

## Podstawowe zasady racjonalnej serodiagnostyki autoprzeciwciał markerowych w układowych chorobach tkanki łącznej

*Principles of the reasonable serodiagnostic of the “marker” autoantibody in Ctd-s*

**Jakub Ząbek**

Zakład Mikrobiologii i Serologii Instytutu Reumatologii im. prof. dr hab. med. Eleonory Reicher w Warszawie,  
kierownik Zakładu doc. dr hab. n. biol. Jakub Ząbek

**Słowa kluczowe:** autoimmunizacja, autoprzeciwciała markerowe, *kaskadowy* system ustalania swoistości ANA, kliniczna wartość przeciwciał ANA.

**Key words:** autoimmunity, autoantibodies marker, “cascade” system of ANA specificities assessment, clinical value of ANA-s.

### Streszczenie

W większości chorób z autoimmunizacją obserwuje się charakterystyczną dla tych chorób odpowiedź komórkową i humoralną w postaci obecności autoprzeciwciał i autoreaktywnych limfocytów, skierowaną przeciwko antygenom własnoustrojowym. Fenomen ten występuje w układowych chorobach tkanki łącznej; takich jak SLE, zespół Sjögrena, MCTD, sklerodermia, zapalenie wielomięśniowe czy RZS.

Obecność autoprzeciwciał jest uważana za istotny fakt, który powinien być brany pod uwagę przy ustalaniu diagnozy i dlatego niektóre z autoprzeciwciał zostały zakwalifikowane do kryteriów diagnostycznych chorób z autoimmunizacją. Są one także użytecznymi markerami prognostycznymi i w niektórych przypadkach ukierunkowują postępowanie terapeutyczne.

Według autora najczulszym i najbardziej wiarygodnym testem jest metoda pośredniej IF oraz metoda *Colorzyme* (z zastosowaniem komórek Hep-2), szczególnie jako *testy skryningowe*. W późnych latach 60. opracowano nowe testy immunoenzymatyczne – ELISA, *Western-blotting*, stosowane obecnie powszechnie do identyfikacji swoistości autoprzeciwciał.

W prawidłowo prowadzonej strategii oznaczania przeciwciał ANA stosowana jest *kaskadowa* (4-etapowa) metoda oznaczania autoprzeciwciał. W pierwszym etapie stosuje się testy skryningowe (*IIF-ANA-screen* czy *ANA-ELISA-screen*). Następnie (jeśli ANA są dodatnie) ustalamy swoistość przeciwciał ANA (2. etap), a potem (3. etap) swoistości dla podtypów antygeny ANA (ang. *fine specificities*). Etap 4. wykonujemy tylko wtedy, gdy nie możemy wyżej opisanymi metodami opisać żadnej z typowych swoistości autoprzeciwciał i zwykle dokonuje się tego kombinowanymi metodami biochemiczno-immunochemicznymi.

### Summary

In most of the autoimmune diseases, a humoral and cellular immune response is characteristically seen, with autoantibodies and cells directed to distinct nuclear antigens (ANA). This phenomenon can be shown in systemic diseases like sclerosis, systemic lupus erythematosus, Sjögren's syndrome, mixed connective tissue disease, polymyositis and rheumatoid arthritis. The presence of autoantibodies is important items to be considered in establishing a diagnosis and because of that autoantibodies are included in the diagnostic criteria of many autoimmune diseases.

They are useful prognostic markers in some situations and facilitate clinical and treatment follow-up.

It seems to us the indirect immunofluorescence method (IIF) was a most powerful, sensitive and comprehensive test for screening of autoantibodies, until an immunoenzymatic (EIA) methods (ELISA, Western-blotting) in late 60's was worked out. The immunoenzymatic tests are very useful because of their simplicity and reliability. But there is one more excellent test named “Colorzyme” (presented by Immuno-Concept Corporation from USA) worked out by combining of the EIA and IIF tests.

More and more new-founded resources of marker autoantibodies and methods force to introduction into standardization both methods and specimens on which they are marked.

During properly executed strategy of ANA assessment usually a multi-stage (“cascade”) methodology is used. In the first stage a screening test (usually IIF-ANA or immunoperoxidase “Colorzyme” method based in Hep-2 cells and ELISA-screen are used).

Next (second) step – if ANA are positive we intend to establish of ANA specificity and eventually in the third step so called ANA fine-

### Adres do korespondencji:

doc. dr hab. n. biol. Jakub Ząbek, Zakład Mikrobiologii i Serologii, Instytut Reumatologii, ul. Spartańska 1, 02-637 Warszawa, faks +48 22 844 20 31

Przestrzeganie wyżej opisanych procedur zapewnia w większości przypadków badanych surowic możliwość ustalenia swoistości ANA i powtarzalności wyników, unika się też błędów diagnostycznych i co nie mniej ważne – uzyskuje rozsądne koszty prowadzonej diagnostyki. Coraz większa liczba nowo odkrytych autoprzeciwciał i metod diagnostycznych zmusza do wprowadzenia procedur standaryzacji zarówno metod, jak i testów, na których są oznaczane autoprzeciwciała.

Choroby z autoimmunizacją to bardzo szeroka i zróżnicowana klinicznie grupa przewlekłych, nierzadko poważnych w swych konsekwencjach schorzeń o nieznanym etiopatogenezie. Schorzenia te obejmują wiele chorób, w tym tzw. układowe choroby tkanki łącznej (znane szerzej jako choroby reumatyczne) oraz takie jednostki, jak choroba Hashimoto, choroba Addisona, choroba Gravesa-Basedova oraz wiele innych, zaliczanych do grupy chorób z autoimmunizacją narządowo swoistą [1, 2]. Wielu autorów podkreśla przypuszczalną infekcyjną etiopatogenezę chorób z autoimmunizacją, czego śladem mogłaby być krzyżowa reaktywność wielu autoprzeciwciał *markerowych* z antygenami bakteryjnymi i wirusowym [3–7].

Cechą wspólną tych jednostek chorobowych jest występowanie w krążeniu autoreaktywnych przeciwciał (autoprzeciwciał) oraz limfocytów skierowanych przeciwko antygenom własnym gospodarza [9–11]. Autoprzeciwciała mogą być skierowane przeciwko antygenom powszechnie występującym w organizmie gospodarza (mówimy wtedy o autoimmunizacji narządowo nieswoistej lub układowej) bądź antygenom swoistym tylko dla określonej tkanki (jest to przypadek autoimmunizacji narządowo swoistej).

W układowych chorobach tkanki łącznej występuje wiele zaburzeń mechanizmów odpornościowych, prowadzących do występowania tzw. autoprzeciwciał, czyli przeciwciał skierowanych przeciwko wielu antygenom własnoustrojowym. Szczególnie istotne znaczenie diagnostyczne mają przeciwciała skierowane przeciwko różnym składnikom białkowym i niebiałkowym jądra komórkowego (antygeny jądrowe – dsDNA, ssDNA, histon, DNP, antygen Scl-70, białka cetromerowe) oraz antygenom białkowym, występującym w cytoplazmie, organellach komórkowych lub błonie komórkowej, zaangażowanym w procesy zainicjowane w jądrze komórkowym (białka rybosomalne, antygen Jo-1 oraz inne aminoacylo tRNA-syntetazy) [8, 9]. Osobną grupę stanowią autoprzeciwciała skierowane przeciwko niektórym białkom surowiczym oraz komponentom tkanek, np. tkanki łącznej lub mięśniowej. Oznaczenie obecności oraz mian lub poziomów wyżej opisanych autoprzeciwciał przeciwko antyge-

specificities are assessed of course if there is a clinical demand. Fourth stage is needed only in case, when we were unable to confirm in the tested serum any typical specificity of ANA and it is usually done by combining biochemical and immunochemical methodology. Strict following of these procedures guaranteeing us in prevalence of the tested sera the possibility (more certainty) that specificities are assessed properly, reproducibility of results, let us to avoiding mistakes and what even more important – generation reasonable costs of diagnostics.

nom komórkowym wykonuje się zasadniczo z następujących powodów:

- obecność autoprzeciwciał może być patognomiczna dla danej choroby,
- miano niektórych autoprzeciwciał odzwierciedla aktywność procesu chorobowego,
- obecność danego autoprzeciwciała koreluje z określonymi objawami klinicznymi,
- autoprzeciwciała ma znaczenie prognostyczne (rozkownicze).

Obecnie w diagnostyce układowych chorób tkanki łącznej ok. 30 autoprzeciwciał ma z ww. powodów znaczenie diagnostyczne [9, 11, 12], a tylko kilkanaście z nich zakwalifikowano do kryteriów diagnostycznych danych jednostek jako tzw. przeciwciała *markerowe* [10]. Widać stąd jasno, jak wielkie znaczenie do postawienia prawidłowej diagnozy ma właściwe oznaczenie ich obecności i poziomu. Niestety, znaczenie diagnostyczne tylko niewielu autoprzeciwciał jest dobrze ustalone, a znaczenie pozostałych, zwłaszcza nowo odkrytych (np. przeciwciał dla keratyn), jest przedmiotem znacznych kontrowersji i wymaga dalszych badań [13, 14].

Aktualna sytuacja w serodiagnostyce autoprzeciwciał jest niezwykle skomplikowana, ponieważ z jednej strony dysponujemy coraz to większą liczbą nowych (czy nowo odkrytych) autoprzeciwciał, o jeszcze nie do końca ustalonym walorze diagnostycznym, a z drugiej strony coraz większą liczbą testów komercyjnych – o bardzo zróżnicowanej wartości diagnostycznej, która jest wynikiem różnorodności zastosowanych technik (metod oznaczania) oraz zróżnicowania zastosowanych antygenów (np. antygeny naturalne bądź rekombinantowe). Różnice (w wartości poszczególnych testów) wynikają też z takich parametrów, jak stopień natywności i oczyszczenia danego antygeny, ale także z czynników czysto technicznych, czyli np. z gęstości epitopów antygeny w teście ELISA na fazie stałej czy składu chemicznego zastosowanych mediów, np. siła jonowa diluentów, pH czy obecność detergentów.

Wykaz metod stosowanych dotychczas do oznaczania autoprzeciwciał jest także niezwykle bogaty i zaliczamy do niego takie metody, jak immunoelektrofore-

za, podwójna dyfuzja w żelach agarowych lub agarozowych, immunodyfuzja radialna, przeciwbieżna immunoelektroprecypitacja (tzw. metoda *counter*) oraz bardzo wiele metod tzw. immunoaglutynacyjnych [9, 15–18]. Wszystkie ww. metody, pomimo prostoty wykonania i braku konieczności posiadania skomplikowanej aparatury, mają określone niedomogi, a są nimi stosunkowo duża objętość i niestabilność preparatów antygenów wymaganych do odczynu, trudności w standaryzacji ww. metod oraz ich zbyt niska czułość. Całościowa i bardzo wnikliwa ocena tych metod została opublikowana w 1991 r. przez Reissa [18, 19].

Metoda IIF stosowana dzisiaj najczęściej w diagnostyce chorób z autoimmunizacją, m.in. do wykrywania przeciwciał dla antygenów jądrowych, wywodzi się w prostej linii od odczynów IF opracowanych przez Coonsa i wsp. [9] do wykrywania w tkankach antygenów wirusowych za pomocą swoistego przeciwciała związanego z fluorochromem (zwanego koniugatem) [16, 20].

Najnowszą i najwartościowszą modyfikacją, którą wypada omówić na zakończenie fragmentu dotyczącego metod IF (choć jest to metoda immunoenzymatyczna), jest tzw. metoda *Colorzyme* [16]. W tej metodzie wyeliminowano konieczność stosowania światła UV (do wzbudzenia fluorescencji, związanego z np. FITC koniugatu antyglobulinowego) przez zastosowanie koniugatów antyglobulin z peroksydazą chrzanową (HRP). Wprowadzony do metody *Colorzyme* nowy substrat dla peroksydazy 4-chloro-1-naftol, stosowany także do koniugatów z peroksydazą w metodzie *Western-blotting*, pozwala na zwiększenie czułości odczytu poprzez fakt, że metoda ta daje znaczne podniesienie możliwości rozróżnienia szczegółów struktur komórkowych (lub tkankowych) na obrazie mikroskopowym [20].

Technikami, które od połowy lat 80. wyparty wyżej opisane metody, są testy immunoenzymatyczne – wszelkie odmiany testu ELISA, technika *Western-blotting* oraz DOT-blot [21–24]. Obecnie dominującą pozycję wśród testów do wykrywania autooprzeciwciał zajmuje metoda ELISA, wykonywana na 96-dołkowych plastikowych, polietylenowych lub polipropylenowych płytkach titracyjnych, opłaszczonych wysoko oczyszczonymi preparatami antygenowymi.

Ogólna zasada racjonalnie prowadzonej serodiagnostyki sprowadza się do jej podziału na 3 (rzadko 4) zasadnicze etapy.

**W 1. etapie** powinno się ustalić, czy w danej surowicy (lub innym materiale biologicznym) występują w ogóle jakiegokolwiek autooprzeciwciała z interesującego nas zakresu (np. przeciwciała przeciwjądrowe – ANA) oraz czy ich poziom przekracza ustaloną normę. Do tego etapu używa się zwykle testów *przełądowych* (ang. *screening tests*) bazujących na substratach tkankowych

(utrwalone przekroje narządów, np. wątroby, nerek ssaków) lub liniach komórkowych (komórki Hep-2), które z natury rzeczy są bogate w autoantygeny jądrowe, cytoplazmatyczne czy cytoszkieletowe [25]. Do użytku weszły też testy *przełądowe* bazujące na metodzie immunoenzymatycznej ELISA, w których do spłaszczania powierzchni płytek titracyjnych używa się *koktajlu* wysoko oczyszczonych metodą chromatografii powinowactwa lub rekombinantowych antygenów jądrowych albo pełnego ekstraktu antygenów jądrowych (np. z określonego narządu, grasicy – RTE czy śledziony ssaków – BSE).

**W 2. etapie** ustalamy swoistość (lub najczęściej swoistości) autooprzeciwciała (oczywiście pod warunkiem, że test skryningowy, np. ANA-Hep-2, jest dodatni przy rozcieńczeniu badanej surowicy  $\geq 1/100$  – w przypadku dzieci i  $\geq 1/320$  u dorosłych). Metodami obecnie najczęściej stosowanymi są: metoda ELISA, *Western-blotting* lub *DOT-blotting*, gdzie konieczne jest już zastosowanie bardzo wysoko oczyszczonych preparatów antygenów jądrowych (lub antygenów rekombinantowych), by można było jednoznacznie stwierdzić, że w danej surowicy występuje (lub występują) autooprzeciwciała markerowe o określonej swoistości.

Oczywiście jest zrozumiałe, że w 2. etapie (tj. przy ustalaniu konkretnej swoistości autooprzeciwciała) korzystamy ze wskazówki, jaką jest określony typ (ang. *pattern*) *świecenia* w metodzie IIF lub wybarwiania jąder komórek Hep-2 w metodzie immunoperoksydazowej (*Colorzyme*), gdyż zawęża on zakres poszukiwanych swoistości autooprzeciwciał. Wynika to z lokalizacji określonych autoantygenów w strukturach komórki użytej jako substrat do testu i dlatego w np. przypadku tzw. plamistego typu *świecenia* (wybarwiania) jąder komórek Hep-2 należy poszukiwać przeciwciał dla antygenów  $U_{1-sn}$ RNP, Sm oraz SSA (Ro) i SSB (La) [8, 9, 19].

**Etap 3.** (zazwyczaj ostatni) sprowadza się do ustalenia, czy w danej surowicy występują autooprzeciwciała dla podtypów (ang. *fine specificities*) molekularnych danego autoantygeny (np.  $U_{1-sn}$ RNP-68 kD, A i C, Sm-BB' czy D lub SSA-60 i 52 kD), ale następuje to tylko wtedy, gdy przeciwciała dla danego podtypu autoantygeny mają ewidentną asocjację kliniczną z określonym zespołem klinicznym (np. przeciwciała dla antygeny SSA-52 kD korelują z tzw. noworodkowym całkowitym blokiem serca) [9, 12].

Jednak w ok. 25–50% przypadków surowic pobranych od chorych reumatycznych wynik ANA jest ujemny i wtedy należy analizować również przeciwciała dla antygenów cytoplazmatycznych, do których należą m.in. przeciwciała dla antygeny Jo-I, rybosomalnego białka P, białek cytoszkieletu (cytokeratyna, aktyna, wimentyna), zwłaszcza przy objawach klinicznych wskazujących na

określony typ schorzenia [26]. Należy też wziąć pod uwagę autoprzeciwiata z grupy przeciwiata antyfosfolipidowych (aPL), szczególnie przeciwiata antykardiolipinowe (aCl) oraz antykofaktorowe (anty- $\beta$ 2-GP-I, antyaneksyna V, anty-AT III, antyprotrombina itp.), cenne markery zespołu APS, często towarzyszącego chorobom reumatycznym [9, 15].

**Etap 4.** w typowaniu autoprzeciwiata jest konieczny tylko wtedy, gdy wyczerpalimy wszystkie możliwości diagnostyczne przeciwiata ANA oraz innych autoprzeciwiata *markerowych* i przy dodatnim odczynie ANA IIF czy techniką *Colorzyme* i konkretnym typie świecenia nie ustaliliśmy swoistości dostępnymi testami. Taka sytuacja, na szczęście dla diagnostów, zdarza się w ok. 1–5% przypadków i jest najczęściej z jednej strony wynikiem niezwykle bogactwa odpowiedzi autoprzeciwiata w chorobach reumatycznych, z drugiej zaś strony stosunkowo niewielkiej liczby (rzędu 20) autoantygenów, dla których możemy oznaczyć autoprzeciwiata. Wykluczam oczywiście błędy techniczne, prowadzące do wyników fałszywie ujemnych, ale te nie powinny się zdarzyć przy prawidłowo prowadzonej diagnostyce. Wyjątkiem są tu zdarzające się, niestety, przypadki zubożenia epitopowego antygenów rekombinantowych, stosowanych w testach diagnostycznych. Rekomendowana przez ECSA (*European Consensus Study on Autoantibodies*) strategia *kaskadowego* ustalania swoistości przeciwiata ANA jest przedstawiona na ryc. 1. [27, 28].

Ta dysproporcja bogactwa odpowiedzi przeciwiata z jednej strony i stosunkowo ograniczonych możliwości diagnostycznych autoprzeciwiata z drugiej, zmusza do zastosowania w 4. etapie metodyki specjalnej – niestosowanej zwykle w diagnostyce rutynowej autoprzeciwiata, do której zaliczamy:

- zastosowanie wzorcowych przeciwiata monoklonalnych dla rzadkich antygenów na zwykle stosowanych substratach (np. komórki Hep-2),
- zastosowanie immunosorpcji surowic badanych wysoko oczyszczonymi antygenami (z użyciem rutynowych testów diagnostycznych),
- zastosowanie pełnych ekstraktów tkanek lub komórek Hep-2, MOLT<sub>4</sub> czy innych, bogatszych w rzadkie antygeny w połączeniu z monoklonalnymi surowicami wzorcowymi.

Te specjalne procedury są zwykle stosowane w zakładach badawczych, dysponujących dużym doświadczeniem w serodiagnostyce autoprzeciwiata i zapleczem aparaturowym umożliwiającym otrzymywanie i oczyszczanie autoantygenów metodami chromatograficznymi. Z własnego doświadczenia autor stwierdza, że warto to robić, gdyż może to mieć (określone miejsce serodiagnostyki) znaczenie w diagnostyce różnicowej chorób reumatycznych, zwłaszcza w trudnych diagnostycznie przypadkach, i warto, by istniały zakłady, w których prowadzi się taką specjalistyczną diagnostykę [29–31].

Należy tylko wyrazić ubolewanie, że na ogół środki przeznaczone przez instytucje do tego powołane nie za-

Etap	Cele procedury	Przykład	Stosowana metoda
Etap I	wykazanie obecności (miano, a także typ <i>świecenia</i> ) przeciwiata ANA	miano ANA 1/640 typ homogenno-plamisty	IIF – Hep-2 <i>Colorzyme</i> – Hep-2 ELISA-skrining
Etap II	jeśli ANA są dodatnie – ustala się swoistość (swoistości) przeciwiata ANA	obecne przeciwiata anty-Ro, anty-La brak anty-dsDNA, anty-Sm	ELISA <i>Western-blott</i>
Etap III	ustala się swoistości dla podtypów antygenów ANA (jeśli istnieje uzasadnienie kliniczne)	przeciwiata dla antygeny Ro – 52 kD	<i>Western-blott</i>
Etap IV	jeśli ANA całkowicie ujemne lub przy ANA-dodatnich nie udaje się ustalić swoistości przeciwiata	obecne przeciwiata dla nukleohistonu (do 60% w SLE)	metody kombinowane (immunochemiczne i <i>Western-blott</i> )

**Ryc. 1.** Kaskadowa metoda oznaczania swoistości przeciwiata ANA.

**Fig. 1.** "Cascade" method of the ANA specificity assessment.

pewniają możliwości utrzymania takich specjalistycznych zakładów diagnostycznych, prowadzących nierutynową identyfikację autooprzeciwciał.

Przestrzeganie wyżej opisanych procedur w większości przypadków badanych surowic daje możliwość ustalenia swoistości ANA i powtarzalności wyników, uniknięcia błędów diagnostycznych i – co nie mniej ważne – uzyskania rozsądnych kosztów prowadzonej diagnostyki. Coraz większa liczba nowo odkrytych autooprzeciwciał i metod diagnostycznych zmusza do wprowadzenia procedur standaryzacji zarówno metod, jak i testów, na których są oznaczane autooprzeciwciała.

Podsumowując, należy stwierdzić, że oznaczanie przeciwciał przeciwjądrowych jest metodą czułą, lecz nieswoistą. Tylko u chorych z objawami podmiotowymi czy przedmiotowymi chorób tkanki łącznej wykrycie ANA w mianach wyższych/równych niż 320 (a u dzieci od 1/100) może być pomocne w potwierdzeniu rozpoznania. Należy podkreślić, że przeciwciała mogą występować w różnych chorobach poza układowymi chorobami tkanki łącznej, np. w chorobach wątroby i płuc, we wszelkiego typu zakażeniach, w chorobach nowotworowych, skórnych i endokrynologicznych, a ponadto odsetek dodatnich ANA zwiększa się u kobiet w ciąży, u osób powyżej 60. roku życia, w zespołach polekowych oraz w stanach po przeszczepach (np. serca i nerek) [32]. U osób zdrowych (zwłaszcza powyżej 50.–60. roku życia) wyniki testu też bywają dodatnie. Badanie to nie powinno być zlecane pacjentom z niejasnymi dolegliwościami czy objawami, ponieważ z wyżej opisanych powodów wartość diagnostyczna tego oznaczenia jest znikoma. Wskazane jest natomiast u chorych z objawami układowej choroby tkanki łącznej, ponieważ tylko ustalenie obecności przeciwciała *markerowego*, tj. przeciwciała o wysokiej swoistości dla danej jednostki chorobowej, ma znaczenie pomocnicze dla diagnostyki różnicowej chorób reumatycznych, gdyż autooprzeciwciała *markerowe* są w kryteriach diagnostycznych większości chorób reumatycznych. Otrzymane tą drogą wyniki uzasadniają wówczas podjęcie dalszych badań mających na celu potwierdzenie rozpoznania [33].

#### Piśmiennictwo

1. Systemic Autoimmunity. Bigazzi PE, Reichlin M (eds). Mariel Dekler Inc., New York, Basel, Honkong 1991.
2. Organ-specific Autoimmunity. Bigazzi PE, Wick G, Wicher K (eds). Mariel Dekler Inc., New York, Basel, Honkong, 1991.
3. Barnett LA, Fujinami RS. Molecular mimicry: a mechanism for autoimmune injury. *FASEB J* 1992; 6: 840-51.
4. Baum H, Butler P, Davies H, et al. Autoimmune disease and molecular mimicry: an hypothesis. *Trends Biochem Sci* 1993; 18: 140-5.
5. Horsfall AC. Molecular mimicry and autoantigens in connective tissue diseases. *Mol Biol Rep* 1992; 16: 139-43.
6. Ząbek J. Rola antygenów bakteryjnych w indukcji procesów autoimmunizacyjnych związanych z patogenezą reaktywnego zapalenia stawów. *Alergia Astma Immunologia* 1999; 4: 41-4.
7. Kontny E, Jesień-Dudzińska E, Romicka AM, et al. Immunologia chorób stawów. W: *Immunologia kliniczna*. Kowalski ML (red.). Mediton Oficyna Wydawnicza, Łódź 2000, 357-84.
8. Fritzler MJ. Immunofluorescent antinuclear antibody tests. Autoimmune Disease. In: *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. Rose NR, Friedman H, Fahey JL (eds). American Society for Microbiology, Washington DC 1986: 733-9.
9. von Mühlen CA, Tan EM. Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum* 1995; 24: 323-58.
10. Puszczewicz MJ. Przeciwciała przeciwjądrowe w diagnostyce różnicowej chorób układowych. *Reumatologia* 1998; 36: 30-41.
11. *Manual of Biological Markers of Disease*. van Venrooij WJ, Maini RN (eds). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Boston, London 1994.
12. Reichlin M. Systemic Lupus Erythematosus. In: *Systemic Autoimmunity*. Bigazzi PE, Reichlin M (eds). Mariel Dekler Inc., New York, Basel, Honkong, 1991: 163-99.
13. Vincent C, Serre G, Lapeyre F, et al. High diagnostic value in rheumatoid arthritis of antibodies to the stratum corneum of rat oesophagus epithelium, so-called "antikeratin-antibodies". *Ann Rheum Dis* 1989; 48: 712-22.
14. Bąkowska A. Antikeratin antibodies in serum and in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Central European J Immunol* 1999; 24: 25-9.
15. *Metody diagnostyki serologicznej w reumatologii*. Luft S (red.). PWN, Warszawa, 1996.
16. Ząbek J. Metody wykrywania autooprzeciwciał „markerowych” w chorobach z autoimmunizacją. W: *Immunologia kliniczna*. Kowalski ML (red.). Mediton Oficyna Wydawnicza, Łódź 2000: 787-806.
17. Iwaszkiewicz J, Szkudlińska B. Metody oceny humoralnych składników odpowiedzi immunologicznej. W: *Immunologia kliniczna*. Kowalski ML (red.). Mediton Oficyna Wydawnicza, Łódź 2000: 749-64.
18. Reis J. Współczesne metody szybkiej indykacji i immunodiagnostyki rozpuszczalnych antygenów bakteryjnych. *Post Mikrobiol* 1989; 28: 17-34.
19. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. Rose NR, Friedman H, Fahey JL (eds). American Society for Microbiology. Washington DC 1986.
20. *Manual of Biological Markers of Disease*. van Venrooij WJ, Maini RN (eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, 1994.
21. Engvall E, Perlman P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 1971; 9: 871-6.
22. Gershoni JM, Poladi GE. Protein blotting: principles and applications. *Anal Biochem* 1983; 131: 1-34.
23. Grzybowski J, Trafny EA. Immunoenzyme test ELISA: classification and nomenclature. *Post Hig Med Dośw* 1985; 39: 440-9.
24. Ząbek J. Wykrywanie autooprzeciwciał występujących w surowicach chorych na układowe choroby tkanki łącznej z zastosowa-

- niem techniki „immunoblotting”, czyli elektroforezy białek w żelu poliakrylamidowym połączonej z immunodetekcją. W: Metody diagnostyki serologicznej w reumatologii. Luft S (red.). PWN Warszawa, 1996: 101-12.
25. Cleymaet JE, Nakamura RM. Indirect immunofluorescent antinuclear antibody tests: comparison of sensitivity and specificity of different substrates. *Am J Clin Pathol* 1972; 58: 388-93.
  26. Ząbek J. Nowoczesne metody wykrywania autoprzeciwciał markerowych oraz autoantygenów w chorobach reumatycznych. *Reumatologia* 1997; 35: 476-7.
  27. van Venrooij WJ, Charles P, Maini RN. The consensus workshop for the detection of antibodies to intracellular antigens in rheumatic diseases. *J Immunol Methods* 1991; 140: 181-9.
  28. Ząbek J. Consensus Workshop for Standardization of Autoantibodies to Intracellular Antigens. Second Meeting. Warszawa 29-30.04.1995. *Reumatologia* 1995; 33: 461-2.
  29. Ząbek J. Nowoczesne metody wykrywania autoprzeciwciał w chorobach z autoagresją. *Przeegl Epidemiol* 2002; 56: 59-65.
  30. Ząbek J. Przyczyny niepowodzeń w identyfikacji swoistości autoprzeciwciał ANA w surowicach pobranych od pacjentów z układowymi chorobami tkanki łącznej. *Reumatologia* 2004; 42: 416-26.
  31. Ząbek J, Palacz A, Musiej-Nowakowska E i wsp. Porównanie wartości diagnostycznej przeciwciał dla nukleosomów z innymi markerami serologicznymi występującymi w toczniu rumieniowatym układowym. *Reumatologia* 2004; 42: 507-14.
  32. Thomas C, Robinson JA. Oznaczanie przeciwciał przeciwjądrowych. *Medycyna po Dyplomie* 1994; 3: 114-8.
  33. Hebanowski M, Bąkowska A. Komentarz. *Medycyna po Dyplomie* 1994; 3: 118-9.