19:906-912
25. Pavlovic M, Kats A, Cavallo M, Chen R, Hartman JX, Shoenfeld Y. Pathogenic and Epiphenomenal Anti-DNA Antibodies in SLE. *Autoimmune Diseases* 2010; 2011:462841
26. Ghirardello A, Villalta D, Morozzi G, et al. Evaluation of Current Methods for the Measurement of Serum Anti-Double-Stranded DNA Antibodies. *Annals of the New York Academy of Science* 2007, 1109:401-406
27. Smeenk R, van der Lelij G. Avidity of antibodies to dsDNA on *Chrithidia luciliae*, Farr Assay and PEG Assay. *Journal of Immunology* 1982; 128:73-78
28. Teodorescu M. Clinical value of anti-ssDNA (denatured DNA) autoantibody test: beauty is in the eyes of the beholder. *Clinical and Applied Immunology Reviews* 2 2002; 115-128
29. Pravilnik o in vitro diagnostičnih postopkih, Uradni list Republike Slovenije, 2002; 47:4766-4799
30. Pravilnik o in vitro diagnostičnih postopkih, Uradni list Republike Slovenije, 2002; 47:4766-4799
31. Drolc A, Cotman M, Roš M. Uvajanje sistema kakovosti v poskusne laboratorije na področju varstva okolja. Dosegljivo na: http://www.sdzv-drustvo.si/si/VD-05_Referati/DROLC.pdf ; 23.3.2012
32. McPherson RA. Laboratory Statistics. In: McPherson RA, Pincus MR. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods* 21st ed. W.B. Saunders Company 2006; p. 91-96
33. ICH Harmonised tripartite guideline. Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2 (R1). Dosegljivo na: http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002662.pdf ; 23.3.2012
34. John R, Lifshitz MS, Jhang J, Fink D. Post-analysis: Medical Decision-Making In: McPherson RA, Pincus MR. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods* 21st ed., W.B. Saunders Company 2006; p. 68-75
35. Analizni komplet QIAmp DNA mini kit. Dosegljivo na: <http://www.qiagen.com/products/genomicdnastabilizationpurification/qiaampsystem/qiaampdnaminikit.aspx#Tabs=t2>, 10.6.2012
36. Analizni komplet Qub-iT dsDNA HS ASSAY KIT. Dosegljivo na: <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp32851>, 10.6.2012

37. Slater NGP, Cameron JS, Lessof MH. The *Chrithidia luciliae* kinetoplast immunofluorescence test in systemic lupus erythematosus. *Clinical and Experimental Immunology* 1976; 25:480-486
38. Dragan AI, Casas-Finet JR, Bishop ES, Strouse RJ, Schenerman MA, Geddes CD. Characterization of PicoGreen Interaction with dsDNA and the Origin of its Fluorescence Enhancement upon binding. *Biophysical Journal* 2010; 99:3010-3019
39. Feltkamp TEW, Kirkwood TBL, Maini RN, Aarden LA. The first international standard for antibodies to double stranded DNA. *Annals of the Rheumatic Diseases* 1988, 47:740-746
40. Suh-Lailam BB, Chiaro TR, Davis WK, Wilson AR, Tebo AE. Evaluation of high avidity anti-dsDNA IgG enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Int J Clin Exp Pathol* 2011; 4(8):748-754
41. Wang W, Singh S, Zeng DL, King K, Nema S. Minireview Antibody Structure, Instability, and Formulation. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2007, 96:1-26
42. Drees JC, Wu AHB. Analytical Techniques. Dosegljivo na: http://downloads.lww.com/wolterskluwer_vitalstream_com/sample-content/9780781790451_Bishop/samples/14460_Ch05
43. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostic Section II Chapter 3:75-84
44. Wehry EL. Molecular Fluorescence and Phosphorescence Spectrometry. In: Settle F. Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry, 26: 507-539 Dosegljivo na: <http://www.prenhall.com/settle/chapters/ch26.pdf>, 25.6.2012
45. Bartoloni E, Ludovimi V, Alunno A, Pistola L, Bistoni O, Crino L, Gerli R. Increased levels of Circulating DNA in patients with systemic autoimmune diseases: A possible marker of disease activity in Sjogren syndrome. *Lupus* 2011, 20:928-935
46. Černe D. Sodobna uporaba analize zunajceličnih nukleinskih kislin v laboratorijski medicini. *Farmacevtski vestnik* 2010; 61:144-148
47. Tsui NBY, Ng EKO, Lo YMD. Stability of Endogenous and Added RNA in Blood Specimens, Serum and Plasma. *Clinical Chemistry* 2002; 48(10):1647-1653

8 PRILOGE

8.1 PRILOGA 1



KOMISIJA REPUBLIKE SLOVENIJE ZA MEDICINSKO ETIKO

Prof. dr. Blaž Rozman, dr. med., in
dr. Aleš Ambrožič, dr. med.
KO za revmatologijo, Bolnica dr. Petra Držaja
Univerzitetni klinični center Ljubljana,
Vodnikova 62, 1525 Ljubljana

Štev.: 163/02/09
Datum dopisa: 11. 4. 2009

Spoštovana gospoda prof. dr. Rozman in dr. Ambrožič,

Komisiji za medicinsko etiko (KME) sta 3. 2. 2009 poslala v oceno načrt raziskave z naslovom:

“Sistemske avtoimunske bolezni.” Sklop bazičnih in kliničnih raziskav (šifra ARRS: P3-0314).

KME je ocenila, da so raziskave etično sprejemljive, in Vama izdaja svoje soglasje.

S spoštovanjem in lepimi pozdravi,

prof. dr. Jože Trontelj,
predsednik KME

OBVESTILO.: KME je morala preseliti svojo spletno stran. Do registracije lastne domene <http://kme-nmec/>, ki jo pričakujemo v kratkem, je spletna stran KME na naslovu <http://kme-nmec.sazu.si/>.

Naslov: Prof. dr. Jože Trontelj, Inštitut za klinično nevrofiziologijo, Klinični center Ljubljana
Zaloška 7, 1525 Ljubljana. Telefon 01/ 522 1500, telefaks 01/ 522 1533, naslov za elektronsko pošto: joze.trontelj@kclj.si

8.2 PRILOGA 2

klinični center ljubljana

SPS Interna klinika

Klinični oddelek za revmatologijo



Vodnikova 62
1000 Ljubljana
T 01 52254 86, 522 54 33
F 01 519 53 38

Priimek:

Ime:

Rojen/a:

Naslov:

PISNO SOGLASJE BOLNICE, BOLNIKA

SPOŠTOVANA BOLNICA, BOLNIK:

1. V ambulantnem delu, Kliničnega oddelka za revmatologijo, Kliničnega centra Ljubljana, ste poiskali pomoč zaradi vaših zdravstvenih težav.

O postopkih diagnostike in zdravljenja vas bomo sproti seznanjali. Pri vsakem predlaganem postopku imate pravico do dodatnih informacij in odločitve o tem ali se z njim strinjate ali ne. Prosimo pa, da načelno privolite v osnovne postopke, ki so potrebni pri diagnostiki in zdravljenju.

Strinjam se z osnovnimi diagnostičnimi in terapevtskimi postopki, ki so namenjeni mojemu zdravljenju (pogovor o zdravstvenih težavah, telesni pregled, jemanje krvi, rentgenske, ultrazvočne preiskave in punkcija sklepa):

DA

NE

2. Poleg tega vas prosimo tudi za strinjanje, da podatke in vzorce, ki smo jih ali jih bomo pridobili ob vašem zdravljenju (npr. odvzeto kri, punktate, bioptate), smemo uporabiti v analizah, ki bi lahko izboljšale diagnostiko in zdravljenje v prihodnosti. Pri teh analizah vaša identiteta ne bo razkrita.

Strinjam se, da se podatki in vzorci, ki so pridobljeni ob mojem zdravljenju, smejo uporabiti v analizah, ki bi lahko izboljšale zdravljenje v prihodnosti.

DA

NE

Datum:

Podpis bolnice/bolnika (starša, skrbnika)

Izjavo lahko kadarkoli popravite (dopolnite, prekličete) tako, da zahtevate nov obrazec. Do trenutka spremembe velja vaša prvotna odločitev.