

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAŠA MERJAK

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAŠA MERJAK

**DOLOČANJE OD FOSFATIDILSERINA ODVISNIH PROTITELES PROTI
PROTROMBINU RAZREDA A Z ENCIMSKO IMUNSKO METODO NA TRDNEM
NOSILCU**

**DETECTION OF CLASS A ANTIPHOSPHATIDYLSERINE/PROTHROMBIN
ANTIBODIES WITH ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT METHOD ON
SOLID SUPPORT**

Ljubljana, 2015

Magistrsko nalogo sem opravljala v Laboratoriju za imunologijo revmatizma, KO za revmatologijo, UKC Ljubljana pod mentorstvom doc. dr. Saše Čučnik in somentorstvom dr. Polone Žigon.

Zahvala

Prisrčna hvala moji mentorici doc. dr. Saši Čučnik in somentorici dr. Poloni Žigon za strokovno pomoč in vodenje v času pisanja diplomske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Saše Čučnik in somentorstvom dr. Polone Žigon.

VSEBINA

POVZETEK	2
ABSTRACT	4
1. UVOD	6
1.1 <i>IMUNOGLOBULINI</i>	6
1.2 <i>EPITOPSKA SPECIFIČNOST</i>	7
1.3 <i>AVTOIMUNOST IN AVTOPROTITELESA</i>	7
1.4 <i>ANTIFOSFOLIPIDNI SINDROM (APS)</i>	8
1.4.1 <i>EPIDEMIOLOGIJA APS</i>	8
1.4.2 <i>KLINIČNE ZNAČILNOSTI ANTIFOSFOLIPIDNEGA SINDROMA</i>	9
1.5 <i>ANTIFOSFOLIPIDNA PROTITELESA</i>	11
1.6 <i>MOLEKULA PROTROMBINA</i>	12
1.7 <i>PROTITELESA PROTI PROTROMBINU IN AKTIVNOST LA</i>	13
1.7.1 <i>IMUNSKÉ ZNAČILNOSTI PROTITELES PROTI PROTROMBINU</i>	15
1.8 <i>LABORATORIJSKO DOLOČANJE PROTITELES PROTI PROTROMBINU</i>	15
1.8.1 <i>ENCIMSKO-IMUNSKÉ METODE NA TRDNEM NOSILCU</i>	16
1.9 <i>VREDNOTENJE METOD IN REZULTATOV</i>	18
2. NAMEN DELA	21
3. MATERIAL IN METODE	22
3.1 <i>VZORCI</i>	22
3.2 <i>INTERNI STANDARDI</i>	23
3.3 <i>ANTIGEN</i>	23
3.4 <i>MIKROTITRSKE PLOŠČICE</i>	23
3.5 <i>KEMIKALIJE</i>	23
3.6 <i>PUFRI IN RAZTOPINE</i>	24
3.7 <i>LABORATORIJSKA OPREMA IN PRIPOMOČKI</i>	25
3.8 <i>ENCIMSKO-IMUNSKA METODA NA TRDNEM NOSILCU ZA DOLOČANJE PROTITELES aPS/PT IgA</i>	26
3.9 <i>ENÁČBE ZA RAČUNANJE PARAMETROV ZA VREDNOTENJE METODE IN REZULTATOV</i>	27
3.10 <i>OBDELAVA PODATKOV</i>	27
4. REZULTATI	29
4.1 <i>VALIDACIJA METODE</i>	29
4.1.1 <i>OBDELAVA MERITEV PO VSAKI IZVEDENI ANALIZI</i>	29
4.1.2 <i>KONCENTRACIJA ANTIGENA</i>	30
4.1.3 <i>UMERITVENA KRIVULJA</i>	30
4.1.4 <i>ZNOTRAJANALIZNA NATANČNOST</i>	31
4.1.5 <i>MEDANALIZNA NATANČNOST</i>	32
4.1.6 <i>FREKVENČNA PORAZDELITEV IN PRAŽNE VREDNOSTI</i>	33
4.2 <i>DOLOČANJE PROTITELES aPS/PT IgA V RAZLIČNIH SKUPINAH BOLNIKOV</i>	35
4.3 <i>DIAGNOSTIČNO VREDNOTENJE REZULTATOV METODE IN χ^2-TEST</i>	36
4.3.1 <i>Diagnostična uporabnost meritev protiteles aPS/PT IgA za APS</i>	37
4.3.2 <i>Bolniki z AT</i>	37
4.3.3 <i>Bolniki z VT</i>	38
4.3.4 <i>Diagnostična uporabnost meritev protiteles aPS/PT IgA pri ženskah z zapleti v nosečnosti, ki so značilni za APS</i>	39
5. RAZPRAVA	40
6. SKLEP	48
7. LITERATURA	49

POVZETEK

Antifosfolipidna protitelesa so heterogena družina avtoproteles, katerih povišano koncentracijo v telesu povezujemo z žilnimi trombozami in zapleti v nosečnosti. Po merilih mednarodnih smernic za postavitev diagnoze antifosfolipidnega sindroma (APS) so laboratorijski označevalci te bolezni lupusni antikoagulant (LA), antikardiolipinska protitelesa (aCL) in protitelesa proti β_2 glikoproteinu I (anti- β_2 GPI). Protitelesa proti protrombinu še niso sprejeta med laboratorijske klasifikacijske kriterije za opredelitev APS, čeprav je dovolj dokazov, da so z boleznijo povezana in včasih tudi edina povišana med vsemi testiranimi antifosfolipidnimi protitelesi.

Namen našega dela je bil analitsko in klinično ovrednotiti hišno encimsko-immunsko metodo na trdnem nosilcu za določanje od fosfatidilserina odvisnih protiteles IgA proti protrombinu (aPS/PT). Testirali smo bolnike z diagnozo APS in drugimi avtoimunskimi boleznimi ter zdrave krvodajalce. Prav tako smo želeli ugotoviti, kakšna je pogostost aPS/PT IgA pri bolnikih z APS in pri bolnikih z drugimi avtoimunskimi boleznimi ter brez njih. Nadalje je bil naš namen ugotoviti povezanost aPS/PT IgA s posameznimi kliničnimi znaki APS. Meritve smo opravili na Kliničnem oddelku za revmatologijo UKC Ljubljana, v Laboratoriju za imunologijo revmatizma.

Pri postavitvi hišne metode za določanje aPS/PT IgA smo dosegli dobro znotraj analizno natančnost, ki je znašala 4,4 % (v enem primeru izračuna) in med 8,5 % in 11,7 % (v drugem primeru izračuna). Natančnost med analizami je bila med 7,3 % in 19,4 %. Za postavitev prazne vrednosti smo upoštevali arbitrarne enote za krvodajalce, izračunane iz absoranc na podlagi 99. percentila. Vrednosti višje od 5 arbitrarnih enot so predstavljale pozitiven rezultat.

Potrdili smo, da so pri bolnikih z APS statistično značilno pogosteje prisotna aPS/PT IgA v primerjavi s kontrolno skupino. Nadalje smo potrdili, da obstaja statistično značilna povezava med prisotnostjo venske tromboze in pozitivnimi vrednostmi aPS/PT IgA, ter med prisotnostjo arterijske tromboze in pozitivnimi vrednostmi aPS/PT IgA. Protitelesa aPS/PT IgA pa se statistično značilno ne razlikujejo pri ženskah s prisotnimi obstetričnimi komplikacijami in pri tistih brez njih.

Rezultati magistrske naloge kažejo, da so aPS/PT IgA visoko diagnostično specifična in bi lahko pripomogla v diagnostiki APS.

ABSTRACT

Antiphospholipid antibodies are a heterogeneous family of autoantibodies, whose increased concentration in the body is associated with vascular thrombosis and pregnancy complications. According to the international criteria for the diagnosis of antiphospholipid syndrome (APS) the laboratory markers of disease are LA, aCL and anti- β 2GPI. Antiprothrombin antibodies have not yet been included in the laboratory classification criteria for the definition of APS, although there is sufficient evidence that they are associated with disease and sometimes the only increased among all tested antiphospholipid antibodies.

We aimed to evaluate analytically and clinically in-house enzyme linked immunosorbent method on solid support for the determination of IgA phosphatidylserine/prothrombin antibodies (aPT/PS). We tested patients diagnosed with APS and other autoimmune diseases and healthy blood donors. We also wanted to determine the frequency of IgA aPT/PS in patients with APS and in patients with other autoimmune diseases as well as without them. Further we aimed to determine the association of aPT/PS with clinical manifestations of APS. The measurements were performed at the Clinical department of rheumatology in the Laboratory of immunology rheumatism.

At establishing in-house method we achieved good intra-assay accuracy which was 4,4 % in one case of calculation, and between 8,5 % and 11,7 % in the second case of calculation. The inter-assay accuracy was between 7,3 % and 19,4 %. For determination cut-off value we consider arbitrary units of blood donors calculated from the absorbances based on the 99th percentile. Values higher than 5 arbitrary units represent a positive result.

We confirmed that IgA aPS/PT are statistically significantly more often present in patients with APS compared to the control group. Furthermore we confirmed statistically significant correlation between the presence of VT and positive values of IgA aPS/PT, and the presence of AT and positive values of IgA aPS/PT. IgA aPS/PT are not statistically significantly different in women with obstetrical complications and in women without complications.

The results of the master thesis indicate high diagnostic specificity of IgA aPS/PT and could help in diagnostics of APS.

SEZNAM OKRAJŠAV

anti- β_2 GPI	protitelesa proti β_2 -glikoproteinu I
aCL	protitelesa proti kardiolipinu
APS	antifosfolipidni sindrom
aPS/PT	od fosfatidilserina odvisna protitelesa proti protrombinu
aPT	protitelesa usmerjena proti samemu protrombinu
AT	arterijska tromboza
AUA	arbitrarne enote za imunoglobuline razreda A
β_2 GPI	β_2 -glikoprotein I
CAPS	katastrofični antifosfolipidni sindrom
DEA	dietanolaminski pufer
ELISA	encimsko-immunska metoda na trdnem nosilcu
KV	koeficient variabilnosti
LA	lupusni antikoagulant
RA	revmatoidni artritis
SD	standardna deviacija
SS	Sjögrenov sindrom
SLE	sistemski lupus eritematozus
VT	venska tromboza

1. UVOD

1.1 IMUNOGLOBULINI

Humoralno imunost posredujejo protitelesa ali imunoglobulini, ki specifično prepoznajo in odstranijo antigene. Vsak imunoglobulin je sestavljen iz štirih polipeptidnih verig. Od teh sta dve identični težki verigi in dve identični lahki verigi. Med seboj so povezane s kovalentnimi disulfidnimi vezmi. Vezišče za antigen se nahaja v variabilnem fragmentu F_{ab} , ki ga gradi 110 aminokislin in se nahaja na N-terminalnem koncu vsake težke in lahke verige (V_H in V_L). Odsek, kjer sta le težki verigi, imenujemo stalni del ali predel F_c . Ta predstavlja vezavno mesto za efektorske molekule (1). Poznamo pet razredov imunoglobulinov, ki se ločujejo glede na njihove težke verige. V normalnem serumu je približno 80 % imunoglobulinov razreda G (IgG), 15 % imunoglobulinov razreda A (IgA), 5 % je imunoglobulinov razreda M (IgM), 0,2 % imunoglobulinov razreda D (IgD) in imunoglobulini razreda E (IgE), ki so v sledovih (2).

IgA obstaja v treh topnih oblikah, in sicer kot monomer ter v majhnih količinah kot dimer in sekretorni IgA. Monomerni in dimerni IgA sta prisotna v serumu, kjer pomagata vezati patogene na efektorske celice preko receptorja F_c IgA. Dimerni IgA je sestavljen iz dveh monomernih enot, povezanih z dodatno povezovalno polipeptidno verigo J. Sekretorni IgA je dimer, ki ima poleg verige J še dodatni protein, imenovan sekrecijska komponenta ali receptor poli-Ig. Sekrecijska komponenta je pomembna pri zaščiti mukozne površine pred napadi mikroorganizmov (1). Obstajata dva podrazreda IgA, IgA1 in IgA2. Razlikujeta se po zgradbi in koncentraciji v serumu. IgA2 ima veliko krajše giblivo mesto kot IgA1 in je bolj odporen na bakterijske proteaze. V krvi se nahaja 90 % IgA1 in 10 % IgA2. V serumu je IgA večinoma v monomerni obliki, v izločkih kot so slina, solze, sluz, znoj in želodčna tekočina pa je prisoten kot dimer. Večina IgA se nahaja v izločkih (2). Približno 40 mg sekretornega IgA na kg telesne teže se dnevno prenese skozi črevesni epitelij na mukozno površino (1).

Plazmatke proizvajajo IgA, ki znotrajcelično dimerizira skupaj s cisteinom bogato verigo J. Sekrecijska oblika IgA nastaja tako, da se dimerni IgA močno veže na receptor poli-Ig na bazalni površini mukozne epiteljske celice, ki je obrnjena proti krvnemu obtoku. Kompleks nato potuje s pomočjo endocitoze na površino sluznice, pri čemer se receptor poli-Ig cepi

tako, da ostane le-ta vezan na IgA (1). Za razliko od dimernega IgA se monomerni ne veže z receptorjem poli-Ig in tako ne more aktivno preiti v izloček (2).

1.2 EPITOPSKA SPECIFIČNOST

Reakcija med antigenom in protitelesom je podobna reakciji med encimom in substratom. Med antigensko determinanto in variabilno regijo protitelesa (paratopom) delujejo različne nekovalentne vezi, ki vključujejo vodikove in ionske vezi, hidrofobne interakcije ter Van der Waalsove sile. Imunske reakcije so zelo specifične in določena populacija protiteles ima za ligande, katerih zgradbe se zelo malo razlikujejo, ponavadi različne afinitete. S protitelesi se najmočnejše vežejo ligandi, katerih struktura se najbolj približa zgradbi imunogena (2). Afiniteta protitelesa označuje moč vezave enega paratopa protitelesa z enim epitopom antigena (3). Večina antigenov in protiteles pa je večvalentnih in vezava tako ni odvisna samo od afinitete. V tem primeru se uporablja pojem avidnost, ki pomeni celotno težnjo populacije specifičnih protiteles za vezavo z antigenskimi delci (2).

1.3 AVTOIMUNOST IN AVTOPROTITELESA

Pri avtoimunski bolezni se porušijo mehanizmi, ki normalno vzdržujejo toleranco (neodzivnost) do lastnega. Toleranca do lastnih antigenov je aktivno pridobljen proces in ni podedovana lastnost. Pri vsakem posamezniku obstaja določena verjetnost za pojav avtoimunosti, k njenemu morebitnemu nastanku pa pripomorejo številni dejavniki, ki vključujejo imunske nepravilnosti, genetsko ozadje, lokalne spremembe tkiva in okužbe. Okoljski dejavniki lahko sprožijo avtoimunost preko različnih mehanizmov: i.) s prekinitvijo anergije limfocitov T do lastnih antigenov; ii.) s sproščanjem skritih antigenov; iii.) s porušenjem ravnovesja med celicami T zaviralkami in T pomagalkami; iv.) s poliklonsko aktivacijo limfocitov s superantigeni; ter v.) z molekulsko mimikrijo, kjer je ista antigenska determinanta lahko prisotna v tujem mikrobnem antigenu in lastnem tkivu (4). Ocenili so, da le 5-8 % populacije razvije avtoimunske bolezni, ki potem ostane prisotna skozi vse življenje. Medtem ko so nekatere avtoimunske bolezni relativno blage narave, jih je kar nekaj povezanih z znatno obolevnostjo in smrtnostjo (5).

Avtoprotitelesa imajo različne fizikalno-kemijske in biološke lastnosti ter pripadajo različnim razredom in podrazredom imunoglobulinov. V normalnih okoliščinah se med imunskim odzivom tvorijo tudi majhne količine avtoprotiteles. To so takoimenovana naravna avtoprotitelesa razreda IgM, ki imajo šibko afiniteto in ne povzročajo okvar tkiva. Nasprotno pa bolniki z nekaterimi avtoimunskimi boleznimi proizvajajo protitelesa razreda IgG, ki imajo veliko afiniteto do lastnih antigenov (4).

Avtoimunske bolezni lahko razdelimo na dve večji skupini, in sicer na tiste, ki prizadenejo posamezne organe, na primer ščitnico ali nekatere druge endokrine žleze, jetra in ledvice, ter na sistemske avtoimunske bolezni, pri katerih ni tarčnega organa, pač pa je lahko prizadetih več organov ali organskih sistemov in jih zato imenujemo tudi organsko nespecifične (5).

Vnetne revmatične bolezni predstavljajo več kot sto vrst bolezni, ki lahko prizadenejo vse organske sisteme. Skupna značilnost vseh teh bolezni je neustrezen odziv imunskega sistema na telesu lastne antigene. V to skupino uvrščamo številne bolezni, med drugimi tudi revmatoidni artritis (RA) in sistemske vezivnotkivne bolezni. Med slednje prištevamo sistemski lupus eritematozus (SLE), antifosfolipidni sindrom (APS), Sjögrenov sindrom (SS) in druge (6).

1.4 ANTIFOSFOLIPIDNI SINDROM (APS)

Angleški revmatolog Graham Hughes je pred 30 leti prvič podrobno opisal APS, ki so ga kasneje poimenovali tudi kot Hughesov sindrom (7, 8). APS je pridobljena avtoimunska trombotična težnja, z dobro opredeljenimi kliničnimi značilnostmi, kjer imajo bolniki v krvnem obtoku prisotna antifosfolipidna protitelesa (7, 9).

1.4.1 EPIDEMIOLOGIJA APS

APS se pojavlja samostojno kot primarna bolezen pri več kot 50 % bolnikih, lahko pa je povezan z drugimi sistemskimi avtoimunskimi boleznimi, med katerimi je najpogostejši SLE, pri čemer se razvije v sekundarni APS (10-13).

Precejšen delež oseb z določenimi avtoimunskimi ali revmatičnimi obolenji ima prisotna antifosfolipidna protitelesa: SLE 30-50 %, SS 30 %, RA 5-50 % (14). Povišana antifosfolipidna protitelesa zasledimo tudi pri okužbah s sifilisom, hepatitisom C, virusom HIV, tuberkulozi, infekcijski mononukleozii in malariji, vendar pa so v tem primeru prisotna prehodno (15). Poleg tega lahko tudi različna zdravila za srce (prokainamid, kinidin, propranolol, hidralazin), nevroleptiki (fenitoin, klorpromazin) in druge učinkovine (interferon α , kinin, amoksicilin) vplivajo na pojav antifosfolipidnih protiteles (14). Antifosfolipidna protitelesa najdemo tudi pri 1-5 % na videz zdravih oseb (11).

Akutno potekajoča oblika APS je t.i. katastrofični antifosfolipidni sindrom (CAPS), ki ima za posledico razširjeno trombotično mikroangiopatijo in večorgansko odpoved (11, 16). CAPS predstavlja manj kot 1 % primerov bolnikov z APS. Bolniki s CAPS so življenjsko ogroženi s stopnjo smrtnosti okoli 50 % (16-18).

Antifosfolipidna protitelesa so prisotna pri približno enem od petih pacientov, ki so doživeli kap pri starosti manj kot 50 let (19). Razširjenost primarnega APS ni znana, čeprav se ocenjuje, da prizadene 0,5 % prebivalstva. SLE prizadene od 1 do 20 na vsakih 100.000 žensk (odvisno od narodnosti) in med temi jih približno 20-35 % potem razvije sekundarni APS (11, 12). Za APS obolevajo predvsem mlade ženske v rodni dobi, redkeje pa se pojavi pri otrocih. Med vsemi bolniki z APS jih je le 12 % starejših od 50 let (11). Pri 11-29 % žensk s preeklampsijo so prav tako zaznali prisotnost antifosfolipidnih protiteles (19). V veliki mednarodni kohortni študiji je bila povprečna starost ob postavitvi diagnoze APS 34 let (20). Razmerje moški proti ženskam je 1 : 3,5 za primarni APS in 1 : 7 za sekundarni APS, povezan z SLE (11).

1.4.2 KLINIČNE ZNAČILNOSTI ANTIFOSFOLIPIDNEGA SINDROMA

Spekter kliničnih značilnosti pri APS je širok. Med klinične značilnosti sodije tiste, ki so sprejete v klasifikacijske kriterije (a) in druge, ki sicer niso zahtevane za postavitvev diagnoze, vendar pa so povezane z boleznijo (b) (18-20):

1. pogoste značilnosti (> 20 % primerov): globoka venska tromboza (a), prezgodnje izgube plodu (< 10 tednov) (a), kap (a), migrene (b), trombocitopenija in livedo retikularis (b);
2. manj pogoste značilnosti (5-20 % primerov): pljučna embolija (a), miokardni infarkt (a), preeklampsija (a), kognitivna disfunkcija (b), kožne razjede (b);

3. redke značilnosti (< 5 % primerov): arterijska tromboza nog (a), venska ali arterijska tromboza rok (a), epilepsija (b), pljučna hipertenzija (b),...

Prvi klasifikacijski kriteriji za opredelitev APS so bili postavljeni na mednarodnem simpoziju leta 1999 na Japonskem (21). Potreba po oblikovanju soglasnih meril glede APS se je še povečala zaradi raznolikosti znanstvenih disciplin, ki so prispevale k znanju o tej bolezni (imunologija, revmatologija, hematologija, molekularna biologija,...). Tako so se leta 2006 kriteriji spremenili (22).

Klasifikacijski kriteriji za diagnozo APS zapovedujejo, da je le-ta potrjen, če je prisoten vsaj eden od kliničnih in eden od laboratorijskih kriterijev (22).

Klinični kriteriji:

- Trombotični pojavi (eden ali več kliničnih dogodkov arterijske, venske ali tromboze malega žilja, v kateremkoli tkivu ali organu. Tromboza mora biti potrjena histopatološko ali z ustrezno slikovno diagnostiko).
- Ginekološki zapleti:
 - Trije ali več zaporednih nepojasnjenih spontanih splavov pred 10. tednom nosečnosti.
 - Nepojasnjena smrt morfološko normalnega ploda po 10. tednu nosečnosti.
 - Prezgodnje rojstvo morfološko normalnega novorojenčka pred 34. tednom nosečnosti.

Laboratorijski kriteriji (prisotni dva ali večkrat v intervalu vsaj 12 tednov):

- Lupusni antikoagulant (LA) prisotni v plazmi in določeni v skladu s smernicami Mednarodne zveze za trombozo in hemostazo (23).
- Protitelesa proti kardiolipinu IgG in/ali IgM (aCL) v serumu ali plazmi, prisotna v srednjem ali visokem titru (> 99. percentil).
- Anti- β_2 GPI IgG in/ali IgM v serumu ali plazmi (>99. percentil).

Pozitiven test na vsa tri antifosfolipidna protitelesa je povezan s povečanim tveganjem za trombozo oziroma nosečniški zaplet, pri čemer imajo trojno pozitivni bolniki tudi večje tveganje za ponovitev dogodka (17,18).

V klinični praksi imajo nekateri bolniki prisotne klinične znake APS ob odsotnosti LA, aCL in anti- β_2 GPI. Tako se je oblikoval pojem serološko negativni APS, ki torej zaobjame bolnike s kliničnimi znaki APS, brez prisotnosti antifosfolipidnih protiteles (19). Taki bolniki imajo sicer lahko prisotna antifosfolipidna protitelesa, ki pa še niso vključena v laboratorijske klasifikacijske kriterije (aCL IgA, anti- β_2 GPI IgA, protiteles proti fosfatidilserinu, proti samemu protrombinu in aPS/PT). Njihova morebitna vključitev bi lahko izboljšala diagnostiko APS (22).

1.5 ANTIFOSFOLIPIDNA PROTITELESA

Antifosfolipidna protitelesa so skupina heterogenih imunoglobulinov IgG, IgA in IgM. Prepoznajo plazemske proteine β_2 -glikoprotein I (β_2 GPI), protrombin, aneksin V, protein C, protein S, ter visoko in nizko molekularne kininogene, ki imajo afiniteto za negativno nabite fosfolipidne površine, ne pa za samo strukturo fosfolipidne površine (10, 24-27). Antigenske tarče teh avtoprotiteles sta poleg že naštetih še faktor XII in trombomodulin (28). Med vsemi antigenskimi tarčami antifosfolipidnih protiteles sta β_2 GPI in protrombin najbolj pogosta in najbolj raziskana ter tudi odgovorna za večino aktivnosti LA (29, 30). Ker so vsi naštetni proteini vpleteni v kaskado koagulacije krvi, je jasno, da lahko protitelesa, ki zmanjšajo njihovo razpoložljivost ali ovirajo njihovo delovanje, vplivajo na prokoagulantno in antikoagulantno ravnotežje. To bi lahko predstavljajo patološko ozadje, na katerem temelji povečano tveganje za trombozo pri bolnikih, pozitivnih na antifosfolipidna protitelesa (28).

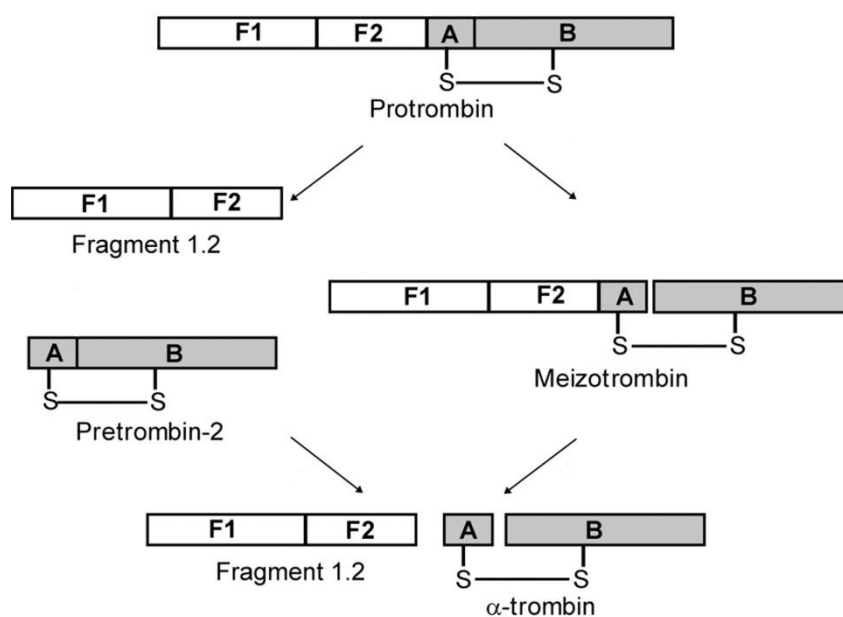
Kljub mnogim študijam o patologiji antifosfolipidnih protiteles pa še niso ugotovili mehanizma, preko katerega naj bi ta povzročala trombozo. Poskušali so pojasniti paradoks med podaljšanim časom strjevanja krvi v koagulacijskih testih *in vitro* ter pojavom tromboze *in vivo* (11, 26, 31). Pojav je znan kot "aktivnost lupusnih antikoagulantov". Ker antifosfolipidna protitelesa porabljajo fosfolipidno površino, je te premalo za koagulacijske faktorje, ki jo prav tako potrebujejo za normalno delovanje. Zato je čas strjevanja *in vitro* podaljšan in se po dodatku fosfolipidov normalizira (26).

Benigna netrombotična antifosfolipidna protitelesa so pogosta pri nekaterih infekcijskih stanjih. Taka protitelesa ne potrebujejo plazemskih proteinov in se vežejo neposredno na fosfolipide (29). Možna je tudi zaščitna vloga teh avtoprotiteles, ki se pojavijo kot

prehoden ali omejen odziv na akutno stanje. Pravzaprav naj bi antifosfolipidna protitelesa krožila v krvnem obtoku zdravih posameznikov kot naravna protitelesa, prikrita z anti-idiotipi (32).

1.6 MOLEKULA PROTROMBINA

Protrombin (faktor II) je od vitamina K odvisen glikoprotein, ki se sintetizira v jetrih in je v normalni plazmi prisoten v koncentraciji 2,5 mmol/l (33). Njegov gen se nahaja na kromosomu 11. Zreli človeški protrombin, ki kroži v krvi, je enoverižni glikoprotein iz 579 aminokislinskih ostankov, z molekulsko maso 72 kD. V času biosinteze v jetrih je protrombin podvržen post translacijski γ -karboksilaciji (29). V prisotnosti kalcija se veže na negativno nabite fosfolipide preko domene GLA (γ - karboksigliutaminska kislina). Ta je nujno potrebna za nastanek biološko aktivnega trombina iz protrombina. Domeni GLA sledi domena kringel, ki vsebuje 2 strukturna elementa kringel ter N-terminalno serinsko proteazo. Kringel je struktura s tremi značilnimi disulfidnimi vezmi, ki so homologne številnim proteinom. V posameznih proteinih opravljajo domene kringel različne funkcije v številnih celicah. V molekuli protrombina je ta domena vpletena v vezavo trombina v fibrin (34). Faktor Xa katalizira aktivacijo človeškega protrombina s proteolitično cepitvijo, kar ima za posledico nastanek fragmenta 1+2 in pretrombina-2 (Slika 1). Pretrombin-2 je sestavljen iz A in B verig trombina. Na desni strani (Slika 1) kompleks protrombinaze aktivira protrombin v zaporedni reakciji preko cepitve, pri čemer nastane meizotrombin, temu pa sledi naslednja cepitev in tvorba α -trombina (25).



Slika 1: Cepitve protrombina v trombin (prilagojeno po 25)

Protrombin se fiziološko aktivira s protrombinaznim kompleksom, ki je del tako intrinzične kot tudi ekstrinzične poti koagulacije. Sestavljajo ga faktorja strjevanja Va in Xa, Ca^{2+} in fosfolipidi. Ko enkrat negativno nabiti fosfolipidi vežejo protrombin, ga protrombinazni kompleks pretvori v trombin, ki nato aktivira fibrinogen v fibrin. Monomerni fibrin polimerizira in tvori zamreženo strukturo, ki predstavlja ogrodje strdka. Protrombin ima ključno vlogo v ravnovesju med prokoagulantno in antikoagulantno funkcijo. Prokoagulantna funkcija predstavlja aktiviranje trombocitov in pretvorbo fibrinogena v fibrin, ki je končni produkt koagulacije. Antikoagulantna funkcija pa je vezava trombina na endotelni celični receptor trombomodulin. Trombin, vezan na trombomodulin, izgubi svojo prokoagulantno funkcijo in aktivira pomemben antikoagulantni protein C. Ta nato povzroči razgradnjo faktorja V in deaktivira protrombinazni kompleks. Zaradi te negativne povratne zanke deluje kompleks protrombin/trombin kot "indirektni" antikoagulant (26, 35).

1.7 PROTITELESA PROTI PROTROMBINU IN AKTIVNOST LA

Družina antifosfolipidnih protiteles vključuje številna protitelesa, med katerimi so nekatera usmerjena proti protrombinu (17). Zelo zgodnje študije kažejo, da bi protrombin lahko bil

antigenska tarča LA (33). V 80-ih letih prejšnjega stoletja je bilo izvedenih več raziskav, da bi razjasnili hipoprotrombinemijo pri bolnikih z LA. Leta 1983 so Bajaj in sodelavci prvi ugotovili prisotnost protiteles proti protrombinu pri bolnikih z LA in hudo hipoprotrombinemijo. Domnevali so, da je slednja posledica hitre odstranitve kompleksov protrombin-protitelesa proti protrombinu iz krvnega obtoka (36, 37). Leta 1984 je Edson dokazal komplekse protrombin - protitelesa proti protrombinu v plazmi bolnikov z LA, vendar brez resnih hipoprotrombinemij (38). S temi ugotovitvami se je strinjal tudi Fleck in z raziskavo pokazal, da je imelo 74 % prebivalstva z LA prisotne komplekse protrombin- protitelesa proti protrombinu ter zaključil, da imajo ta protitelesa lupusno antikoagulantno aktivnost (34). Kasneje so v krvnem obtoku opazili tudi komplekse protrombin - protitelesa proti protrombinu pri tistih bolnikih z LA, ki so imeli normalne vrednosti protrombina (25).

Več raziskovalnih skupin je proučevalo antikoagulantne lastnosti protiteles proti protrombinu (25, 33, 39). Permpikul je s sodelavci izoliral frakcije IgG iz serumov 10 bolnikov z LA in pokazal, da je bila aktivnost LA posledica prisotnosti protiteles proti protrombinu v najmanj 9 vzorcih (40). Nekateri raziskovalci (25, 33) so poročali o obstoju dveh vrst protiteles proti protrombinu v krvnem obtoku, ki jih lahko ločimo glede na njihove učinke pri koagulacijskih testih: 1) funkcionalna, ki povzročajo aktivnost LA in 2) nefunkcionalna, ki ne prispevajo k aktivnosti. LA Razlike v učinkih so verjetno posledica razlik v specifičnosti njihovih epitopov med različnimi protitelesi proti protrombinu (25).

Mehanizme, s katerimi protitelesa proti protrombinu povzročijo aktivnost LA, so bili v preteklosti večkrat proučevali (25). Pierangelijeva s sodelavci je predlagala, da protitelesa proti protrombinu povzročajo podaljšanje strjevanja krvi in vitro z inhibiranjem pretvorbe protrombina v trombin (41). Vendar pa se zdi malo verjetno, da bi protitelesa proti protrombinu podaljšala čas strjevanja krvi z oviranjem aktivacije protrombina, saj tak mehanizem ne bi mogel pojasniti efekta njihove nevtralizacije z visokimi koncentracijami fosfolipidov (25).

Nedavno so Simmelink in sodelavci pokazali, da dodatek protiteles proti protrombinu, izoliranih iz plazme pozitivne na LA v normalno plazmo inducira aktivnost LA, ki pa jo nevtralizira dodatek fosfolipidov (39, 42). Dokazali so tudi, da kompleksi med protrombinom in protitelesi proti protrombinu z aktivnostjo LA zavirajo tako

protrombinazni kot tenazni kompleks. V prokoagulantnem stanju lahko protitelesa proti protrombinu povečajo afiniteto protrombina za negativno nabite fosfolipide in s tem tekmujejo s faktorji strjevanja krvi za proste fosfolipidne površine. Mehanizem je podoben tistemu za protitelesa anti- β_2 GPI. Z modelom, ki temelji na povečani afiniteti kompleksov protein - protitelo (β_2 GPI ali protrombin) za negativno nabite fosfolipide, lahko razložimo, zakaj aktivnost LA, ki so jo povzročila protitelesa anti- β_2 GPI in tista proti protrombinu, nevtraliziramo z dodatkom fosfolipidov (25).

1.7.1 IMUNSKÉ ZNAČILNOSTI PROTITELES PROTI PROTROMBINU

Visok odstotek protiteles proti protrombinu ima vrstno specifičnost za človeški protein, manjšina pa reagira z govejim protrombinom. Epitopi, ki jih prepozajo protitelesa proti protrombinu, še niso znani. Poročali so o vezavi tovrstnih protiteles na protrombin 1 in fragment 1 kot tudi na fragment 1+2 (33) (Slika 1). Leta 1999 so Akimoto in sodelavci raziskovali porazdelitev epitopov pri protitelesih proti protrombinu z uporabo rekombinantnih protrombinskih fragmentov (43). Ugotovili so, da je bilo 61,5 % protiteles proti protrombinu pretežno usmerjenih na fragment 1, 38,4 % pa na protrombin (fragment 2 + α trombin) (43). Ti podatki kažejo, da se prevladujoči epitopi verjetno nahajajo v protrombinski molekuli, in sicer v bližini vezavnega mesta za fosfolipide, čeprav se drugače porazdeljujejo heterogeno (33).

1.8 LABORATORIJSKO DOLOČANJE PROTITELES PROTI PROTROMBINU

Laboratorijska metodologija za določanje antifosfolipidnih protiteles je ključnega pomena za diagnostiko APS (28). Običajni testi za detekcijo antifosfolipidnih protiteles so koagulacijski testi, s katerimi določamo LA in encimsko-immunski testi, s katerimi ugotavljamo protitelesa aCL ali anti- β_2 GPI (10, 44, 45). Protitelesa proti protrombinu so povezana z APS, vendar njihova določitev, skladno z mednarodno sprejetimi klasifikacijskimi merili, ni pogoj za postavitve diagnoze APS.

Prvi tehniki, ki sta bili na voljo za presejalno testiranje protiteles proti protrombinu, sta bili dvojna imunodifuzija in navzkrižna imunoelektroforeza (25, 36, 38). Njuna glavna pomanjkljivost je, da ne ponujata kvantitativne ocene titra protiteles. Poleg tega sta v

nekaterih primerih titer in/ali afiniteta protiteles proti protrombinu prenizka, da bi lahko na ta način dobili jasne precipitacijske linije. Druge tehnike temeljijo na oslabitvi aktivacije protrombina s protitelesi, ki ga prepoznavajo. Vse našteje metode pa niso primerne v rutinski klinični praksi, kjer imamo opravka z velikim številom pacientov (34, 46).

1.8.1 ENCIMSKO-IMUNSKÉ METODE NA TRDNEM NOSILCU

Leta 1995 je Arvieux s sodelavci pokazal, da lahko protitelesa proti protrombinu zaznamo s standardno encimsko-imunsko metodo na trdnem nosilcu (ELISA), ki je postala najpogosteje uporabljena tehnika (47). Omogoča hitro določitev koncentracije in izotipa protiteles proti protrombinu (46). Izvedba encimsko-imunskih testov za določanje protiteles proti protrombinu je enostavna, lahko tudi avtomatizirana in omogoča presejanje velikega števila vzorcev. Kljub njihovi splošni pa razširjenosti encimsko-imunski testi za določanje različnih protiteles proti protrombinu še vedno niso standardizirani (28, 48).

S tehniko ELISA kvantitativno določamo antigene ali protitelesa. Protitelesa določamo z indirektno ELISA. Serum s preiskovanimi protitelesi dodamo v vdolbinico mikrotitrne plošče, prekrivane z antigenom. Po reakciji z vezanim antigenom nevezana protitelesa speremo, vezana pa določimo s sekundarnimi protitelesi. Izotipsko specifična sekundarna protitelesa s konjugiranim encimom se vežejo na primarna protitelesa. Encim nato reagira s substratom, kar privede do obarvanega reakcijskega produkta. Najpogosteje uporabljeni encimi so alkalna fosfataza, peroksidaza in β -galaktozidaza. Nastali obarvani produkt merimo s spektrofotometrom (1, 49).

Protitelesa proti protrombinu se v testu ELISA obnašajo podobno kot protitelesa anti- β_2 GPI. Način predstavitve antigenov, imobiliziranih na določene trdne nosilce močno vpliva na njihovo prepoznavanje s strani protiteles v imunskih testih. Vse to je vzrok za različna poročila glede razširjenosti protiteles proti protrombinu, ki se giblje med 50 do 90 % (46). Protitelesa proti protrombinu prepoznajo protrombin samo takrat, kadar je ta vezan na γ -obsevane polistirenske ali polivinil kloridne (PVC) mikrotitrne ploščice, z visoko vezavnostjo. Nasprotno pa je vezava neuspešna, kadar protrombin imobiliziramo na navadne polistirenske ploščice (50, 51). V Preglednici 1 je predstavljeno, kako protitelesa proti protrombinu prepoznajo antigen, vezan na različne površine (46). Navedene ugotovitve lahko pojasnimo z dvema hipotezama, podprtima z eksperimentalnimi dokazi, ki se med seboj ne izključujeta:

1. Protitelesa proti protrombinu so protitelesa z nizko afiniteto, katerih vezava se stabilizira z bivalento pritrditvijo dveh molekul antigena. Takšna vezava je omogočena na anionski (fosfolipidni) površini (28).
2. Protitelesa anti- β_2 GPI in protitelesa proti protrombinu so usmerjena proti skritim oz. kriптиčnim epitopom, ki se izpostavijo potem, ko se konformacija antigena po vezavi na anionsko površino spremeni (28).

Protrombin učinkoviteje prepoznavajo protitelesa takrat, ko je vezan na mikrotitrške ploščice, prekrite s fosfatidilserinom, v prisotnosti kalcijevih ionov (33).

Preglednica 1: Protitelesno prepoznavanje protrombina, vezanega na različne površine (prilagojeno po 46)

Človeški protrombin vezan na:	Razširjenost protiteles proti protrombinu (%)
navadne polistirenske ploščice	0
γ -obsevane ploščice	55
visoko vezavne PVC ploščice	50-58
ploščice prekrite s fosfatidilserinom	90

PVC: polivinil klorid

V nasprotju s protrombinom, vezanim na PVC ploščice, protrombin vezan na fosfatidilserin ni omejen v vodoravnem gibanju, kar izboljša povezovanje in pravilno usmeritev antigena in omogoči boljšo vezavo protiteles (25, 33). Prav tako pa se lahko na fosfatidilserin vežejo tudi morebitni, v plazmi že obstoječi kompleksi protiteles, vezanih na protrombin.

Nekateri znanstveniki trdijo, da obstajata dve različni populaciji protiteles proti protrombinu, za katere se uporabljata različna načina detekcije z ELISA (33, 34, 45). Prva naj bi bila protitelesa proti samemu protrombinu (aPT), ki jih določamo z uporabo γ -obsevanih mikrotitrskih ploščic, druga pa aPS/PT, kjer določamo avtoprotitelesa proti kompleksu fosfatidilserin - protrombin (33, 34, 45). V več člankih so ugotovili, da imajo rezultati metode za določanje protiteles, usmerjenih proti samemu protrombinu precej nižjo diagnostično občutljivost, v primerjavi z rezultati tests ELISA aPS/PT, pri čemer pa je diagnostična specifičnost rezultatov dokaj primerljiva (28, 52, 53). Poleg tega mnogo poročil nakazuje, da je prisotnost protiteles PS/PT, ne pa tudi aPT, močnejše povezana s kliničnimi manifestacijami APS in z aktivnostjo LA (33, 54). Žigon in sodelavci so

dokazali, da imajo protitelesa proti protrombinu heterogeno avidnost in da v bolnikih z APS najdemo vse od pretežno nizko avidnih pa do pretežno visoko avidnih (52, 53). Z njihovo modificirano izvedbo testa ELISA aPS/PT so lahko detektirali tudi nizko avidna protitelesa proti protrombinu, medtem ko z metodo aPT, niso uspeli določiti nizko avidnih protiteles (53).

1.9 VREDNOTENJE METOD IN REZULTATOV

Namen analitičnih meritev je pridobiti konsistentne, zanesljive in točne podatke. Zato potrebujemo validacijo, s katero dokažemo, da nova metoda služi svojemu namenu. Pomembno pri validaciji je, da so analizne meritve, opravljene na neki lokaciji, primerljive s tistimi, ki so izvedene na drugih lokacijah (55). Pri validaciji vrednotimo natančnost, točnost, območje dela, analizno občutljivost, analizno specifičnost, linearnost, mejo določljivosti, prazne vrednosti in robustnost. Nova metoda potrebuje tudi diagnostično vrednotenje rezultatov laboratorijskih parametrov, z ugotavljanjem diagnostične občutljivosti in specifičnosti, ki sta kazalca diagnostične uporabnosti rezultatov. Vsi omenjeni diagnostični parametri so v pomoč pri presejanju, diagnostiki in spremljanju bolezni (56).

NATANČNOST ANALIZNE METODE

Analizna natančnost določene metode podaja sipanje rezultatov pri posameznih meritvah. Ponovljivost rezultatov je merilo za analizno natančnost, ki ga podajamo kor standardni odmik ali koeficient variacije (KV) (49, 57). Natančnost nam pove, kako velike so razlike med kvantitativnimi rezultati, dobljenimi s ponavljanjem poskusa na istem vzorcu. Metoda je bolj natančna, če je razlika čim manjša. Razlikujemo natančnost rezultatov znotraj analize in natančnost med analizami.

Za opredelitev testa določimo, kolikšna je njegova znotrajanalizna in medanalizna natančnost. Znotrajanalizno natančnost določimo na enega od načinov tako, da večkrat ponovimo meritve istega vzorca znotraj ene analize. Drugi način pa je, da ponovimo meritve več različnih vzorcev v dvojniku znotraj ene analize in nato izračunamo povprečne razlike. V tem primeru morajo biti vzorci izbrani naključno. Meritve lahko izvedemo isti dan ali ob različnih dnevih (49). Medanalizno natančnost, ki se nanaša na ponovljivost

rezultatov posameznih meritev na istem vzorcu skozi daljše časovno obdobje, pri različnih analitikih, v različnih časih dneva oziroma serijah, pa določimo s ponovljivostjo kontrolnih vzorcev.

ANALIZNA TOČNOST

Analizna točnost je merilo pravilnosti metode oziroma stopnje ujemanja izmerjenih rezultatov s pravo vrednostjo. Večja kot je razlika med izmerjeno in pravo vrednostjo, tem manj točna je metoda in obratno. Točnost torej pomeni, v kolikšni meri smo se z neko določitvijo uspeli približati pravi vrednosti (49). S podatkom o točnosti odkrivamo sistemske napake (57).

ANALIZNA OBČUTLJIVOST IN ANALIZNA SPECIFIČNOST

Analizna občutljivost predstavlja najmanjšo količino analita v vzorcu, ki ga lahko še natančno izmerimo (58). V praktičnem smislu je občutljivost naklon umeritvene krivulje, ki ga dobimo z odzivom signala na spremembo koncentracije analita (55).

Analizna specifičnost se nanaša na sposobnost analitične metode, da v vzorcu izmeri samo določeno substanco oziroma analit, ne pa tudi drugih, ki so v vzorcu prav tako prisotne (nečistote, razgradni produkti, matriks) (55, 58).

DIAGNOSTIČNA OBČUTLJIVOST

Diagnostična občutljivost opredeljuje delež bolnikov s preiskovano boleznijo, pri katerih je rezultat pozitiven. Negativen rezultat pri preiskovancih, ki imajo bolezen pomeni lažno negativen rezultat (59).

DIAGNOSTIČNA SPECIFIČNOST

Diagnostična specifičnost opredeljuje delež preiskovancev, ki nimajo preiskovane bolezni in pri katerih je rezultat negativen. Pozitiven rezultat pri preiskovancih, ki nimajo bolezni, se vrednoti kot lažno pozitiven (59).

POZITIVNA IN NEGATIVNA NAPOVEDNA VREDNOST

Napovedna vrednost je določena z občutljivostjo specifičnostjo testa ter s prevalenco preiskovane bolezni. Običajno jo izražamo v odstotkih. Pri zelo majhni prevalenci neke

bolezni bo pozitivna oziroma negativna napovedna vrednost testa vedno zelo majhna, ne glede na visoko specifičnost in občutljivost uporabljenega testa (60).

Pozitivna napovedna vrednost označuje verjetnost, da gre za bolezen, če dobimo pozitiven rezultat testa, negativna napovedna vrednost pa verjetnost, da ne gre za bolezen, če dobimo negativen rezultat testa (49).

PRAŽNA VREDNOST

Izraz pražna vrednost označuje najnižjo koncentracijo, ki je še klinično pomembna. Predstavlja mejo med pozitivnim in negativnim rezultatom. Pražne vrednosti določimo iz meritev, izvedenih na kontrolni skupini, ki vključuje serume, v katerih so vrednosti testiranega analita predvidoma normalne. Največkrat se v ta namen uporabijo serumi krvodajalcev (49). V primeru, da so vrednosti normalno porazdeljene, se pražna vrednost določi na podlagi srednje vrednosti in standardnih deviacij (SD). V kolikor pa se izkaže, da porazdelitev ni normalna, pražno vrednost predstavlja 99. percentil testiranih normalnih vzorcev. Določitev pražne vrednosti vpliva tudi na kasnejše določitve razširjenosti bolezni v ciljni populaciji in posledično tudi na diagnostično uporabnost rezultatov (61).

2. NAMEN DELA

Antifosfolipidni sindrom (APS) je sistemska avtoimunska bolezen, ki se klinično izraža s prisotnostjo tromboz in/ali zapletov v nosečnosti, ob sočasni prisotnosti enega ali več vrst antifosfolipidnih protiteles (aCL, β_2 -GPI, LA). Protitelesa proti protrombinu še ne sodijo med dogovorjene laboratorijske klasifikacijske kriterije za opredelitev APS, vendar je veliko dokazov, da so protitelesa aPS/PT razreda IgG in IgM statistično značilno povezana s tem sindromom in včasih tudi edina povišana med vsemi testiranimi antifosfolipidnimi protitelesi (44, 54, 62). Določanje protiteles aPS/PT IgA bi potencialno lahko dopolnilo diagnostiko APS in izboljšalo oceno tveganja za nastanek tromboz in/ali nosečnostnih zapletov.

Namen magistrske naloge je:

1. Ovrednotiti hišno encimsko-immunsko metodo na trdnem nosilcu za določanje protiteles aPS/PT IgA z vidika analize natančnosti (znotraj in medanalizne ponovljivost), določitve prazne vrednosti in diagnostične uporabnosti rezultatov optimizirane metode (diagnostična specifičnost in diagnostična občutljivost, pozitivna in negativna napovedna vrednost), na klinično dobro opredeljenih skupinah bolnikov, s sistemskimi avtoimunskimi boleznimi, v primerjavi s skupino zdravih krvodajalcev.
2. Ugotoviti pogostost prisotnosti protiteles aPT/PS IgA pri bolnikih z APS, tistih z drugimi avtoimunskimi boleznimi kot so SLE, RA, SS in osebah brez njih.
3. Ugotoviti povezanost protiteles aPS/PT IgA s posameznimi kliničnimi znaki APS.

3. MATERIAL IN METODE

3.1 VZORCI

Serumske vzorce bolnikov s sistemskimi avtoimunskimi boleznimi smo pridobili iz obstoječe banke Laboratorija za imunologijo revmatizma, Kliničnega oddelka za revmatologijo SPS Interne klinike Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana. Serume klinično zdravih krvodajalcev pa smo dobili na Zavodu RS za transfuzijsko medicino. V raziskavo smo vključili 579 oseb, med njimi je bilo 400 žensk in 179 moških. Posamezniki vključeni v raziskavo so bili stari med 16 in 85 let, povprečna starost pa je znašala 42 let.

Vzorci smo razporedili v tri skupine:

1. Krvodajalci – 221 naključnih vzorcev, od tega 141 odvzetih moškim in 80 ženskam, povprečna starost 42 let.
2. Bolniki s sistemskimi vezivno tkivnimi boleznimi – 223 vzorcev (39 moških, 184 žensk), povprečna starost 47 let:
 - a) APS – 119 vzorcev:
 - i. Primarni APS – 82 vzorcev, povprečna starost 42 let
 - ii. Sekundarni APS – 37 vzorcev, povprečna starost 42 let
 - b) SLE – 40 vzorcev, povprečna starost 44 let
 - c) RA – 52 vzorcev, povprečna starost 58 let
 - d) SS – 12 vzorcev, povprečna starost 58 let
3. Ženske z zapleti v nosečnosti, ki so značilni za APS in negativne na antifosfolipidna protitelesa, ki so vključena v klasifikacijske kriterije za postavitev diagnoze APS (seronegativni obstetrični APS) – 135 vzorcev, povprečna starost 32 let:
 - a) ženske s tremi ali več nepojasnjenimi zaporednimi spontanimi splavi pred 10. tednom nosečnosti – 63 vzorcev, povprečna starost 33 let;
 - b) ženske z eno ali več izgubami morfološko normalnega ploda med 10. in 34. tednom nosečnosti - 71 vzorcev, povprečna starost 32 let;
 - c) ženske s prezgodnjim rojstvom morfološko normalnega ploda pred 34. tednom nosečnosti, in sicer zaradi hujše preeklampsije, eklampsije ali placentalne insuficience – 33 vzorcev, povprečna starost 32 let.

Med vsemi preiskovanimi bolniki (bolniki s sistemsko vezivno tkivnimi boleznimi in seronegativnim obstetričnim APS) jih je 49 doživelo arterijsko trombozo (AT), 57 vensko trombozo (VT), 6 bolnikov pa tako AT kot tudi VT. Med vsemi preiskovankami je imelo v preteklosti zaplete v nosečnosti 188 žensk.

3.2 INTERNI STANDARDI

Za umeritev testa smo uporabili serume bolnikov z APS, ki smo jih izbrali na osnovi večkratnih predhodnih testiranj in so zaradi svoje primernosti (zadostna količina, čistost vzorca, negativen test na protitelesa anti- β 2GPI, primerni nivoji protiteles aPS/PT IgA) ustrezali kriterijem za interne standarde.

- Interni standard protiteles aPS/PT IgA za umeritveno krivuljo:
 - T 503, redčen 1:2 v glicerolnem pufru;
 - redčitve internega standarda: pripravili smo sedem redčitev internega standarda v razmerju 1:2 – 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400 do redčitve 1:12800
- Interni pozitivni kontroli:
 - pozitivna kontrola 1: Z 040, redčena 1:4 v glicerolnem pufru;
 - pozitivna kontrola 2: T 860, redčena 1:2 v glicerolnem pufru.
- Negativna kontrola: serum klinično zdravega krvodajalca, ki je bil negativen na protitelesa aPS/PT IgA in druga antifosfolipidna protitelesa.

3.3 ANTIGEN

Človeški protrombin (7,2 g/L), Enzyme Research Laboratories, Swansea, UK.

3.4 MIKROTITRSKE PLOŠČICE

Polistirenske mikrotitrnske ploščice s srednjo vezavno močjo: 96 vdolbinic, Costar[®] medium binding EIA/RIA plates, Cambridge, ZDA

3.5 KEMIKALIJE

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

- Goveji serumski albumin (BSA), Sigma, St. Louis, ZDA.
- Kalcijev klorid dihidrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) analitske čistote, Merck, Darmstadt, Nemčija.
- Kalijev klorid (KCl) analitske čistote, Merck, Darmstadt, Nemčija.
- Kloroform analitske čistote, Kemika, Zagreb, Hrvaška.
- Klorovodikova kislina (HCl) analitske čistote, Kemika, Zagreb, Hrvaška.
- Konjugat IgA: afinitetno prečiščena kunčja protitelesa, usmerjena proti človeškim IgA, konjugirana z alkalno fosfatazo, Accurate Chemical & Scientific Corporation (ACSC), Westbury, ZDA.
- Metanol (CH_3OH) analitske čistote, Kemika, Zagreb, Hrvaška.
- Natrijev hidroksid (NaOH) analitske čistote, Kemika, Zagreb, Hrvaška.
- Natrijev klorid (NaCl) analitske čistote, Merck, Darmstadt, Nemčija.
- Para-nitrofenilfosfat 5 mg tablete (pNPP), Sigma Chemical, St. Louis, ZDA.
- Tris (3-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiol), TRIZMA base, Sigma Aldrich, Steinheim, Nemčija.
- Tween 20 (polioksietilen sorbitan monolavrat) EIA čist, Bio-Rad, Richmond, ZDA.

3.6 PUFRI IN RAZTOPINE

Dietanolaminski pufer (DEA), pH 9,8:

dietanolamin	970 mmol/L
magnezijev klorid	0,49 mmol/L
natrijev azid	3,1 mmol/L

pH uravnamo z 2M klorovodikovo kislino.

Pufrana fiziološka raztopina (TBS- Ca^{2+}), pH 7,4:

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

pH uravnamo z 2 M klorovodikovo kislino.

1 % raztopina BSA/TBS-Ca²⁺:

Pufrana fiziološka raztopina (TBS), pH 7,4

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

Raztopina TBS-Ca²⁺ – 0,05 % Tween:

Pufrana fiziološka raztopina TBS, pH 7,4

0,05 % (v/v) Tween 20

Raztopina je uporabna do enega tedna pri sobni temperaturi oziroma do enega meseca, če je shranjena pri 4 °C.

3.7 LABORATORIJSKA OPREMA IN PRIPOMOČKI

- Analitska tehtnica (Mettler Toledo type PM2500, Mettler Toledo AG, Greifensee, Švica).
- Rotacijsko mešalo (Spectrafuge 24D, Labnet International, ZDA).
- pH meter (Mettler Toledo SevenEasy, Columbus, Ohio, ZDA).
- Ročni spiralnik za mikrotitrne ploščice Nunc-Immuno™ Wash 12, Nunc, Wiesbaden, Germany.
- Magnetno mešalo (IKA[®] RCT basic safety control, IKA[®], Staufen).
- Stresalnik za mikrotitrne plošče (IKA[®] MTS 2/4 digital, IKA[®], Staufen).
- Spektrofotometerski čitalec mikrotitrskih ploščic (Tecan Sunrise, Tecan Austria GMBH, Salzburg).
- Drobn laboratorijski material: pipete, multipipete in nastavki za pipete, plastične kadičke.
- Steklovina: čaše, erlermajerice, merilni valji, stekleničke.

3.8 ENCIMSKO-IMUNSKA METODA NA TRDNEM NOSILCU ZA DOLOČANJE PROTITELES aPS/PT IgA

Encimsko-imunsko metodo za določanje protiteles aPS/PT IgA smo izvajali po protokolu, ki se uporablja v Laboratoriju za imunologijo revmatizma za določanje protiteles aPS/PT izotipov IgG in IgM (52).

Vsako vdolbinico polistirenske mikrotitrne ploščice smo prekrili s 40 μ l raztopine fosfatidilserina v mešanici kloroform/metanol 1:4 (50 mg/l) in inkubirali preko noči v hladnilniku na 4 °C, v temi. Pri tem je kloroform/metanol izhlapel, fosfatidilserin pa je ostal vezan. Drugi dan smo pufre in mikrotitrsko ploščico ogreli na sobno temperaturo. Prosta vezavna mesta smo blokirali s po 150 μ l 1 % pufra BSA/TBS-Ca²⁺ na vdolbinico. Inkubacija pokrite ploščice je potekala eno uro na sobni temperaturi. V tem času smo pripravili redčitve vzorcev, internih standardov, protrombina in pozitivnih ter negativne kontrole, v 1 % pufra BSA/TBS-Ca²⁺. Po končani inkubaciji smo ploščico dvakrat sprali s spiralnim pufrom TBS-Ca²⁺ – 0,05 % Tween 20 in nanесли po 25 μ l protrombina (20 mg/l v 1 % BSA/TBS-Ca²⁺) na vdolbinico, ter takoj nato dodali še po 25 μ l vzorcev redčenih 1:50 v 1 % BSA/TBS-Ca²⁺ na vdolbinico. Pokrito ploščico smo inkubirali eno uro na sobni temperaturi na stresalniku. Sledilo je štirikratno spiranje ploščice s spiralnim pufrom in nanos po 50 μ l na vdolbinico sekundarnih protiteles, konjugiranih z alkalno fosfatazo, predhodno redčenih 1:2000 v 1 % pufra BSA/TBS-Ca²⁺. Pokrito ploščico smo inkubirali pol ure na stresalniku pri sobni temperaturi. Po štirikratnem spiranju s spiralnim pufrom smo nanесли po 100 μ l na vdolbinico substrata para-nitrofenilfosfata v DEA (1 mg/ml). Po petih minutah smo zvezno merili absorbanco s čitalcem mikrotitrskih ploščic, pri valovni dolžini 405 nm in referenčnem filtru 690 nm, toliko časa, dokler nismo dosegli najboljšega približka predhodno ocenjenim referenčnim vrednostim absorbanc internega standarda.

Vse vzorce smo testirali v paralelkah. V eni analizi smo obravnavali 35 vzorcev, ki smo jih izbrali iz vsake skupine bolnikov in krvodajalcev ter jih naključno razporedili na različna mesta na ploščici tekom analiz. Na ta način smo se izognili napakam zaradi robnega učinka in vplivom spiranja zaradi uporabe ročnega spiralnika. V vsaki analizi smo imeli tudi tri paralelke slepih vzorcev z vsemi reagenti, vendar brez preiskovanega seruma. Povprečno absorbanco vseh šestih slepih meritev smo odšteli od vseh meritev vzorcev, standardov in kontrol.

3.9 ENAČBE ZA RAČUNANJE PARAMETROV ZA VREDNOTENJE METODE IN REZULTATOV

Metodo smo ovrednotili z analizo natančnostjo, rezultate pa z diagnostično specifičnostjo, občutljivostjo, pozitivno napovedno vrednostjo in negativno napovedno vrednostjo. Vrednosti vseh omenjenih parametrov smo izračunali s pomočjo naslednjih enačb:

$$\text{Analizna natančnost, KV (\%)} = \frac{SD}{x} \times 100$$

$$\text{Diagnostična občutljivost (\%)} = \frac{\text{resnično pozitivni}}{\text{resnično pozitivni} + \text{lažno negativni}} \times 100$$

$$\text{Diagnostična specifičnost (\%)} = \frac{\text{resnično negativni}}{\text{resnično negativni} + \text{lažno pozitivni}} \times 100$$

$$\text{Pozitivna napovedna vrednost (\%)} = \frac{\text{resnično pozitivni}}{\text{resnično pozitivni} + \text{lažno pozitivni}} \times 100$$

$$\text{Negativna napovedna vrednost (\%)} = \frac{\text{resnično negativni}}{\text{resnično negativni} + \text{lažno negativni}} \times 100$$

3.10 OBDELAVA PODATKOV

Vse rezultate analiz smo vnesli v računalniški program Microsoft Excel 2007.

Koeficienta asimetričnosti in sploščenosti ter Shapiro-Wilkov test smo uporabili za testiranje normalne porazdelitve izmerjenih vrednosti. S koeficientom asimetrije smo preverili porazdelitev spremenljivke, ki je lahko asimetrična v desno (pozitivna asimetrija, vrednost koeficienta > 0), simetrična oz. normalna (vrednost koeficienta $= 0$) ali pa asimetrična v levo (negativna asimetrija, vrednost koeficienta < 0). Vrednost koeficienta, ki je večja od 0,2 kaže na veliko asimetrijo. S koeficientom sploščenosti smo preverili, če se oblika porazdelitve ujema z normalno. Pri normalni porazdelitvi je vrednost koeficienta

sploščenosti enaka nič, sploščena porazdelitev ima negativno vrednost koeficienta, pozitiven koeficient sploščenosti pa je značilen za koničasto porazdelitev.

Pearsonov χ^2 -test je statistični test, s katerim določamo povezanost dveh nominalnih spremenljivk. Z njim smo določili statistično značilne povezave vrednosti protiteles aPS/PT IgA s posameznimi skupinami bolnikov. Razlike so bile statistično značilne, kadar je bila vrednost $p < 0,05$. Vrednosti χ^2 -testa smo izračunali na spletu, s pomočjo predpripravljene kontingenčne tabele (63).

4. REZULTATI

4.1 VALIDACIJA METODE

4.1.1 OBDELAVA MERITEV PO VSAKI IZVEDENI ANALIZI

Pri vsaki analizi smo preverili ustreznost izvedene ELISE aPS/PT. Pri tem smo upoštevali več kriterijev, ki so morali biti izpolnjeni, da so bili rezultati veljavni in analiza zanesljiva:

- Vrednost KV 6 meritev slepega vzorca je morala biti nižja od 12 %.
- Vrednost KV med paralelkami posameznega vzorca je morala biti nižja od 18 %.
- Meritev prve pozitivne kontrole Z 040 (1:4) je morala biti v območju od 110 do 200 mOD .
- Meritev druge pozitivne kontrole T 860 (1:2) je morala biti v območju od 70 do 100 mOD.
- Izmerjena vrednost negativne kontrole je morala biti nižja od 5 arbitrarnih enot za IgA (AUA).
- Posamezna redčitev internega standarda je lahko odstopala od svoje predpisane vrednosti za največ 20%.

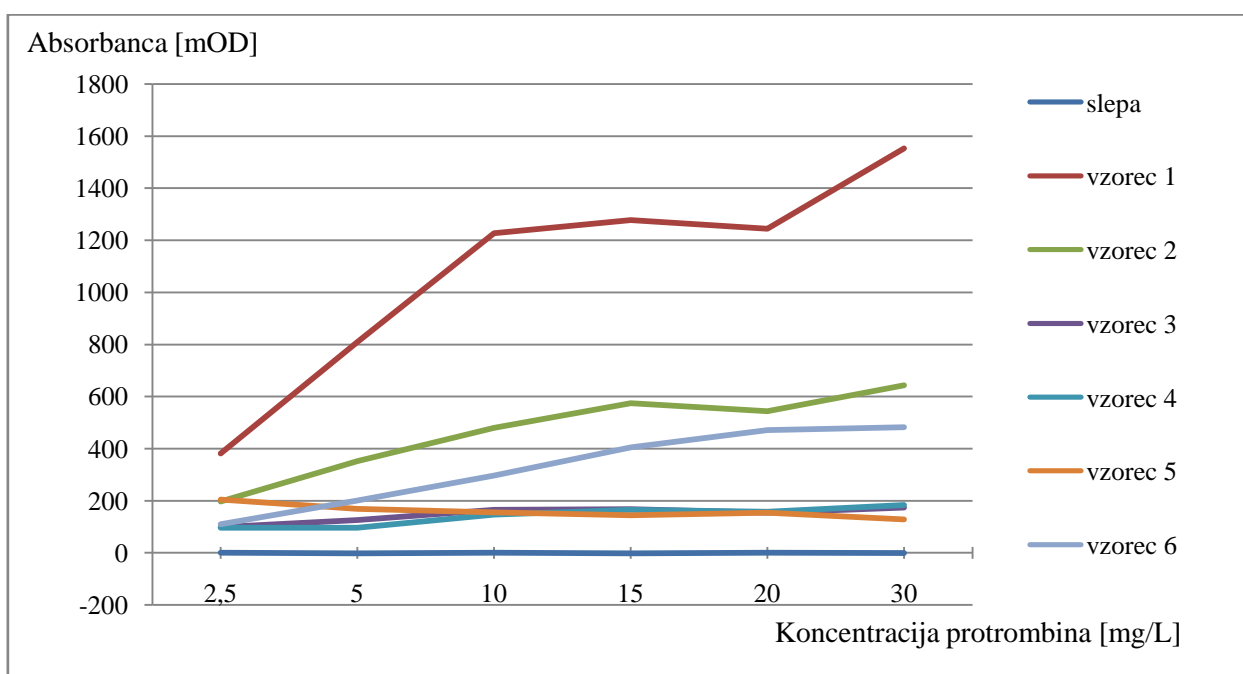
Interval absorbanc za prvo pozitivno kontrolo smo določili na osnovi 22, za drugo pozitivno kontrolo pa na osnovi 19 meritev protiteles aPS/PT IgA. Predpisane vrednosti posamezne redčine internega standarda smo izračunali iz povprečja 22 meritev absorbanc z odštetim ozadjem slepega vzorca.

V primeru višjega odstopanja KV slepih vzorcev smo iz izračuna odstranili do največ dve izstopajoči vrednosti. V nasprotnem primeru pa smo analizo ponovili.

V primeru večjega odstopanja posamezne redčitve internega standarda od predpisane vrednosti, smo iz izračuna grafa umeritvene krivulje izločili največ eno redčitev in tako izničili njen neželeni vpliv. Nato smo vzorce, katerih absorbance so bile v območju izločene redčine internega standarda, ponovno testirali. V kolikor je bilo več meritev redčin internega standarda izven predpisanega območja, pa smo analizo ponovili.

4.1.2 KONCENTRACIJA ANTIGENA

Izbrali smo 6 vzorcev, ki so v predhodnih testiranjih imeli pozitivne vrednosti meritev protiteles aPS/PT IgA, da bi ocenili, pri kateri koncentraciji antigena (Ag), v našem primeru protrombina, dosežemo maksimalno vezavo Ag-PT. Vzorce smo testirali pri šestih različnih koncentracijah protrombina, in sicer: 2,5; 5; 10; 15; 20 in 30 mg/l. Maksimalno vezavo prisotnih protiteles v serumih bolnikov smo izmerili pri koncentraciji 10 mg/l, nadaljnje večanje koncentracije Ag pa je imelo le minimalen vpliv. Koncentracijska krivulja je torej pri omenjeni koncentraciji dosegla plato (Slika 2).

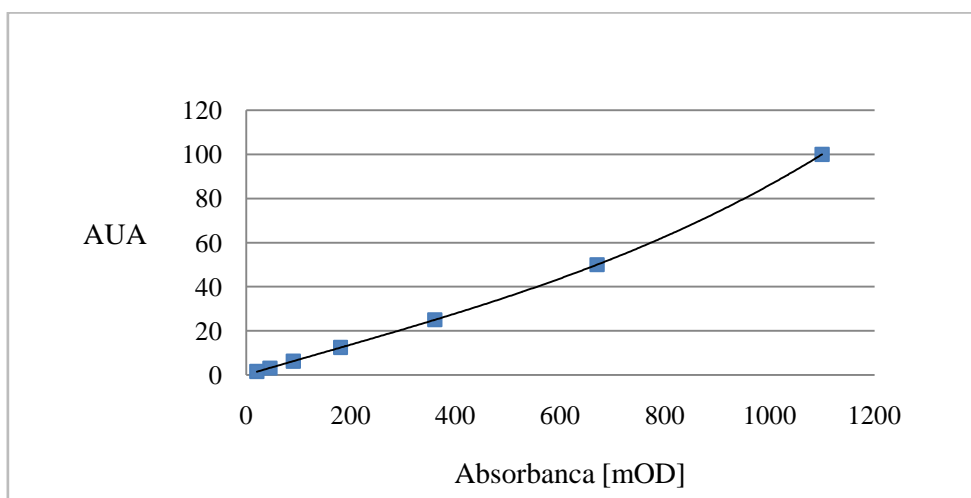


Slika 2: Koncentracijska krivulja za protrombin v testu ELISA aPS/PT IgA.

4.1.3 UMERITVENA KRIVULJA

Vrednost arbitrarnih enot (AUA) protiteles aPS/PT IgA za testirane vzorce smo izračunali z enačbo umeritvene krivulje internega standarda aPS/PT IgA, ki smo jo naredili pri vsaki analizi. Za izdelavo umeritvene krivulje smo izbrani interni standard serijsko redčili 1:2. Tako so bile redčitve internega standarda aPS/PT IgA: 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400 in 1:12800. Izmerjenim absorbancam posameznih redčitev smo predpisali arbitrarne enote, in sicer 1:200 = 100 AUA, 1:400 = 50 AUA, 1:800 = 25 AUA, 1:1600 =

12,5 AUA, 1:3200 = 6,25 AUA, 1:6400 = 3,125 AUA, 1: 12800 = 1,563 AUA. Iz enačbe umeritvene krivulje polinoma tretjega reda, smo nato izračunali arbitrarne enote kontrolnim in testiranim vzorcem, uporabljenim v vsaki posamezni analizi (Slika 3).



Slika 3: Umeritvena krivulja za določanje koncentracije protiteles aPS/PT IgA (Legenda: AUA- arbitrarne enote za imunoglobuline razreda A).

4.1.4 ZNOTRAJANALIZNA NATANČNOST

Znotrajanalizno natančnost smo določili na dva načina. Pri prvem smo v izračun vključili vse analizirane vzorce (N=579), testirane v dvojniku. Vrednosti KV smo izračunali pri vsakem vzorcu posebej, in sicer iz njegovih paralelnih testiranj. Povprečje vrednosti KV vseh vzorcev je bilo 4,4 %.

Pri drugem načinu smo natančnost izračunali na osnovi treh analiz s 16 ponovitvami, in sicer treh izbranih različno pozitivnih vzorcev. Vsak vzorec smo ločeno redčili 16-krat za vsako posamezno analizo, torej skupno v treh analizah 48-krat. Povprečje vrednosti KV vseh treh analiz je predstavljalo znotrajanalizno natančnost. Rezultati so predstavljeni v Preglednici 3.

Preglednica 3: Znotrajanalizna natančnost treh analiz treh izbranih vzorcev.

	KV (%) v 1. analizi	KV (%) v 2. analizi	KV (%) v 3. analizi	Povprečje KV (%) vseh analiz
Vzorec 1	10,6	8,8	6,0	8,5
Vzorec 2	7,0	7,9	10,8	8,6
Vzorec 3	13,8	9,6	11,7	11,7

Legenda: KV-koeficient variabilnosti

Povprečna znotrajanalizna natančnost je bila 9,6%.

4.1.5 MEDANALIZNA NATANČNOST

Medanalizno natančnost smo določili s ponovljivostjo izmerjenih absorbcanc internih standardov in obeh pozitivnih kontrolnih vzorcev, ki smo jih analizirali v vsaki analizi. Iz absorbcanc smo izračunali vrednost KV za vsako redčitev internega standarda in pozitivno kontrolo posebej. Preglednica 4 prikazuje statistične parametre za medanalizno natančnost meritev protiteles aPS/PT IgA. Medanalizna natančnost za protitelesa aPS/PT IgA je bila manjša od 19,4 %.

Preglednica 4: Medanalizna natančnost analize.

VZOREC	POVPREČJE (mOD)	SD	KV (%)	Število ponovitev
IS (1:200)	1112,0	95,5	8,6	22
IS (1: 400)	671,6	48,8	7,3	22
IS (1:800)	355,1	35,2	9,9	22
IS (1:1600)	177,9	16,6	9,3	22
IS (1:3200)	86,6	8,7	10,0	22
IS (1:6400)	42,3	3,5	8,3	22
IS (1:12800)	21,2	2,2	10,5	22
PK1 (1:4)	151,5	29,3	19,4	22
PK2 (1:2)	86,6	10,1	11,6	19

Legenda: IS-interni standard, PK-pozitivna kontrola, SD-standardna deviacija, KV-koeficient variabilnosti

4.1.6 FREKVENČNA PORAZDELITEV IN PRAŽNE VREDNOSTI

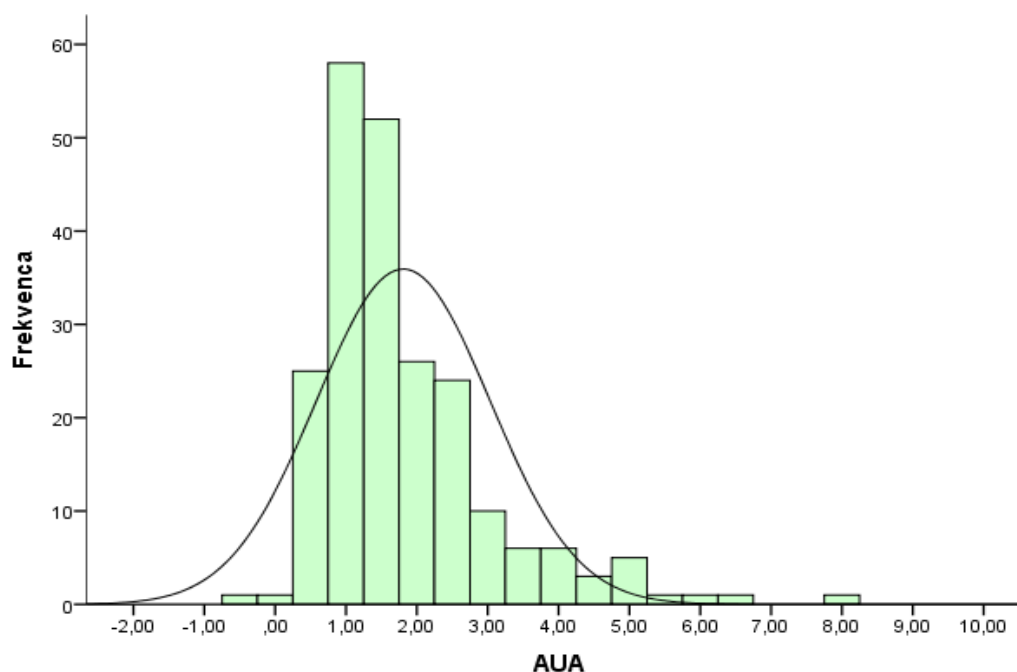
Na podlagi vseh izmerjenih absorbanc in pripadajočih vrednosti AUA serumskih vzorcev 221 krvodajalcev smo izračunali statistične parametre, ki so navedeni v preglednici 5.

Preglednica 5: Statistični parametri vseh izmerjenih absorbanc in vrednosti AUA, določenih z analizo protiteles aPS/PT pri 221 krvodajalcih.

	Vrednosti absorbanc (mOD)	AUA
Povprečje	24,8	1,8
SD	17,4	1,2
Povprečje + 2SD	59,5	4,3
Povprečje + 3SD	76,8	5,5
98. percentil	72,2	5,0
99. percentil	83,0	5,9

Legenda: SD-standardna deviacija, AUA- arbitrarne enote za imunoglobuline razreda A

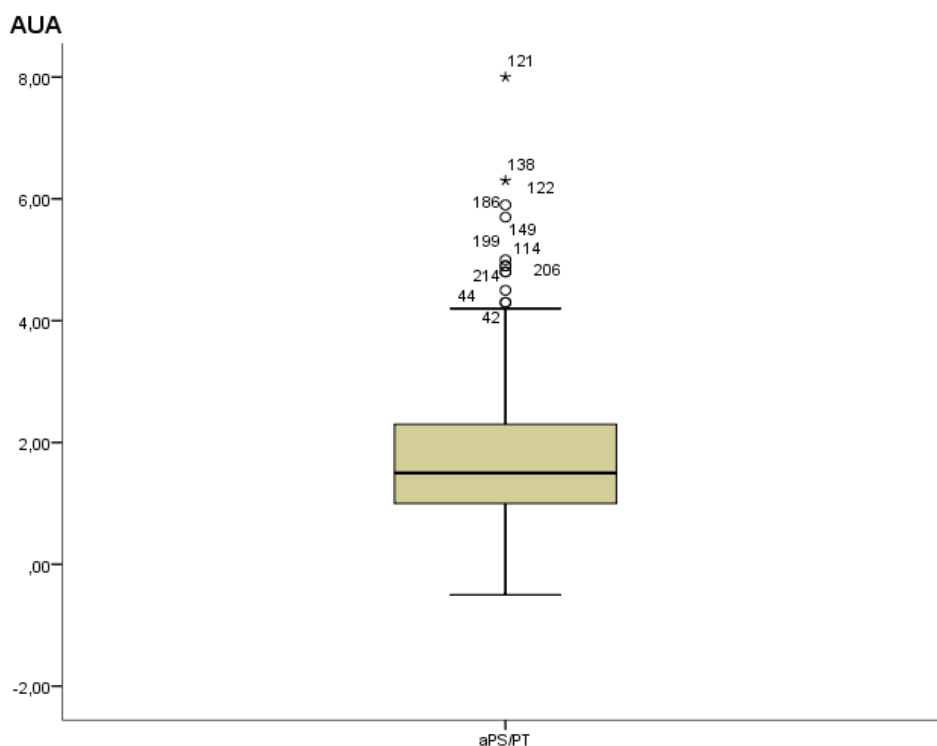
Frekvenčna porazdelitev izmerjenih vrednosti protiteles aPS/PT IgA v serumskih vzorcih 221 krvodajalcev je bila desno asimetrična (Slika 3).



Slika 3: Frekvenčna porazdelitev vrednosti AUA protiteles aPS/PT pri zdravi populaciji (Legenda: širina razreda je 0,5, AUA- arbitrarne enote za imunoglobuline razreda A)

Normalnost porazdelitve izmerjenih vrednosti protiteles aPS/PT IgA smo preverili z določitvijo koeficientov asimetrije in sploščenosti, ter s testom Shapiro-Wilk. Za vrednosti protiteles pri krvodajalcih smo dobili koeficient asimetrije 1,732, ki kaže na desno asimetričnost porazdelitve rezultatov. Koeficient sploščenosti je bil 4,217, kar pomeni, da je porazdelitev vrednosti koničasta. Ničelna hipoteza pri testu Shapiro-Wilk je, da se vrednosti porazdeljujejo normalno. Pri stopnji tveganja $\alpha=0,05$ lahko ničelno hipotezo zavrnamo, ker je bila vrednost p pri testiranju hipoteze manjša od 0,05 ($p<0,001$), s tem pa sprejmemo alternativno hipotezo, ki pravi, da se podatki ne porazdeljujejo normalno.

Iz frekvenčne porazdelitve vrednosti protiteles aPS/PT IgA pri krvodajalcih (Slika 3) lahko razberemo, da je ekstremna le ena vrednost. Pri normalni porazdelitvi predstavljajo osamelce tiste vrednosti, ki so višje ali nižje od povprečja ± 3 standardnih deviacij (61). V našem primeru torej vrednosti protiteles aPS/PT IgA pri krvodajalcih niso normalno porazdeljene, zato smo najprej osamelce poiskali z izrisom kvartilnega diagrama, ki nam je prikazal 2 ekstremni in 7 izstopajočih vrednosti (Slika 4).



Slika 4: Kvartilni diagram, Legenda: ★ - ekstremna vrednost, ○ - izstopajoča vrednost, AUA- arbitrarne enote za imunoglobuline razreda A.

Na drug način smo osamelce določili z modificirano Thompsonovo tehniko τ , in sicer na podlagi absolutnih razlik med povprečno vrednostjo vseh meritev protiteles pri krvodajalcih in vsako posamezno vrednostjo, pri čemer je za vrednosti meritev z največjo absolutno razliko bolj verjetno, da bodo osamelci. Določili smo vrednosti τ ($n=200$) = 1,953 in $\tau *SD = 2,4$, kar pomeni, da razlika večja od 2,4 označuje, da je taka vrednost osamelec (64). Na osnovi tega izračuna smo v testirani skupini določili 12 osamelcev.

Za določitev prazne vrednosti smo v izračunu izločili vrednosti 4 izstopajočih rezultatov meritev protiteles aPS/PT IgA, ki so za več kot 3 SD odstopali od povprečne vrednosti.

Pražno vrednost smo tako določili na osnovi kontrolne skupine, ki je zajemala 217 serumskih vzorcev klinično zdravih krvodajalcev. Pražno vrednost pri merjenju antifosfolipidnih protiteles po priporočilu mednarodno sprejetih klasifikacijskih kriterijev predstavlja 99. percentila, ki je v naših izračunih znašala 4,85 AUA (22). Končnemu izračunu vseh vrednosti AUA smo odšteli 0,35 in s tem pražno vrednost znižali na 4,5 AUA. S tem smo jo poenotili z že validirano encimsko-imunsko metodo za določanje protiteles aPS/PT IgG in IgM (52) (Preglednica 6).

Preglednica 6: Statistični parametri izmerjenih absorbanč in korigiranih vrednosti AUA za protitelesa aPS/PT pri 217 krvodajalcih.

	Vrednosti absorbanč (mOD)	AUA	AUA - 0,35
Povprečje	23,6	1,7	1,4
SD	14,6	1,0	0,7
Povprečje + 2SD	52,9	3,8	3,4
Povprečje + 3SD	67,4	4,8	4,5
98. percentil	64,9	4,7	4,4
99. percentil pražna vrednost	69,5	4,9	4,5

Legenda: SD-standardna deviacija, AUA- arbitrarne enote za imunoglobuline razreda A

4.2 DOLOČANJE PROTITELES aPS/PT IgA V RAZLIČNIH SKUPINAH BOLNIKOV

V skupini 358 preiskovancev smo pozitivne vrednosti protiteles aPS/PT IgA določili pri 70 preiskovancih (19,6 %). Pri 82 bolnikih s primarnim APS smo protitelesa aPS/PT IgA

določili pri 24 (29,3 %), v skupini 37 bolnikov s sekundarnim APS pa pri 20 (54,1 %). Med 135 ženskami z nosečnostnimi zapleti, značilnimi za APS, smo protitelesa aPS/PT IgA določili pri 7 bolnicah (5,2 %). Trinajst od skupno 40 bolnikov s SLE (32,5 %) je bilo pozitivnih na protitelesa aPS/PT IgA. Pri 52 bolnikih z RA smo določili 4 (7,7 %) pozitivne rezultate, v skupini 12 bolnikov z SS pa smo pri 2 (16,7 %) določili protitelesa aPS/PT IgA. Rezultati so prikazali v Preglednici 7.

Preglednica 7: IgA aPS/PT pri bolnikih z APS, SLE, RA, SS in bolnicah z zapleti v nosečnosti.

Protitelesa aPS/PT IgA	Skupine preiskovancev						Skupaj (n=358)
	Primarni APS (n=82)	Sekundarni APS (n=37)	Seronegativni obstetrični APS (n=135)	SLE (n=40)	RA (n=52)	SS (n=12)	
n	24	20	7	13	4	2	70
%	29,3	54,1	5,2	32,5	7,7	16,7	19,6

Legenda: APS-anifosfolipidni sindrom, SLE- sistemski lupus eritematozus, RA-revmatoidni artritis, SS-Sjögrenov sindrom

4.3 DIAGNOSTIČNO VREDNOTENJE REZULTATOV METODE IN χ^2 -TEST

Diagnostično občutljivost, diagnostično specifičnost, pozitivno napovedno vrednost in negativno napovedno vrednost, smo izračunali za štiri skupine bolnikov, in sicer: bolnike z APS, ženske z nosečnostnimi zapleti, značilnimi za APS, bolnike z AT in bolnike z VT. Resnično pozitivne rezultate so predstavljali pozitivni rezultati, določeni pri bolnikih, kjer pričakujemo protitelesa IgA. Resnično negativni rezultati pa so bili negativni rezultati pri kontrolni skupini. Lažno pozitivni rezultati so bili pozitivni rezultati izmerjeni v kontrolni skupini, lažno negativni pa so bilinegativni rezultati pri bolnikih, pri katerih pričakujemo prisotnost protiteles.

Pearsonov χ^2 - test smo uporabili zato, da bi potrdili, ali obstaja statistično značilna povezava med prisotnostjo bolezni in pozitivnimi vrednostmi protiteles aPS/PT IgA.

4.3.1 Diagnostična uporabnost meritev protiteles aPS/PT IgA za APS

Pri izračunu diagnostične specifičnosti in diagnostične občutljivosti ter pozitivne napovedne vrednosti in negativne napovedne vrednosti meritev protiteles aPS/PT IgA smo za kontrolno skupino uporabili bolnike z SLE, RA in SS, ki nimajo APS, bolnice z nosečnostnimi zapleti, ki so bile negativne na kriterijske vrednosti aPL ter krvodajalce.

Preglednica 8: Kontingenčna tabela za izvedbo χ^2 - testa pri 579 preiskovancih.

Rezultat meritev protiteles aPS/PT IgA	APS (+)	APS* (-)	Skupaj
Pozitiven	a= 43	b= 35	a+b= 78
Negativen	c= 76	d= 425	c+d= 501
Skupaj	a+c= 119	b+d= 460	579

* bolniki z SLE, RA, SS, bolnice z nosečnostnimi zapleti, negativne na kriterijske vrednosti aPL in krvodajalci

Legenda: a-resnično pozitivni, b-lažno pozitivni, c-lažno negativni, d-resnično negativni

Vrednost χ^2 - testa znaša 63,573 pri $p < 0,0001$.

$$\text{Občutljivost} = \frac{a}{a+c} = \frac{43}{43+76} \times 100 = 36,1\%$$

$$\text{Specifičnost} = \frac{d}{d+b} = \frac{425}{425+35} \times 100 = 92,4\%$$

$$\text{Pozitivna napovedna vrednost} = \frac{a}{a+b} = \frac{43}{43+35} \times 100 = 55,1\%$$

$$\text{Negativna napovedna vrednost} = \frac{d}{d+c} = \frac{425}{425+76} \times 100 = 84,8\%$$

4.3.2 Bolniki z AT

Pravilno pozitivni rezultati so pozitivni rezultati meritev protiteles aPS/PT IgA pri bolnikih z AT. Kontrolno skupino so predstavljali vsi posamezniki brez AT.

Preglednica 9: Kontingenčna tabela za izvedbo χ^2 - testa pri 581 preiskovancih.

Rezultat meritev protiteles aPS/PT IgA	AT (+)	AT (-)	Skupaj
Pozitiven	a= 20	b= 58	a+b= 78
Negativen	c=29	d= 472	c+d= 501
Skupaj	a+c= 49	b+d= 530	579

Legenda: a-resnično pozitivni, b-lažno pozitivni, c-lažno negativni, d-resnično negativni

Vrednost χ^2 - testa pri $p < 0,0001$ je bila 34,207.

$$\text{Občutljivost} = \frac{a}{a+c} = \frac{20}{20+29} \times 100 = 40,8\%$$

$$\text{Specifičnost} = \frac{d}{d+b} = \frac{472}{472+58} \times 100 = 89,1\%$$

$$\text{Pozitivna napovedna vrednost} = \frac{a}{a+b} = \frac{20}{20+58} \times 100 = 25,6\%$$

$$\text{Negativna napovedna vrednost} = \frac{d}{d+c} = \frac{472}{472+29} \times 100 = 94,2\%$$

4.3.3 Bolniki z VT

Za izračun diagnostičnih parametrov so resnično pozitivne rezultate predstavljali pozitivni rezultati pri bolnikih, ki so doživeli VT, resnično negativni rezultati pa so bili negativni rezultati v kontrolni skupini brez VT. Lažno pozitivni rezultati so bili pozitivni rezultati v kontrolni skupini, lažno negativni rezultati pa negativni rezultati pri bolnikih z VT, kjer dejansko pričakujemo prisotnost protiteles IgA.

Preglednica 10: Kontingenčna tabela za izvedbo χ^2 - testa.

Rezultat meritev protiteles aPS/PT IgA	VT (+)	VT (-)	Skupaj
Pozitiven	a= 24	b= 54	a+b= 78
Negativen	c= 33	d= 468	c+d= 501
Skupaj	a+c= 57	b+d= 522	579

Legenda: a-resnično pozitivni, b-lažno pozitivni, c-lažno negativni, d-resnično negativni

Vrednost χ^2 - testa pri $p < 0,0001$ je bila 41,787.

$$\text{Občutljivost} = \frac{a}{a+c} = \frac{24}{24+33} \times 100 = 42,1\%$$

$$\text{Specifičnost} = \frac{d}{d+b} = \frac{468}{468+54} \times 100 = 89,7\%$$

$$\text{Pozitivna napovedna vrednost} = \frac{a}{a+b} = \frac{24}{24+54} \times 100 = 30,8\%$$

$$\text{Negativna napovedna vrednost} = \frac{d}{d+c} = \frac{468}{468+33} \times 100 = 93,4\%$$

4.3.4 Diagnostična uporabnost meritev protiteles aPS/PT IgA pri ženskah z zapleti v nosečnosti, ki so značilni za APS

Diagnostične parametre smo določili za skupino 400 žensk, med katerimi jih je imelo 188 v preteklosti zaplete v nosečnosti. Preostalih 197 preiskovank, med katerimi so bile tudi krvodajalke, pa takih zapletov ni imelo. Za 15 preiskovank teh podatkov nismo uspeli pridobiti in smo jih zato izključili iz analize.

Preglednica 11: Kontingenčna tabela za izvedbo χ^2 - testa pri 385 ženskah.

Rezultat meritev protiteles aPS/PT IgA	Obstetrične manifestacije (+)	Obstetrične manifestacije (-)	Skupaj
Pozitiven	a= 20	b= 31	a+b= 51
Negativen	c= 168	d= 166	c+d= 334
Skupaj	a+c= 188	b+d= 197	385

Legenda: a-resnično pozitivni, b-lažno pozitivni, c-lažno negativni, d-resnično negativni

- Šest od 63 (9,5 %) žensk s tremi ali več nepojasnjenimi zaporednimi spontanimi splavi pred 10. tednom nosečnosti je imelo pozitivne vrednosti meritev protiteles aPS/PT IgA.
- Dve od 71 (2,8 %) žensk z eno ali več izgubami morfološko normalnega ploda med 10. in 34. tednom nosečnosti je imelo pozitivne vrednosti meritev protiteles aPS/PT IgA.
- Dve od 33 (6,1 %) žensk s prezgodnjim rojstvom morfološko normalnega ploda pred 34. tednom nosečnosti zaradi hujše preeklampsije, eklampsije ali placentalne insuficience sta imeli pozitivne vrednosti meritev protiteles aPS/PT IgA.

Vrednost χ^2 - testa pri $p= 0,1853$ je bila 1,754. Vrednosti meritev protiteles aPS/PT IgA niso bile statistično značilno povezane z zapleti v nosečnosti.

5. RAZPRAVA

V magistrski nalogi smo dokazovali protitelesa aPS/PT IgA pri 579 preiskovancih, in sicer bolnikih z različnimi avtoimunskimi obolenji in pri zdravih posameznikih. Mednarodno sprejete smernice za postavitve diagnoze APS vključujejo prisotnost protiteles aCL, anti- β_2 GPI in LA, ne pa še antiprotrombinskih protiteles aPS/PT, kljub študijam, ki dokazujejo, da so ta tudi povezana s kliničnimi znaki APS (44, 54, 62). Večina dosedanjih študij, ki se nanašajo na določanje antiprotrombinskih protiteles in njihove povezanosti s kliničnimi znaki APS, obravnava le protitelesa razredov IgG in IgM, ne pa tudi IgA. Ker je Žigon s sodelavci že ugotovila, da so protitelesa aPS/PT IgG in IgM povezana z venskimi in ne z arterijskimi trombozami, in da so protitelesa aPS/PT IgG povezana z zapleti v nosečnosti, smo želeli preveriti, ali je prisotnost protiteles aPS/PT IgA povezana s kliničnimi manifestacijami APS in ali lahko z njihovim določanjem prispevamo k diagnostični obravnavi bolnikov s tem sindromom (44). Vsako novo analizno metodo moramo, preden jo sprejememo v rutinsko uporabo, najprej dvostopenjsko ovrednotiti, in sicer tako analizno kot diagnostično. Tako zagotovimo, da je le-ta ustrezna za analizo določenega analita v danem vzorcu in daje zanesljive ter verodostojne rezultate (65).

KONCENTRACIJA ANTIGENA - PROTROMBINA

Na podlagi 6 vzorcev z izmerjenimi vrednostmi protiteles aPS/PT IgA smo določili, da je 10 mg/l protrombina tista koncentracija, pri kateri se vežejo vsa razpoložljiva protitelesa. Ta koncentracija protrombina se je izkazala kot optimalna tudi pri tehniki ELISA za določanje protiteles aPS/PT IgG in IgM (52). Obstajata dva vzroka, zakaj mora biti koncentracija protrombina ravno pravšnja, in sicer, da pri negativnih vzorcih ne prihaja do nespecifične vezave in da imajo pozitivni vzorci na razpolago dovolj antigena. Pri višjih koncentracijah protrombina se izmerjena absorbance pri pozitivnih vzorcih ni več bistveno spremenila. V našem primeru je bila samo pri enem visoko pozitivnem vzorcu vrednost absorbance pri koncentraciji protrombina 30 mg/l za 26 % višja, v primerjavi s tisto pri 10 mg/L. Vzrok za to so lahko nespecifične vezave zaradi kopičenja molekul protrombina oziroma njihovega lepljenja po stenah mikrotitrne ploščice. Pri ostalih vzorcih pa so bila tovrstna nihanja izmerjenih absorbanc pri koncentracijah višjih od 10 mg/l protrombina manjša od 15%, kar je manj od medanalizne variabilnosti. V protokolu, ki ga je prvič opisal Matsuda s sodelavci, sta bili koncentraciji uporabljenega fosfatidilserina (65 mg/l) in protrombina (20 mg/l) višji, medtem ko so v protokolih, ki so jih opisali Atsumi s

sodelavci, Tincani s sodelavci in Žigon s sodelavci, uporabili nižjo koncentracijo fosfatidilserina (50 mg/l) in nižjo koncentracijo protrombina (10 mg/l) (44, 54, 66, 67). Mi smo uporabili fosfatidilserin v koncentraciji 50 mg/l, torej enako kot v primeru določanja protiteles aPS/PT IgG in IgM.

ZNOTRAJANALIZNA IN MEDANALIZNA NATANČNOST

Na končni rezultat laboratorijske analize lahko vplivajo različni dejavniki, npr temperatura, pH pufrov, svetloba, robni pogoji na mikrotitrski ploščici, točnost in natančnost delovanja pipet, časi inkubacij in pipetiranja. Med izvajanjem analize lahko na vsakem koraku pride do napak, kar ima za posledico netočnost in slabo ponovljivost rezultatov. Sprva smo izračunali znotrajanalizno natančnost, in sicer na dva načina, nato pa še medanalizno natančnost. Pri prvem načinu izračuna je povprečje koeficientov variabilnosti paralelnih meritev vseh 579 vzorcev znašalo 4,4 %. Čim manjši je koeficient variacije (KV), tem boljša je ponovljivost. Rezultat, ki smo ga dobili, pomeni dobro znotrajanalizno natančnost. Pri drugem načinu izračuna smo znotrajanalizno variabilnost izračunali na osnovi večkratnih ponovitev 3 vzorcev v 3 analizah, pri čemer smo vsak vzorec analizirali po 16-krat/analizo. V tem primeru je pa bila znotrajanalizna variabilnost višja. Povprečje KV vseh treh analiz je bilo pri prvem vzorcu 8,5 %, pri drugem 8,6 % in pri tretjem 11,7 %. Slabša ponovljivost pri tretjem vzorcu bi lahko bila rezultat variabilnosti samega biološkega materiala. Eksperimentalni rezultati s slabo znotrajanalizno natančnostjo (KV > 10 %) pogosto odražajo neustrezno tehniko pipetiranja (68). Zato je priporočljivo testiranje v paralelkah. To v glavnem velja za ročno izvedbo metode ELISA, medtem ko tehnični napredek z avtomatiziranim pipetiranjem dopušča enkratno testiranje tako za vzorce bolnikov kot za kontrolne vzorce (69).

Iz izmerjenih absorbanč redčin internih standardov in obeh pozitivnih kontrolnih vzorcev, ki smo jih analizirali v vsaki analizi, smo izračunali še medanalizno natančnost. Ponovljivost je bila višja v primerjavi z znotrajanalizno natančnostjo pri prvem načinu izračuna, v primerjavi z znotrajanalizno natančnostjo določano z drugim načinom izračuna pa je bila primerljiva. Povprečje KV vseh redčin internega standarda pri vseh analizah je bilo v intervalu 7,3 % do 10,5 %. Povprečje KV pozitivnega kontrolnega vzorca PK1 je znašalo 19,4 %, tisto za PK2 pa 11,6 %. Pri posameznih redčinah internega standarda smo izmerili za 8,9 % nižjo medanalizno ponovljivost rezultatov kot pri vzorcu, izbranem za

prvo pozitivno kontrolno (PK1) ter za 1,1 % nižjo pri drugem kontrolnem vzorcu (PK2). Pozitivni kontrolni vzorec je bil serum bolnika z avtoimunsko boleznijo, pri čemer bi bil vzrok za večjo variabilnost lahko v rokovanju z vzorcem (dalj časa na sobni temperaturi, večkratno zamrzovanje in odtaljevanje). Medanalizna natančnost ročno opravljenih testov ELISA bi morala biti $< 20\%$, oz $< 15\%$, za avtomatizirane sisteme pa se priporoča $< 10\%$ (69). Medanalizna natančnost je bila v našem primeru dobra, saj so bile vse povprečne vrednosti KV $< 20\%$. Avtomatizacija pa seveda lahko izboljša ponovljivost in zmanjša medlaboratorijsko variabilnost znotraj posamezne analizne metode (69).

PRAŽNE VREDNOSTI

Idealen diagnostični test s pozitivnimi rezultati zazna samo bolne posameznike, vendar pa v realnosti ni vse tako popolno, saj kot pozitivne lahko zaznamo tudi zdrave posameznike ter obratno, torej kot negativne tudi bolne posameznike. Ravno zaradi prekrivanja porazdelitev rezultatov med zdravimi in bolnimi, je ena od glavnih nalog pri izvajanju testov ELISA določitev prazne vrednosti, ki še razlikuje pozitivne rezultate od negativnih. Da dosežemo najboljše rezultate testa, moramo izbrati prazne vrednosti kompromisno, to pa ima lahko za posledico lažno negativne in lažno pozitivne rezultate in s tem negativne vplive na diagnostično občutljivost in specifičnost testa. Pri postavitvi prazne vrednosti moramo imeti v mislih, da so testi z visoko diagnostično specifičnostjo in posledično nižjo občutljivostjo pomembni za potritev diagnoze. V tem primeru se želimo znebiti lažno pozitivnih rezultatov, saj bi napačna postavitev diagnoze in posledično neprimerno zdravljenje imelo velik negativen vpliv na bolnika. V nasprotnem primeru pa predvsem takrat, ko izbiramo presejalne test in želimo imeti čim manj lažno negativnih rezultatov, postavimo nižjo prazno vrednost ter s tem povečamo diagnostično občutljivost testa.

Za razliko od komercialno dostopnih analiznih kompletov proizvajalcev, je pri hišnih metodah nujno potrebno določiti prazno vrednost. Da določimo zanesljive prazne vrednosti in z gotovostjo interpretiramo dobljene rezultate analize, pa potrebujemo zadostno število zdravih prostovoljcev. Za matematično določitev prazne vrednosti je potrebnih najmanj 120 zdravih krvodajalcev (69). Evropski forum za antifosfolipidna protitelesa je predlagal, da naj vsak laboratorij za določitev svoje prazne vrednosti analizira vsaj 50 ali optimalno 100 vzorcev zdravih oseb, ki se po možnosti glede starosti in spola ujemajo s preiskovano populacijo bolnikov (70). Mi smo se odločili za analizo 221 vzorcev krvodajalcev. Glede

povprečne starosti so bili ti podobni preiskovani skupini, glede spola pa ne, saj je bilo med njimi več moških kot žensk, in sicer zaradi dejstva, da kri daruje več moških kot žensk.

Nivoje protiteles aPS/PT IgA smo izrazili v arbitrarnih enotah (AUA), izračunanih iz absorbanc serijsko redčenega internega standarda aPS/PT IgA, na podlagi enačbe umeritvene krivulje internega standarda. Ker smo rezultate meritev podajali v AUA, so bili rezultati med posameznimi analizami bolj primerljivi.

Pri postopku določitve prazne vrednosti smo najprej iz vrednosti absorbanc in AUA zdravih krvodajalcev izračunali statistične parametre, med njimi srednjo vrednost in SD za primer, če bi se spremenljivka porazdeljevala normalno ter percentile, v kolikor njena porazdelitev ne bi bila normalna. Nato smo izrisali histogram za vrednosti protiteles aPS/PT IgA krvodajalcev. Ta je imel desno asimetrično obliko. S Shapiro-Wilkovim testom ter z merami sploščenosti in simetrije smo nato statistično dokazali, da se vrednosti protiteles aPS/PT IgA pri krvodajalcih ne porazdeljujejo normalno. Koeficient asimetrije je potrdil asimetričnost v desno, koeficient sploščenosti pa koničasto porazdelitev vrednosti AUA.

Nadalje smo pogledali, ali so bile med vrednostmi AUA krvodajalcev morebitni osamelci. Osamelci so po definiciji neobičajno visoke in/ali nizke vrednosti. Odkrivanje prisotnosti osamelcev pri pridobivanju podatkov je pomembno, saj imajo ti lahko močan vpliv na statistične parametre, kar lahko vodi do napačnih zaključkov in nepravilnih napovedi rezultatov (64). Na podlagi kvantilnega diagrama in modificirane Thompsonove τ tehnike smo potrdili obstoj ekstremno visokih vrednosti AUA. Kvantilni diagram je prikazal 2 ekstremni in 7 izstopajočih vrednosti, modificirana Thompsonova τ tehnika pa 12 ekstremnih vrednosti. Za določitev prazne vrednosti smo zato iz izračuna izločili 4 ekstremne vrednosti AUA aPS/PT IgA, ki so tudi za več kot 3 SD odstopale od povprečne vrednosti. Za nastanek osamelcev obstaja več razlogov. Nekateri osamelci so lahko posledica napak med vzorčenjem, pripravo in analizo vzorca (71). Možno je tudi, da je prišlo do napak in zamenjav med samim vzorčenjem. Vse vzorce pa smo analizirali v paralelkah in upoštevali, da je bil KV med paralelkami manjši od 18 %. V kolikor ni nobenega razloga za to, da bi bil osamelec posledica analizne napake, pa moramo razmisliti o možnosti, da oseba ne pripada ciljni populaciji (71). Poleg tehničnih poznamo tudi biološke razloge, ki se kažejo v obliki naravnih odstopanj znotraj populacije (72).

Poleg krvodajalcev z izločenimi vrednostmi sta imela še dva krvodajalca nepričakovan pozitiven rezultat določanja protiteles aPS/PT IgA. Pozitivne rezultate smo dobili pri dveh krvodajalkah starih 35 in 37 let in štirih krvodajalcih starih od 47 do 62 let. Avtoprotitelesa so lahko prisotna celo v serumu navidezno zdravih posameznikov in to celo več let, preden se bolezen klinično izrazi (73, 74). Razširjenost antifosfolipidnim protiteles pri zdravih krvodajalcih je 10 % in se s starostjo poveča za 1 do 5 % (75). Na razširjenost antifosfolipidnih protiteles vplivajo še različne avtoimunske, revmatične ali druge kronične vnetne bolezni, okužbe in določena zdravila (76). Pozitivnost v teh pogojih običajno izvira iz nizkih titrov protiteles razreda IgM in ni povezana s trombozami ali neugodnimi izidi v nosečnosti. Njihova stalna pozitivnost pa je sicer redka, saj so le trajno prisotna antifosfolipidna protitelesa klinično pomembna. V študiji, v kateri je sodelovalo 552 zdravih krvodajalcev, jih je 6,5 % imelo protitelesa aCL razreda IgG, po devetih mesecih pa jih je manj kot 2% še vedno izkazovalo povečane titre (11). Avčin in sodelavci so prav tako odkrili prisotnost nizkih titrov protiteles aCL in anti- β_2 GPI v serumih klinično zdravih otrok (77). Kot velja za večino avtoprotiteles, so tudi antifosfolipidna protitelesa pogostejša v starejši populaciji. V kolikor visoki titri antifosfolipidnih protiteles pri starejših posameznikih niso povezani s klinično izraženo boleznijo, je njihova prisotnost povezana z biološkim staranjem imunskega sistema (77).

Po tem, ko smo izločili ekstremne vrednosti, smo ponovno izračunali statistične parametre za kontrolno skupino, ki je na koncu obsegala 217 serumskih vzorcev krvodajalcev. Kljub temu, da se rezultati ne porazdeljujejo normalno, nekateri laboratoriji, kot tudi proizvajalci analiznih kompletov za izračun prazne vrednosti še vedno uporabljajo aritmetično sredino in določeno število vrednosti SD (70). Po priporočilih mednarodno sprejetih smernic za klasifikacijo APS naj bi se za določitev prazne vrednosti upošteval 99. percentil, kar smo upoštevali tudi mi (22). Evropski forum za antifosfolipidna protitelesa navaja zahteve za zmanjšanje medlaboratorijske variabilnosti, med katerimi je tudi ta, da naj se prazne vrednosti računajo v percentilih. Uporaba percentilov je obvezna tako za protitelesa aCL kot tudi anti- β_2 GPI (70). Naša prazna vrednost je bila 4,85 AUA, nato pa smo vsem vrednostim AUA odšteli vrednost 0,35 in jo s tem poenotili s prazno vrednostjo že validirane encimsko-immunske metode za določanje protiteles aPS/PT IgG in IgM (52). Vrednosti višje od 4,5 AUA so tako predstavljale pozitiven rezultat.

DOLOČANJE PROTITELES aPS/PT IgA PRI RAZLIČNIH SKUPINAH BOLNIKOV

Analizirali smo 223 serumskih vzorcev preiskovancev z vnetno revmatično boleznijo, od tega jih je imelo 82 diagnosticiran primarni APS, 37 sekundarni APS, 40 SLE, 52 RA in 12 SS. Preiskali smo tudi 135 bolnic z zapleti, značilnimi za APS. Protitelesa aPS/PT IgA je imelo 19,6 % preiskovancev. V skupini bolnikov s primarnim APS jih je bilo pozitivnih 29,3 %, v skupini s sekundarnim APS pa 54,1 %. Protitelesa IgA smo določili pri 32,5 % bolnikih s SLE, 7,7 % pri bolnikih z RA in 16,7 % med bolniki s SS. V skupini žensk z nosečnostnimi zapleti, značilnimi za APS, smo pozitivne rezultate testa na prisotnost protiteles aPS/PT IgA določili pri 5,2 % bolnic. Antifosfolipidna protitelesa zasledimo tako pri APS kot tudi pri drugih avtoimunskih obolenjih. Njihova razširjenost pri bolnikih z RA je med 5 in 75 %, pri bolnikih s SLE pa med 30 in 50 % (75). V študiji, v okviru katere so ugotavljali razširjenost antifosfolipidnih protiteles (aCL, anti- β_2 GPI in LA) pri bolnikih s SS, so ugotovili, da so ta protitelesa prisotna pri 30 % pacientih, vendar pa so bili titri običajno nizki (78).

Na osnovi rezultatov, ki jih je objavila avtorica Kikelj v svoji diplomski nalogi, smo v 26 vzorcih, sicer negativnih na protitelesa aPS/PT IgG in IgM, določili aPS/PT IgA (79). Med njimi so bili 3 iz skupine bolnikov s primarnim APS, 1 iz skupine s sekundarnim APS, 7 jih je pripadalo bolnikom s SLE, 3 skupini z RA, 2 bolnikom d SS, 4 pa bolnicam z zapleti v nosečnost ter 6 zdravim krvodajalcem.

DIAGNOSTIČNO VREDNOTENJE REZULTATOV IN χ^2 -TEST

Rezultati pri bolnikih z APS so pokazali, da je diagnostična občutljivost rezultatov določanja protiteles aPS/PT IgA za APS 36,1 %, diagnostična specifičnost 92,4 %, pozitivna napovedna vrednost 55,1 % in negativna napovedna vrednost 84,8 %. Pričakovano pozitivne rezultate so predstavljali bolniki z APS. Kontrolno skupino so sestavljali klinično zdravi krvodajalci in bolniki z drugimi avtoimunskimi boleznimi, ki nimajo APS (SLE, RA in SS). Naše rezultate smo primerjali z izsledki že omenjene diplomske naloge, ki je bila narejena leta 2010 (79). V njej so določali protitelesa aPS/PT IgG in IgM z encimsko-immunsko metodo na trdnem nosilcu. Njihovi rezultati so pri bolnikih z APS pokazali, da je bila diagnostična občutljivost 60 %, diagnostična specifičnost 93 %, pozitivna napovedna vrednost 73,8 % in negativna napovedna vrednost 88,4 %, pri čemer je pozitiven rezultat predstavljal prisotnost protiteles IgG in/ali IgM

(79). Rezultati so bili za vse diagnostične parametre višji od naših, kar lahko razložimo s tem, da so protitelesa razredov IgG in IgM pri avtoimunskih obolenjih pogostejša kot IgA.

S testom χ^2 smo potrdili, da se bolniki z APS in bolniki z drugimi avtoimunskimi boleznimi ter krvodajalci med seboj pomembno razlikujejo glede prisotnosti protiteles aPS/PT IgA, pri $p < 0,0001$. V prej omenjeni diplomski nalogi so enako dokazali tudi za protitelesa aPS/PT IgG in IgM (79).

V skupini bolnikov z arterijskimi trombozami so pravilno pozitivne rezultate predstavljali serumski bolnikov z AT, ki so vsebovali protitelesa aPS/PT IgA. Resnično negativni rezultati pa so bili tisti pri bolnikih brez AT in brez prisotnosti protiteles. Za dobljene rezultate je diagnostična občutljivost znašala 40,8 %, diagnostična specifičnost 89,1 %, pozitivna napovedna vrednost 25,6 % in negativna napovedna vrednost 94,2 %. S testom χ^2 smo ugotovili statistično značilne razlike med dvema skupinama, in sicer med bolniki z AT in bolniki brez AT, glede na nivoje protiteles, in sicer pri $p < 0,0001$.

Diagnostične parametre smo izračunali tudi na podlagi rezultatov, izmerjenih v skupini bolnikov z VT. V tem primeru je bila diagnostična občutljivost 42,1 %, diagnostična specifičnost 89,7 %, pozitivna napovedna vrednost 30,8 % in negativna napovedna vrednost 93,4 %. S testom χ^2 smo potrdili, da obstaja statistično značilna povezava glede prisotnosti protiteles aPS/PT IgA med bolniki z VT in tistimi brez VT, in sicer pri vrednosti $p < 0,0001$.

Pri ženskah, ki so imele zaplete v nosečnosti, nismo potrdili statistično pomembne povezave med obstetričnimi komplikacijami in prisotnostjo protiteles aPS/PT razreda A, kar pomeni, da ženske s prisotnimi obstetričnimi komplikacijami niso imele pogosteje prisotnih omenjenih protiteles v primerjevi z ženskami brez tovrstnih zapletov.

Glede na klinične kriterije za APS, ki so povezani z ginekološkimi zapleti in jih je opredelil Miyakis, smo v naši študiji določili pozitivne vrednosti protiteles aPS/PT IgA pri 6/63 (9,5 %) žensk s tremi ali več nepojasnjenimi zaporednimi spontanimi splavi pred 10. tednom nosečnosti, pri 2/71 (2,8 %) žensk z eno ali več izgubami morfološko normalnega ploda med 10. in 34. tednom nosečnosti in pri 2/33 (6,1 %) žensk s prezgodnjim rojstvom morfološko normalnega ploda pred 34. tednom nosečnosti zaradi hujše preeklampsije, eklampsije ali placentalne insuficience (22).

Laboratorijska medicina igra izjemno pomembno vlogo pri diagnosticiranju, prognozi, zdravljenju in obvladovanju bolezni. Pravilna izbira in interpretacija laboratorijskih testov je ključnega pomena za kakovostno oskrbo bolnika. Pomembno je, da laboratorij sprejme v uporabo zelo občutljive in specifične teste za odkrivanje specifičnih protiteles in tako pripomore k ustreznemu zdravljenju bolnikov z APS ter preprečevanju ginekoloških zapletov pri nosečnicah.

6. SKLEP

- Na osnovi rezultatov smo potrdili, da je metoda ELISA za določanje protiteles aPS/PT IgA zadovoljivo natančna.
- Na podlagi 99. percentila smo določili prazno vrednost detekcije protiteles, ki je bila 4,5 AUA.
- Prevalenca protiteles aPS/PT IgA v skupini 358 preiskovancev z različnimi avtoimunskimi boleznimi je bila 19,6 %.
- Pri 82 bolnikih s primarnim APS je bila prevalenca protiteles aPS/PT IgA 29,3 %, v skupini 37 bolnikov s sekundarnim APS pa 54,1 %. Med 135 ženskami z nosečnostnimi zapleti, značilnimi za APS, smo protiteles aPS/PT IgA določili pri 5,2 %. Pri 40 bolnikih s SLE je bila prevalenca protiteles aPS/PT IgA 32,5 %, pri 52 bolnikih z RA 7,7 % in pri 12 bolnikih s SS 16,7 %.
- Potrdili smo, da so pri bolnikih z APS v primerjavi s kontrolno skupino statistično značilno pogosteje prisotna protitelesa aPS/PT IgA ($p < 0,0001$).
- Potrdili smo tudi, da obstaja statistično značilna povezava med prisotnostjo VT in pozitivnimi vrednostmi aPS/PT IgA ($p < 0,0001$), ter med prisotnostjo AT in pozitivnimi vrednostmi aPS/PT IgA ($p < 0,0001$).
- Protitelesa aPS/PT IgA se statistično značilno ne razlikujejo pri ženskah s prisotnimi obstetričnimi zapleti in pri ženskah brez njih.
- Protitelesa aPS/PT IgA so visoko diagnostično specifična za APS (89 %).

7. LITERATURA

1. Delves PJ, Martin SJ. Antibodies. In: Delves PJ, Martin SJ, Burton DR, Roitt IM (eds.). *Roitt's essential immunology*. Blackwell Science, Oxford, 2011: 53–78.
2. Vozelj M. Zgradba in funkcija protiteles. V: Vozelj M (ed.). *Temelji imunologije*. Državna založba Slovenije, Ljubljana, 2000: 47–74.
3. Božič B, Mlinarič Raščan I. Imunologija v farmaciji – študijsko gradivo. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2008: 42–53.
4. Vozelj M. Imunska toleranca in avtoimunost. V: Vozelj M (ed.). *Temelji imunologije*. Državna založba Slovenije, Ljubljana, 2000: 275–303.
5. Delves PJ, Martin SJ. Autoimmune diseases In: Delves PJ, Martin SJ, Burton DR, Roitt IM (eds.). *Roitt's essential immunology*. Blackwell Science, Oxford, 2011: 475–510.
6. Ješe R, Tomšič M. Vnetne revmatične bolezni. *Farmaceutski vestnik* 2013; 64 (4): 267–271.
7. Hughes GRV, Khamashta MA. Seronegative antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis* 2003; 62: 1127.
8. Khamashta MA. Hughes Syndrome: History. In: Khamashta MA (ed.). *Hughes' syndrome: antiphospholipid syndrome*. London, Springer, 2000: 3–7.
9. Rand JH, Wolgast LR. Dos and don'ts in diagnosing antiphospholipid syndrome. *Hematology Am Soc Hematol Educ program* 2012; 2012: 455–459.
10. Keswani SC, Chauhan N. Antiphospholipid syndrome. *Soc Med* 2002; 95(7): 336–342.
11. Cohen D, Berger SP, Steup-Beekman GM, et. al. Diagnosis and management of the antiphospholipid syndrome. *BMJ* 2010; 340: 2541.
12. Galli M, Barbui T. Antiprothrombin Antibodies: detection and Clinical Significance in the Antiphospholipid Syndrome. *Blood* 1999; 93: 2149–2157.
13. Piette JC, Cacoub P. Antiphospholipid Syndrome in the Elderly: caution. *Journal of the American Heart Association* 1998; 97: 2195–2196.
14. Gladd DA, Olech E. Antiphospholipid antibodies in rheumatoid arthritis: identifying the dominoes. *Current Rheumatology Reports* 2009; 11(1): 43-51.
15. Guerin J, Smith O, White B, et.al. Antibodies to prothrombin in antiphospholipid syndrome and inflammatory disorders. *Br J Haematol* 1998; 102: 896.

16. Asherson RA, Cervera R, de Groot PG, et.al. Catastrophic antiphospholipid syndrome: international consensus statement on classification criteria and treatment guidelines. *Lupus* 2003; 12: 530–534.
17. Espinosa G, Cervera R. Clinical Management of Antiphospholipid Syndrome-Related Thrombosis. *Open Autoimmun J* 2010; 2: 67–75.
18. Gray JM, Khamashta MA. Antiphospholipid syndrome: coming of age. *Reumatol Clin* 2011; 7(3): 151–153.
19. Landenberg von P, Rodriguez-Gracia JL, Khamashta MA. The antiphospholipid syndrome. In: Shoenfeld Y, Meroni PL (eds). *The general practice guide to autoimmune diseases*. Lengerich,: Pabst Science Publishers, 2012: 55–62.
20. Cervera R, Piette JC, Font J, et al. Antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1000 patients. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 1019–27.
21. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, et.al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum* 1999; 42 (7): 1309–1311.
22. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, et.al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006; 4: 295–306.
23. Brandt JT, Triplett DA, Alving B, Scharrer I. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. On behalf of the Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the ISTH. *Thromb Haemost* 1995; 74 (4): 1185-90.
24. de Laat B, Mertens K, de Groot PG. Mechanisms of disease: antiphospholipid antibodies-from clinical association to pathological mechanism. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2008; 4: 192–199.
25. Amengual O, Atsumi T, Koike T: Specificities, Properties, and Clinical Significance of Antiprothrombin Antibodies. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 886–895.
26. Oosting JD, Derksen RHW, Bobbink IWG, et.al. Antiphospholipid antibodies directed against a combination of phospholipid with prothrombin, protein C or protein S: an explanation for their pathogenetic mechanism? *Blood* 1993; 81 (10): 2618–2625.
27. Pechlaner C. Antiphospholipid syndrome. What benefit has the label? *BMJ* 2010; 340: 2983.

28. Galli M, Barbui T. Prevalence of Different Anti-Phospholipid Antibodies in Systemic Lupus Erythematosus and Their Relationship with the Antiphospholipid Syndrome. *Clin Chem* 2001; 47 (6): 985–987.
29. Forastiero R. Antigen Specificity of Antiphospholipid Syndrome- Related Antiphospholipid Antibodies. *Open Autoimmun J* 2010; 2: 21–27.
30. Fleck R, Rapaport S, Rao L. Antiprothrombin antibodies and the lupus anticoagulant. *Blood* 1988; 72 (2): 512–519.
31. Mackworth-Young CG. Antiphospholipid syndrome: multiple mechanisms. *Clin Exp Immunol* 2004; 136 (3): 393–401.
32. Merrill JT. Which antiphospholipid antibody tests are most useful? *Rheum Dis Clin North Am* 2001; 27 (3): 525–549.
33. Bertolaccini ML. Antibodies to prothrombin. *Lupus* 2012; 21 (7): 729–731.
34. Amengual O, Atsumi T, Koike T: Antiprothrombin antibodies and the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Clin Immunol* 2004; 112 (2): 144–149.
35. Rao LV, Hoang AD, Rapaport SI. Mechanism and effects of the binding of lupus anticoagulant IgG and prothrombin to surface phospholipid. *Blood* 1996; 88 (11): 4173–4182.
36. Bajaj SP, Rapaport SI, Fierer DS, et.al. A mechanism for the hypoprothrombinemia of the acquired hypoprothrombinemia-lupus anticoagulant syndrome. *Blood* 1983; 61 (4): 684–692.
37. Donohoe S, Ian J. Mackie IJ, Isenberg D, Machin SJ. Anti-prothrombin antibodies: assay conditions and clinical associations in the anti-phospholipid syndrome. *Br J Haematol* 2001; 113 (2): 544–549.
38. Edson JR, Vogt JM, Hasegawa DK. Abnormal prothrombin crossed immunoelectrophoresis in patients with lupus inhibitor. *Blood* 1984; 64 (4): 807–816.
39. Sakai Y, Atsumi T, Ieko M, et.al. The effects of phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibody on thrombin generation. *Arthritis Rheum* 2009; 60 (8): 2457–2467.
40. Permpikul P, Rao LV, Rapaport SI. Functional and binding studies of the roles of prothrombin and 2- lycoprotein I in the expression of lupus anticoagulant activity. *Blood* 1994; 83 (10):2878–92.

41. Pierangeli SS, Goldsmith GH, Branch DW, Harris EN. Antiphospholipid antibody: functional specificity for inhibition of prothrombin activation by the prothrombinase complex. *Br J Haematol.* 1997; 97 (4): 768–74.
42. Simmelink MJ, Horbach DA, Derksen RH, Meijers JC, Bevers EM, Willems GM, et al. Complexes of anti-prothrombin antibodies and prothrombin cause lupus anticoagulant activity by competing with the binding of clotting factors for catalytic phospholipid surfaces. *Br J Haematol.* 2001; 113 (3): 621–619.
43. Akimoto T, Akama T, Kono I, Sumida T. Relationship between clinical features and binding domains of anti-prothrombin autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. *Lupus* 1999; 8(9): 761–766.
44. Žigon P, Čučnik S, Ambrožič A, et.al. Detection of antiphosphatidylserine/prothrombin antibodies and their potential diagnostic value. *Clin Dev Immunol* 2013; 2013: 1–7.
45. Tsutsumi A, Hayashi T, Chino Y, et.al. Significance of antiprothrombin antibodies in patients with systemic lupus erythematosus: clinical evaluation of the antiprothrombin assay and the antiphosphatidylserine/prothrombin assay, and comparison with other antiphospholipid antibody assays. *Mod Rheumatol* 2006; 16 (3): 158–164.
46. Galli M, Barbui T. Antiprothrombin Antibodies: Detection and Clinical Significance in the Antiphospholipid Syndrome. *Blood* 1999; 93 (7): 2149–2157.
47. Arvieux J, Darnige L, Caron C, Reber G, Bensa JC, Colomb MG. Development of an ELISA for autoantibodies to prothrombin showing their prevalence in patients with lupus anticoagulant. *Thromb Haemost* 1995; 74 (4): 1120–1125.
48. Atsumi T, Koike T. Antiprothrombin antibody: why do we need more assays? *Lupus* 2010; 19 (4): 436–9.
49. Kotnik V. *Imunološki priročnik*. Ljubljana: Univerza v Ljubljani Medicinska fakulteta–Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, 2010: 120–139.
50. Galli M, Beretta G, Daldossi M, Bevers EM, Barbui T: Different anticoagulant and immunological properties of anti-prothrombin antibodies in patients with antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* 1997; 77 (3): 486–491.
51. Pengo V, Biasiolo A, Brocco T, Tonetto S, Ruffatti A. Autoantibodies to phospholipid-binding plasma proteins in patients with thrombosis and phospholipid-reactive antibodies. *Thromb Haemost* 1996; 75 (5): 721–725.
52. Žigon P, Ambrožič A, Čučnik S, et.al. Modified phosphatidylserine-dependent antithrombin ELISA enables identification of patients negative for other

- antiphospholipid antibodies and also detects low avidity antibodies. *Clin Chem Lab Med* 2011; 49 (6): 1011–1018.
53. Žigon P, Čučnik S, Ambrožič A, et.al. Antibodies to phosphatidylserine/prothrombin complex as an additional diagnostic marker of APS? *Lupus* 2012; 21 (7): 790–792.
54. Atsumi T, Ieko M, Bertolaccini ML, et.al. Association of autoantibodies against the phosphatidylserine-prothrombin complex with manifestations of the antiphospholipid syndrome and with the presence of lupus anticoagulant. *Arthritis Rheum* 2000; 43 (9): 1982–1993.
55. Huber L. Parameters and Tests for Method Validation. In: Huber L (ed.). *Validation of Analytical Methods*. Agilent Technologies, Germany, 2010: 13–28.
56. Jacobson RH. Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases. *OIE Terrestrial Manual*; 2013: 1–17.
57. Marc J. Navodila in dnevnikih za vaje iz klinične biokemije I. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2008: 33–35.
58. Saah AJ, Hoover DR. “Sensitivity” and “specificity” reconsidered: the meaning of these terms in analytical and diagnostic settings. *Ann Intern Med* 1997; 126 (1): 91–94.
59. Lalkhen AG, McCluskey A. Clinical tests: sensitivity and specificity. *CEACCP* 2008; 8 (6): 221–223.
60. Altman DG, Bland JM. Diagnostic tests 2: predictive values. *BMJ* 1994; 309: 102.
61. Doi SAR. Using and interpreting diagnostic tests with quantitative results. In: Doi SAR, Williams GM (ed.). *Methods of Clinical Epidemiology*. London, Springer, 2013: 67–78.
62. Sciascia S, Sanna G, Murru V, Roccatello D, Khamashta MA, Bertolaccini ML. Anti-prothrombin (aPT) and anti-phosphatidylserine/prothrombin (aPS/PT) antibodies and the risk of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. A systematic review. *Thromb Haemost.* 2013; 111 (2): 354–364.
63. <http://graphpad.com/quickcalcs/contingency1.cfm> (6.1.2015)
64. Anbarasi MS, et.al. Outlier Detection for Multidimensional Medical Data. *IJCSIT* 2011; 2 (1): 512–516.
65. Linet K, Boyd JC. Selection and analytical evaluation of methods. In: Scott MG, Gronowski AM, Eby CS (eds.). *Tietz’s applied laboratory medicine*. Hoboken, Wiley-Interscience, 2007: 353–403.

66. Matsuda J, Sanaka T, Nishizawa A, Gotoh M, Gohchi K. Two antiprothrombin antibodies against prothrombin and prothrombin-phosphatidyl serine show partial but not total identity. *Blood Coagul and Fibrinolysis* 2002; 13 (8): 697–702.
67. Tincani A, Morozzi G, Afeltra A, et al. Antiprothrombin antibodies: a comparative analysis of homemade and commercial methods. A collaborative study by the Forum Interdisciplinare per la Ricerca nelle Malattie Autoimmuni (FIRMA), *Clin Exp Rheumatol* 2007, 25 (2): 268–274.
68. Robert JM, Macara LM, Chalmers EA, Smith GCS. Inter-assay variation in antiphospholipid antibody testing. *BJOG* 2002; 109 (3): 348–349.
69. Devreese KM. Antiphospholipid antibody testing and standardization. *Int J Lab Hematol*. 2014, 36 (3): 352–363.
70. Tincani A, Allegri F, Balestrieri G, Reber G, Sanmarco M, Meroni P, Boffa MC. Minimal requirements for antiphospholipid antibodies ELISAs proposed by the European Forum on antiphospholipid antibodies. *Thromb Res* 2004; 114 (5-6): 553-558.
71. Barnett V, Lewis T. Basic principles. In: Barnett V, Lewis T (eds.). *Outliers in Statistical Data* (3rd edition). Chichester, John Wiley & Sons, 1994: 112-139.
72. Hodge VJ, Austin J. A survey of outlier detection methodologies. *Artificial intelligence review* 2004; 22(2), 85-126.
73. Al-Jabri AA, Al Belushi MS, Nsanze H. Frequency and levels of autoantibodies in healthy adult Omanis. *Ann Saudi Med* 2003; 23(6): 372-375.
74. McClain MT, Arbuckle MR, Heinlen LD, Dennis GJ, Roebuck J, Rubertone MV, Harley JB, James JA. The prevalence, onset, and clinical significance of antiphospholipid antibodies prior to diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 1226–1232.
75. Gladd DA, Olech E. Antiphospholipid antibodies in rheumatoid arthritis: identifying the dominoes. *Curr Rheumatol Rep* 2009; 11(1): 43-51.
76. Biggioggero M, Meroni PL. The geoepidemiology of the antiphospholipid antibody syndrome. *Autoimmun Rev* 2009; 9(5): 299-304.
77. Avčín T, Ambrožič A, Kuhar M, Kveder T, Rozman B: Anticardiolipin and anti-beta(2) glycoprotein I antibodies in sera of 61 apparently healthy children at regular preventive visits. *Rheumatology (Oxford)* 2001; 40 (5): 565–573.

78. Fauchais AL, Lambert M, Launay D, Michon-Pasturel U, Queyrel V, Nguyen N, Hebbar M, Hachulla E, Devulder B, Hatron PY. Antiphospholipid antibodies in primary Sjögren's syndrome: prevalence and clinical significance in a series of 74 patients. *Lupus* 2004; 13(4): 245-248.
79. Kikelj N. Pomen določanja protiteles proti trombinu z dvema encimsko imunskima metodama: diplomska naloga. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2010.