

## Próba wyjaśnienia przyczyny niepowodzeń w ustaleniu swoistości autoprzeciwciał przeciwjądrowych w surowicach ANA-dodatnich na podstawie analizy poszczególnych swoistości przeciwciał obecnych w krążących kompleksach immunologicznych

*An attempt to explain unsuccessful specification of autoantibody assessment in ANA-positive sera basing on analysis of particular antibody specificities present in circulating immune complexes*

Agnieszka Palacz, Jakub Ząbek, Iwona Horbacz, Joanna Pyka

Zakład Mikrobiologii i Serologii Instytutu Reumatologii im. prof. dr hab. med. Eleonory Reicher w Warszawie

**Słowa kluczowe:** surowice ANA-dodatnie, brak identyfikacji swoistości ANA, analiza składu krążących kompleksów immunologicznych.

**Key words:** ANA-positive sera, lack of ANA specificity identification, analysis of circulating immune complexes (CIC) composition.

### Streszczenie

Autoimmunizacja to stan permanentnej obecności w surowicach pacjentów autoprzeciwciał i autoreaktywnych limfocytów T, które są zaangażowane w patomechanizmy chorób tkanki łącznej. Auto-przeciwciała te zostały uznane za markery określonych jednostek chorobowych. Są one określane zbiorczo jako przeciwciała przeciwjądrowe (PPJ; *anti-nuclear antibodies – ANA*) i występują w różnych odsetkach u chorych na układowe choroby tkanki łącznej.

Jednak w ok. 10–25% przypadków surowic pobranych od pacjentów ze schorzeniami reumatycznymi, w których wynik ANA jest dodatni, nie udaje się oznaczyć swoistości autoprzeciwciał. Jedną z możliwych przyczyn seronegatywności tych surowic może być kompleksemia – zwykle skojarzona z fazami zaostrzenia procesu podstawowego.

Celem pracy była analiza krążących kompleksów immunologicznych (KKI) pod kątem ewentualnej obecności autoprzeciwciał markerowych w osadach po PEG-6000 (glikolu polietylenowym) trudnych diagnostycznie surowic ANA-dodatnich.

Zbadano 588 surowic pochodzących z klinik i polikliniki Instytutu Reumatologii, w których oznaczono: miano i typ świecenia ANA metodą immunofluorescencji (IIF) oraz obecność wybranych auto-przeciwciał metodą ELISA i *Western-blotting*. W przypadku

### Summary

Autoimmunity is a state of permanent persistence of the autoantibodies and autoreactive T lymphocytes in patients' plasma engaged in pathomechanism of the connective tissue diseases (CTDs). Specific autoantibodies are recognized as "markers" for particular types of diseases. Such antibodies are known as anti-nuclear antibodies (ANA) and are present in different percentages in CTD patients. However, in about 10-25% of tested sera from rheumatic patients, where the ANA test is positive, estimation of particular ANA specificities is unsuccessful. One of possible reasons for such seronegativity is complexemia, usually correlated with the acute phase of the disease.

The goal of researches was the analysis of the CIC (PEG-6000 sediments) for the presence of "marker" autoantibodies in a group of these "trouble-making" sera. Researches cover a group of 588 sera originating from Clinics and Outpatient Clinic of Institute of Rheumatology. In the sera a titre and type of ANA pattern (IIF-method) and presence of selected auto-antibodies (done by ELISA and Western-blotting method) were estimated. In 69 (11.7%) ANA-positive (titre 1/160) sera, the autoantibody estimation gave a negative result.

Then, we proposed a new methodological approach to the analysis of ANA-positive sera where classical methods of ANA specifi-

---

### Adres do korespondencji:

mgr Agnieszka Palacz, Zakład Mikrobiologii i Serologii, Instytut Reumatologii im. prof. dr hab. med. Eleonory Reicher, ul. Spartańska 1, 02-637 Warszawa, tel. + 48 22 844 30 67.

**Praca wpłynęła:** 14.09.2010 r.

69 surowic (co stanowiło 11,7%) przy dodatnim wyniku ANA (rzędu  $\geq 1/160$ ) oznaczenie poszczególnych swoistości auto przeciwciał dało wynik negatywny. Wobec tego zaproponowano nowe metodyczne podejście do analizy surowic ANA-pozytywnych, w których nie udaje się standardowymi metodami ustalić swoistości auto przeciwciał. Zaproponowana metoda polega na analizie swoistości auto przeciwciał nie w surowicy pełnej, ale w osadach po PEG-6000 z tych surowic.

W ok. 84% tych osadów po dodaniu PEG uzyskano wyniki pozytywne testów *Western-blotting*, przy czym w znacznym odsetku (tj. 87%) wykazano więcej niż jedną swoistość (ryc. 1). Wśród 133 swoistości przeciwciał oznaczonych w 69 surowicach (średnio ok. 2 na surowicę) przeciwciała dla antygenów chromatynowych (anty-Hp i anty-dsDNA) stanowiły blisko 50% (73 oznaczonych swoistości) wszystkich oznaczanych swoistości. Przeciwciała dla antygenów ENA stanowiły 32% (43 oznaczonych swoistości), a pozostałe przeciwciała wystąpiły w 10,5% badanych surowic (ryc. 2). W większości badanych osadów po precipitacji PEG-6000 (72%) uzyskano pozytywną reakcję, tj. osłabienie linii po dodaniu do osadów PEG surowic anty-F(ab)2-IgG oraz tylko w ok. 30% osłabienie reakcji po dodaniu surowic anty-Fc-IgG. Efekt był niezależny od swoistości wykrywanego auto przeciwciała, co może wskazywać na powierzchniową lokalizację tych auto przeciwciał (ryc. 3, tab. 1). Można mieć nadzieję, że opracowane podejście, po uproszczeniach niezbędnych dla celów rutynowej diagnostyki przeciwciał, znajdzie zastosowanie w serodiagnostyce auto przeciwciał markerowych, i to nie tylko w diagnostyce układowych chorób tkanki łącznej.

## Wstęp

W układowych chorobach tkanki łącznej występuje wiele zaburzeń odporności prowadzących do występowania tzw. auto przeciwciał, 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 centromerowe) oraz antygenom białkowym występującym w cytoplazmie, organellach komórkowych lub w błonie komórkowej [1, 2]. Przeciwciała te, określane zbiorczo jako przeciwciała przeciwjądrowe (PPI; *anti-nuclear antibodies* – ANA), włączono do kryteriów diagnostycznych wielu chorób reumatycznych z uwagi na ich markerowy charakter, związek z aktywnością procesu chorobowego oraz swoiste korelacje niektórych z nich z określonymi objawami klinicznymi [1, 3, 4].

Lista metod służących do oznaczania ANA jest niezwykle bogata, choć w ostatnich 10–15 latach obserwuje się tendencję w kierunku stosowania metod immunoenzymatycznych, takich jak ELISA, *Western-blotting* czy *DOT-blotting*. Widać też wyraźne zróżnicowanie tych metod – na skринingowe, tj. służące jedynie ustaleniu obecności przeciwciał ANA, i na metody pozwalające

ty assessment was unsuccessful. The new approach is based on the analysis of the ANA specificity not in sera but in PEG-6000 sediments (or possibly in -fractions from PEG sediments), which are generally composed of different serum macroglobulins and also contain a concentrated circulating immune complex (CIC) fraction. Using this new method it was possible to estimate autoantibody specificity in 84% of the sera formerly negative, where the standard methodology was useless.

It is worth noting that in about 87% of PEG sediments more than one ANA specificity appears (Fig. 1). Among 133 antibody specificities found in 69 sera (on average, 2 different antibodies per serum), antibodies to chromatin antigens (anti-dsDNA, Hp) were positive in about 50% of all estimated autoantibodies, whereas antibodies to ENA-antigens were positive in 32% and in the case of residual autoantibodies, positivity was discovered only in 10.5% of all cases (Fig. 2). Additionally, in most (72%) PEG-6000 sediments tested for autoantibodies, the positive reaction (weakness of the lines on Western blots in relation to controls) after treatment (incubated with PEG sediment blots) with anti-human F(ab)2-IgG antiserum and in 30% after incubation with anti-h-Fc-IgG antiserum was observed.

The effect of weakening of lines on the Western blots after incubation with anti-F(ab)2 and anti-Fc sera was similar, independently of ANA antibody specificity, what shows that autoantibodies are located on the surface of the immune complexes (Fig. 3, Table 1).

One can hope that a new methodological approach developed after necessary adjustment (simplification) needed for routine antibody diagnostics, will be useful in diagnosis of marker autoantibodies not only in connective tissue diseases.

ustalić swoistość ANA występujących w surowicy danego chorego [5, 6].

Jednak w ok. 10–25% przypadków surowic pobranych od pacjentów ze schorzeniami reumatycznymi, w których wynik ANA jest dodatni, nie udaje się oznaczyć swoistości auto przeciwciał i wtedy należy analizować przyczyny seronegatywności. Szczególnym problemem są surowice ANA-dodatnie, w których metodami klasycznymi stosowanymi w serodiagnostyce auto przeciwciał nie udaje się ustalić swoistości auto przeciwciała markerowego (np. anty-U<sub>1</sub>snRNP, anty-Sm, anty-Ro i La itp.). Jedną z przyczyn seronegatywności tych surowic może być kompleksemia.

Kompleksemia występująca w surowicach pacjentów z układowymi chorobami tkanki łącznej jest zwykle skojarzona z fazami zaostrzenia procesu podstawowego, np. w toczeniu, gdzie towarzyszy hipokomplementemii, podwyższeniu wskaźników ostrej fazy i wskaźników aktywności choroby oraz zmianom poziomu i awidności auto przeciwciał [7, 8]. Mało uwagi poświęca się temu, że procesowi zaostrzenia choroby zwykle mogą towarzyszyć dwa zjawiska. Pierwsze z nich to uwalnianie z zajętych narządów lub tkanek do krążenia autoantygenów, drugie – związanie auto przeciwciał obecnych w krążących kompleksach immunologicznych (KKI). Pierwszy fenomen jest niedocenianym na ogół wskaźnikiem aktywnego procesu destrukcji narządów lub tkanek,

a drugi prowadzi do neutralizacji krążących auto przeciwciał i obniżenia ich miana w surowicach.

Celem pracy była analiza KKI pod kątem ewentualnej obecności auto przeciwciał markerowych w trudnych diagnostycznie surowicach ANA-dodatnich, w przypadku których klasycznymi metodami stosowanymi w serodiagnostyce auto przeciwciał nie udało się ustalić swoistości przeciwciał ANA.

## Materiał i metody

Badania dotyczyły 588 surowic przekazanych do Zakładu Mikrobiologii i Serologii Instytutu Reumatologii w celu oznaczenia miana i typu ANA oraz ustalenia swoistości ANA. Surowice pochodziły z klinik i polikliniki IR.

W surowicach oznaczano następujące parametry:

- miano i typ świecenia ANA metodą IIF – na slajdach z utrwalonymi komórkami Hep-2 (firmy Euroimmun, Niemcy) oraz metodą Colorzyme (firmy Immunovision, USA),
- poziom auto przeciwciał (w zależności od typu świecenia ANA metodami ELISA i *Western-blotting* na teście ANA-ENA RecomLine firmy Biomedica-Poland Sp. z o.o.),
- poziom KKI metodą immunoenzymatyczną (C1q – CIC kit) firmy Quidel (USA),
- frakcję wzbogaconą w KKI uzyskiwano metodą wytrącania glikolem polietylowym o ciężarze cząsteczkowym 6000 (PEG-6000) wg Świerczyńskiej i wsp. [9],
- frakcję  $\gamma$  z osadów po PEG-6000 uzyskiwano przez wytrącanie nasyconym siarczanem amonu w pH 3,5 (stosowanym do dysocjacji KKI) wg metody własnej [10, 11],
- białko we frakcji  $\gamma$  i osadach PEG-6000 oznaczano spektrofotometrycznie metodą wg Kalckara [12].

## Wyniki

W surowicach przystanych do diagnostyki przeciwciał ANA oznaczano miano i typ świecenia, a następnie – postępując zgodnie ze standardową procedurą – wykonywano typowanie swoistości testem *Western-blotting* lub typowanie wskazanych przez klinicystę swoistości charakterystycznych (przeciwciał markerowych) dla danej jednostki chorobowej. Test *Western-blotting* służy do oznaczania następujących auto przeciwciał: anty-U<sub>1</sub>snRNP, anty-Sm, anty-Ro (SS-A), anty-La (SS-B) anty-Rib-P, anty-PCNA, anty-CENP-B, anty-Scl-70, anty-Jo-1 oraz anty-Hp i dsDNA. Wyżej opisaną standardową procedurę wykonano dla 588 surowic. W przypadku 69 surowic (co stanowi 11,7%) przy dodatnim wyniku ANA (rzędu  $\geq 1/160$ ) oznaczanie poszczególnych swoistości auto przeciwciał dało wynik negatywny. W niewielkim odsetku (ok. 19%) spośród tych 69 surowic udało się ustalić swoistość auto przeciwciał (zgodną z typem świecenia ANA) przy znacz-

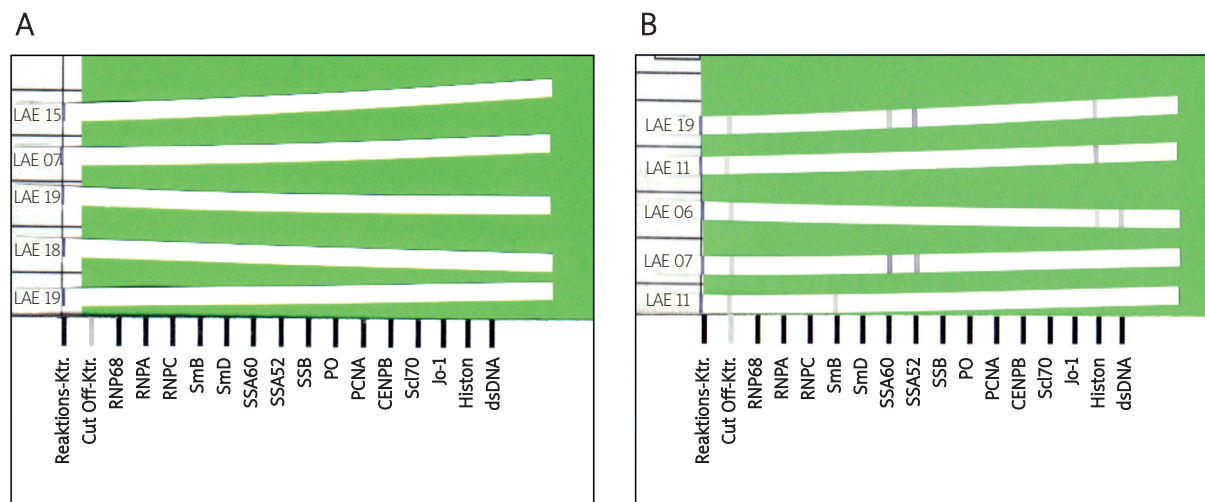
nym obniżeniu (z 1/100 do 1/10) roboczego rozcieńczenia surowicy.

Być może wyżej opisaną procedurę, tj. proporcjonalne do miana ANA obniżenie rozcieńczenia roboczego surowic dla metody *Western-blotting*, można będzie stosować obligatoryjnie w przypadkach, w których podstawowe znaczenie ma wykazanie obecności auto przeciwciała markerowego, a jego poziom ma na tym etapie znaczenie drugorzędne.

Nie rozstrzygnięto, czy w przypadku tych trudnych surowic mamy do czynienia z rzadkim przeciwciałem, dla którego brakuje antygeny w zastosowanym teście *Western-blotting*, czy też auto przeciwciał jest związane w KKI, ale zachowało zdolność wiązania się z antygenami, co najczęściej dotyczy przeciwciał klasy IgM, ale także pozostałych klas – IgG i IgA. W tym celu wykonano oznaczanie swoistości przeciwciał ANA metodą *Western-blotting*. Wiadomo z doświadczeń z seronegatywnymi surowicami chorych podejrzanych o boreliozę, że osady po PEG-6000 oraz frakcje  $\gamma$  z surowic seronegatywnych dla przeciwciał anty-*Borrelia burgdorferi* dają dodatnie wyniki w teście potwierdzenia *Western-blotting* stosowanym w przypadku pogłębienia diagnostyki boreliozy ([13] oraz praca przygotowywana do druku).

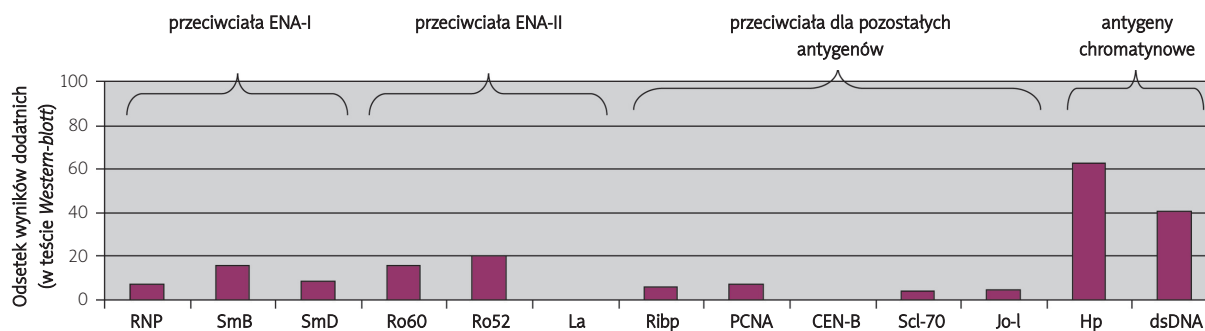
Na rycinie 1 przedstawiono wyniki testu *Western-blotting* wykonanego na osadach PEG-6000 w zestawieniu z wynikami uzyskiwanymi na pełnych surowicach (metodą standardową), a na rycinie 2 pokazano częstość występowania auto przeciwciał w osadach PEG.

W ok. 84% surowic uzyskano wyniki pozytywne testów *Western-blotting*, przy czym w znacznym odsetku (60/69, tj. 87%) uzyskano więcej niż jedną linię (dla różnych swoistości). Wskazuje to, że prawdopodobnie jest to mieszanina KKI o różnym składzie (różna swoistość auto przeciwciał oraz różne autoantygeny?). Wśród 133 swoistości przeciwciał oznaczanych w 69 surowicach (przeciętnie ok. 2 na surowicę) przeciwciała dla antygenów chromatynowych (anty-Hp i anty-dsDNA) stanowiły blisko 50% (73 oznaczonych swoistości) wszystkich oznaczanych swoistości, natomiast przeciwciała dla antygenów ENA – 32% (43 oznaczonych swoistości), a pozostałe 14 oznaczanych surowic to tylko 10,5%. Przeciwciała dla antygenów chromatynowych (stanowiące 56% wszystkich oznaczanych swoistości) będą przedmiotem dalszych badań, gdyż prawdopodobnie mamy tu do czynienia ze zjawiskiem krzyżowej reaktywności przeciwciał (anty-ssDNA i dsDNA, anty-PL, anty-NuHi, anty-histon i ewentualnie anty-HMG i anty-uQ). Chcąc wstępnie zróżnicować i scharakteryzować budowę KKI, określono za pomocą surowic anty-Fc i anty-(Fab)<sub>2</sub>-IgG orientację i lokalizację auto przeciwciał występujących w danym typie KKI – wykrywanych metodą *Western-blotting*. Bazowano na opublikowanych



**Ryc. 1.** Przykłady swoistości auto przeciwciał znalezionych w surowicach (A) i osadach PEG (B) metodą Western-blotting.

**Fig. 1.** Examples of specificities of autoantibodies found in sera (A) and in PEG-6000 sediments (B) estimated by Western-blotting method.



**Ryc. 2.** Częstość występowania auto przeciwciał klasy IgG w osadach PEG-6000 z surowic ANA-dodatnich, ale ujemnych w testach potwierdzenia.

**Fig. 2.** The prevalence of autoantibodies (IgG class) in PEG-6000 sediments estimated by ANA-positive sera, negative in confirmatory tests.

danych dotyczących klas i podklas auto przeciwciał o określonych swoistościach [14]. Wyniki wyżej opisanej analizy dla wybranych surowic przedstawiono na rycinie 3 oraz w tabeli I.

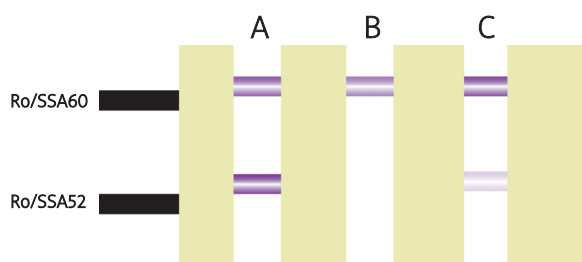
W większości badanych tą metodą surowic (72%) uzyskano pozytywną reakcję, tj. ostabienie linii po dodaniu do osadów PEG surowic anti-F(ab)<sub>2</sub>-IgG oraz tylko w ok. 30% ostabienie reakcji po surowicach anti-Fc-IgG. Efekt był niezależny od swoistości wykrywanego auto przeciwciała, co może wskazywać na powierzchniową lokalizację tych auto przeciwciał. Różnicowanie efektów wyżej opisanego eksperymentu dla poszczególnych swoistości nie zostało wykonane dla wszystkich surowic z powodu braku materiału, ale było na tyle charakterys-

tyczne, że pozwalało stwierdzić, iż mamy do czynienia z więcej niż jednym typem KKI.

## Dyskusja

Z masywną kompleksami mamy do czynienia na ogół w aktywnej fazie choroby, gdy dochodzi do destrukcji komórek, ewentualnie tkanek zajętych narządów, np. w przebiegu zaostrzenia tocznia rumieniowatego układowego, gdzie jednocześnie ze wzrostem OB, obniżeniem poziomu dopełniacza, zwiększa się także poziom KKI. W KKI związane są auto przeciwciała [7, 15]. Może to paradoksalnie doprowadzić do sytuacji, w której w okresie aktywności choroby będzie obniżał się poziom auto-

**Ryc. 3.** Wybrany przykład neutralizacji surowicami anti-Fc i anti-Fab swoistości przeciwciał występujących w osadach PEG: **A** – pasek inkubowany z osadem PEG-6000, **B** – pasek inkubowany z osadem PEG-6000 traktowanym surowicą anti-F(ab2), **C** – pasek inkubowany z osadem PEG-6000 traktowanym surowicą anti-Fc.



**Fig. 3.** Selected example of neutralisation, by anti-Fc and anti-Fab sera, of autoantibodies specificities present in PEG-6000 sediments: **A** – strip incubated with PEG-6000 sediment, **B** – strip incubated with PEG-6000 sediment treated with anti-Fab serum, **C** – strip incubated with PEG-6000 sediment treated with anti-Fc serum.

**Tabela I.** Szczegółowa analiza aktywności przeciwciał w KKI na podstawie neutralizacji swoistości surowicami anti-Fc i anti-(Fab2)

**Table I.** Detail analysis of autoantibodies specificities in CIC by anti-Fc and anti-Fab2

Lp.	Pacjent	Swoistości oznaczone metodą <i>Western-blotting</i> w wybranych surowicach oraz w osadach PEG					
		Surowica			Osady PEG-6000		
		ANA		typowanie swoistości	surowice kontrolne*	+ surowica anti-Fabs	+ surowica anti-Fc*
		miano	typ świecenia				
1	KS	1/5120	plamisty	anty-Hp ślad	anty-Ro + anty-Hp ++ anty-DNA +	anty-Ro ślad anty-Hp ++ anty-DNA słaby +	anty-Ro + anty-Hp ++ anty-DNA +
2	JZ	1/640	plamisty	anty-Ro +/- anty-Hp ślad	anty-Ro-60 +/- anty-Ro-52 +	+/- +/-	ślad +
3	WK	1/640	homogenno-plamisty	anty-Hp +/-	anty-Ro + anty-Hp + anty-DNA +	ślad - -	ślad - ślad
4	GO	1/1280	plamisty	anty-Hp +/-	anty-Hp + anty-DNA +/-	+ -	+ +/-
5	FO	1/320	homogenno-plamisty	anty-SmB +/-	anty-SmB ++ anty-SmD ślad	++ ślad	++ ślad
6	RL	1/320	homogenno-plamisty	(-)	anty-Hp słaby + anty-DNA słaby +	+ słaby +	++ +
7	PK	1/640	plamisty	anty-Ro ślad	anty-Ro +/- anty-Hp +++ anty-DNA +	ślad + ślad	+ ++ słaby +

\*moc odczynu oznaczana w skali pięciostopniowej (-, +/-, +, ++, +++)

przeciwciał markerowych do wartości nieoznaczalnej w stosowanych standardowo metodach.

Jeśli weźmiemy pod uwagę częstość występowania podstawowych autooprzeciwciał włączonych do kryteriów klasyfikacyjnych poszczególnych jednostek chorobowych (opublikowanych w ciągu ostatnich 20 lat) oraz przeanalizujemy możliwe przyczyny seronegatywności surowic w układowych chorobach tkanki łącznej, to hipoteza ta nabiera realnych podstaw [16]. Przykładowo w toczeniu rumieniowatym układowym jedno z dwóch podstawowych autooprzeciwciał markerowych (poza przeciwciałami dla dsDNA) – przeciwciała anty-Sm występują w zaledwie 15–30% przypadków toczenia [1, 2, 17]. Także inne autooprzeciwciała markerowe występują w zdiagnozowanych przypadkach układowych chorób tkanki łącznej, np. przeciwciała anty-Scl-70 w ok. 30%, przeciwciała anty-Jo-1 w > 20% i przeciwciała anty-Pm-Scl w > 10%. Nawet w przypadku autooprzeciwciał o stosunkowo wysokiej częstości występowania, np. przeciwciał anty-SSA, anty-CCP, margines seronegatywności sięga 20–30% [18, 19]. Część pacjentów z powodu restrykcji odpowiedzi przeciwciałowej zależnej od haplotypu HLA nie syntetyzuje określonych swoistości, ponieważ jest niewrażliwa na określone sekwencje peptydowe prezentowane komórkom układu odpornościowego [20, 21]. Te 12% surowic (ANA-dodatnich o nieustalonej swoistości) staje się bardzo ważne w indywidualnych przypadkach chorych, u których pozwalają one ustalić rozpoznanie i wdrożyć właściwe leczenie. Jest to ważne również z powodu konieczności przeprowadzenia szybkiej diagnostyki (zarówno klinicznej, jak i laboratoryjnej).

Słuszność założenia, że przynajmniej część autooprzeciwciał markerowych występuje w postaci związanej w KKI, jeśli nie liczyć autooprzeciwciał związanych w tkankach, potwierdza wysoki odsetek występowania KKI w surowicach ANA(+) o nieustalonej swoistości oraz koreluje z mianami ANA tych surowic.

Wyniki oznaczania swoistości wykonane testami *Western-blotting* i ELISA wykonane na osadach PEG-6000 w pełni potwierdziły słuszność naszych oczekiwań opartych na doświadczeniach z seronegatywnymi surowicami (od chorych z podejrzeniem boreliozy), że osady po PEG-6000 oraz frakcje  $\gamma$  z surowic seronegatywnych dla przeciwciał anty-*Borrelia burgdorferi* dają dodatnie wyniki w teście potwierdzenia *Western-blotting* stosowanym w przypadku podejrzenia o boreliozę [13].

Uzyskane wyniki pozwalają na konstatację (w pełni uzasadnioną), że w krążeniu występuje więcej niż jeden typ KKI, gdyż swoistości pojawiające się w osadach PEG-6000 z surowic nie mogą być zlokalizowane na jednej cząsteczce antygeny. Przykładowo w niektórych osadach PEG pojawiają się swoistości, takie jak anty-histon, anty-SSA i anty-SSB, anty-U<sub>1</sub>snRNP. Może to mieć zna-

czenie w przypadku zespołu nakładania, w którym występuje nakładanie się objawów klinicznych różnych chorób układowych oraz obecne są różne swoistości autooprzeciwciał [22].

Autorzy chcą także ustalić, czy pojawienie się aktywności przeciwciałowej po precypitacji glikolem polietylenowym o masie cząsteczkowej 6000 Da jest efektem prostego zgęszczenia frakcji KKI po wytrąceniu, czy jest spowodowane zmianą konformacji poszczególnych białek wchodzących w skład KKI – będzie to przedmiotem dalszych badań w Zakładzie Mikrobiologii i Serologii IR.

Wszystkie wyżej opisane doświadczenia mające na celu wyjaśnienie przyczyn seronegatywności powinny być uzupełnione analizą składu antygenowego metodami antygenowo-swoistymi, tj. takimi, które pozwalają ustalić rzeczywisty skład antygenów występujących w KKI [23]. Potwierdziłoby to w sposób oczywisty wiarygodność zaproponowanych przez autorów oznaczeń. Dodatkowo ze względu na prostotę metodyczną tego podejścia do analizy składu KKI, umożliwiłoby wprowadzenie tej metodyki do diagnozowania „trudnych” z punktu widzenia analitycznego surowic, co też będzie przedmiotem dalszych badań.

*Praca częściowo sfinansowana z grantu PBZ-KBN-119/PO/05/2005.*

#### Piśmiennictwo

1. von Mühlen CA, Tan EM. Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum* 1995; 24: 323-358.
2. Manual of Biological Markers of Disease. van Venrooij WJ, Maini RN (eds.). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Boston, London 1994.
3. Nielen MMJ, van Schaardenburg D, Reesink HW, et al. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 380.
4. Vencovský J, Macháček S, Sedová L, et al. Autoantibodies can be prognostic markers of an erosive disease in early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2003; 62: 427.
5. Ząbek J. Podstawowe zasady racjonalnej serodiagnostyki autooprzeciwciał markerowych w układowych chorobach tkanki łącznej. *Reumatologia* 2005; 43: 335-340.
6. Reis J. Współczesne metody szybkiej indykacji i immunodiagnostyki rozpuszczalnych antygenów bakteryjnych. *Post Mikrobiol* 1989; 28: 17.
7. Ząbek J, Pyka J, Krzewska I i wsp. Autoantibodies in systemic lupus erythematosus (SLE). *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska Lublin – Polonia* 2008; 43: 18-24.
8. Haugbro K, Nossent JC, Winkler T, et al. Anti-dsDNA antibodies and diseases classification in antinuclear antibody positive patients: The role of analytical diversity. *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 386-394.
9. Świerczyńska Z, Rdułtowska H, Woźniczko-Orłowska G, Ząbek J. A New method for the detection of circulating immune complexes by immunoelectrophoretic analysis. I. *Studies on DNA-*

- anti-DNA immune complexes prepared in vitro. *Reumatologia* 1979; 17: 269-277.
10. Gazda A, Ząbek J, Romicka AM i wsp. Występowanie przeciwciał antykardiolipinowych w krążących kompleksach immunologicznych u dzieci z młodzieńczym toczeniem rumieniowatym i młodzieńczym idiopatycznym zapaleniem stawów. *Pol Arch Med Wewn* 2008; 118: 10-14.
  11. Jabłońska J, Ząbek J, Kozłowska J, Krzewska I. Obecność przeciwciał antykardiolipinowych w krioglobulinach izolowanych z surowic pacjentów zakażonych wirusem zapalenia wątroby typu C. *Pol Arch Med Wewn* 2008; 118: 20-24.
  12. Lisowski J. Metody fizykochemiczne stosowane w immunologii. W: *Immunologia praktyczna*. Ślopek S (red.). PZWL, Warszawa 1970.
  13. Legatowicz-Koprowska M, Gziut I, Jezierski J i wsp. Borelioza serca – gorzka lekcja czy spóźniony sukces diagnostyczny? Opis przypadku. *Kardiologia Polska* 2007; 65: 1228-1230.
  14. Youinou P, Dueymes M, Shoenfeld Y. Autoantibody subclasses. In: *Autoantibodies*. Shoenfeld Y, Gershwin ME, Meroni PL (eds.). Elsevier. Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo. Second Edition 2007; 61-67.
  15. Smeenk R, Hylkema M. Detection of antibodies to DNA: a technical assessment. *Mol Biol Reports* 1992; 17: 71.
  16. Ząbek J. Przyczyny niepowodzeń w identyfikacji swoistości autoprzeciwciał ANA w surowicach pobranych od pacjentów z układowymi chorobami tkanki łącznej. *Reumatologia* 2004; 42: 416-426.
  17. Puszczewicz M. Przeciwciała przeciwjądrowe w diagnostyce różnicowej chorób układowych. *Reumatologia* 1998; 36: 30-41.
  18. Szmyrka-Kaczmarek M, Dziemianko I, Szechiński J. Przeciwciała antycytrulinowe w reumatoidalnym zapaleniu stawów – znaczenie diagnostyczne i prognostyczne. *Pol Arch Med Wewn* 2003; 110: 915.
  19. Ożóg-Sulikowska A. Przeciwciała przeciwjądrowe w układowych chorobach tkanki łącznej. *Nowa Klinika. Reumatologia* 2003; 8: 1144-1152.
  20. Wańkowicz A. Zjawiska autoimmunologiczne. W: *Immunologia*. Jakóbisiak M (red.). PWN, Warszawa 1995; 499.
  21. Welcker M. Clinical features of systemic lupus erythematosus. *Elias Journal* 2001; 2: 3-5.
  22. Pernice W, Sedlacek HH. Antigen-specific detection of soluble immune complexes by a solid phase specific antibody system. *J Immunol Methods* 1979; 28: 33-40.
  23. Agnello V. Immune complexes assays in rheumatic diseases. *Human Pathol* 1983; 14: 343-349.