

Ocena wiarygodności oznaczania niektórych typów swoistości przeciwciał przeciwjądrowych*

Evaluation of reliability of the test used for estimation of particular anti-nuclear antibodies' specificities

Jakub Ząbek, Agnieszka Palacz, Iwona Horbacz, Joanna Pyka

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

Słowa kluczowe: ANA, przeciwciała anti-dsDNA, przeciwciała anti-ssDNA, przeciwciała anti-Cl, awidność i krzyżowa reaktywność przeciwciał anti-DNA.

Key words: anti-nuclear antibodies, anti-dsDNA antibodies, anti-ssDNA antibodies, anti-cardiolipin antibodies, avidity and cross-reactivity of anti-DNA antibodies.

Streszczenie

Zasadniczym problemem w serodiagnostyce autoprzeciwciał są sytuacje, w których przy wysoko dodatnich mianach ANA nie można ustalić swoistości autoprzeciwciał lub, co gorsza, typ „świecenia” ANA częściowo lub kompletnie nie zgadza się ze swoistościami oznaczonymi testami w tych surowicach. Tego typu rozbieżności dotyczą ok. 5–10% surowic. Wyjaśnienie tego typu sytuacji jest celem niniejszej pracy.

Porównano 4 metody oznaczania przeciwciał anti-dsDNA, uzyskując zaledwie ok. 45% zgodności jakościowej. Analiza „wrażliwości” porównywanych testów ELISA, a także testu ANA-IIF-Hep-2, wykonana testem neutralizacji preparatami dsDNA, ssDNA i RNA, wykazała obniżenie poziomów przeciwciał anti-dsDNA oznaczanych w tych testach do wartości ujemnych. Miareczkowanie dawek antygenów użytych do neutralizacji nie wykazało różnic w dawce niezbędnej do neutralizacji dla dsDNA i ssDNA i tylko neutralizujące dawki RNA były o rząd wielkości wyższe. Ten niespodziewany wynik spowodował konieczność sprawdzenia swoistości oraz awidności przeciwciał eluowanych metodą *affinity*. Niezależnie od antygeny, z którego eluowano przeciwciała, wykazywały one reaktywność z pozostałymi antygenami, np. przeciwciała eluowane z NC (związanej z ssDNA) reagowały także z dsDNA i kardioliipiną i były to przeciwciała o niskim indeksie awidności.

Podsumowując, należy stwierdzić, że struktura i stabilność dsDNA (skutkująca obecnością fragmentów jednoniciowych) wyklucza prostą możliwość ustalenia swoistości poszczególnych pól przeciwciał anti-DNA i konieczne jest przy oznaczaniu poziomów przeciwciał dla dsDNA oznaczenie ich powinowactwa/awidności. Rozstrzygnięcie mogłyby przynieść planowane badania na syntetycznych analogach DNA, np. polinukleozydach.

Summary

The basic problem in serodiagnostics of autoantibodies concerns situations when at very high ANA titres we cannot estimate the specificity of an autoantibody or, what is even worse, the ANA pattern is partially or totally incompatible with specificities estimated by other immunoenzymatic methods. Solving this problem is the main goal of the presented work.

Comparison of four methods of anti-dsDNA assessment gives us only 45% quantitative agreement. Sensitivity of tests used for anti-dsDNA and also ANA-IIF-Hep-2 test, to neutralization by dsDNA, ssDNA and RNA, showed significant lowering of anti-dsDNA antibody levels, up to negativity. Titration of doses of antigens needed for neutralization of used tests showed no differences in neutralizing doses between ds and ssDNA and only neutralizing doses for RNA were 10 times greater.

This unexpected result caused the need to assess specificity and avidity of antibodies eluted by the affinity method.

Independently of the antigen used for elution, antibodies showed reactivity with two other antigens, for example: antibodies eluted from ssDNA bound to nitrocellulose also showed reactivity with dsDNA and cardiolipin, and generally they were antibodies of low avidity index.

To summarize, conformation and stability of dsDNA preparations (resulting from presence of denatured DNA fragment in dsDNA molecule) exclude the simple possibility of differentiation of separated antibody pools against DNA and makes (in cases of anti-dsDNA antibody assessment) affinity or avidity estimation necessary.

Solving these problems will be possible (as we planned) by using synthetic DNA analogues such as polynucleosides.

Adres do korespondencji:

dr hab. biol. Jakub Ząbek, Zakład Mikrobiologii i Serologii, Instytut Reumatologii im. prof. dr hab. med. E. Reicher, ul. Spartańska 1, 02-637 Warszawa

*Praca częściowo finansowana z grantu PBZ KBN nr 119/PO5/2005

Wstęp

W toczeniu rumieniowatym układowym (TRU) występuje ponad 30 autoprzeciwciał o znanej swoistości, przy czym do kryteriów diagnostycznych TRU włączone są przeciwciała ANA oznaczane metodą IIF na komórkach Hep-2 (jako test skryningowy) oraz dwie swoistości przeciwciał: przeciwciała dla antygenu Sm i przeciwciała dla natywnego DNA (dsDNA) [1, 2]. Przeciwciała anti-Sm i anti-dsDNA charakteryzują się wysoką swoistością w stosunku do TRU, ale w przypadku przeciwciał anti-Sm częstość ich występowania jest mała (rzędu 15–30%), a w przypadku przeciwciał dla dsDNA (częstość występowania 60–70%) ich niewątpliwą wartość diagnostyczną obniżają problemy związane z utrzymaniem „natywności” DNA w stosowanych testach oraz istotne różnice w czułości stosowanych testów [3, 4]. Ponadto, zmienia się ich powinowactwo (oraz widność) w przebiegu zaostrzenia w TRU. Dodatkowym problemem jest obecność w surowicach pacjentów z TRU przeciwciał o niskiej awidności rozpoznających jednoniciowe DNA (ssDNA), które występują także w wielu innych układowych chorobach tkanki łącznej [5, 6]. Te dwie populacje przeciwciał anti-DNA mają różny epitop docelowy, którym dla przeciwciał anti-dsDNA jest wyeksponowany w dsDNA szkielet fosfo-cukrowy, a dla przeciwciał anti-ssDNA są reszty zasad purynowych i pirymidynowych [7].

Podobnie jak struktura drugorzędowa dsDNA, a właściwie trudności z jej utrzymaniem, jest problemem w konstruowaniu testów, tak samo konformacja antygenu ssDNA może przypominać fragmentami strukturę (konformację) antygenu dsDNA – poprzez tworzenie (zwłaszcza na obu końcach antygenu ssDNA) podwójnie zapętlonych fragmentów, przypominających strukturę dsDNA, tzw. heterodupleksów [5, 8]. Na dodatek antygeny RNA, zwłaszcza występujące w kompleksach z białkami (np. RNP, Sm czy SSA i SSB), również zawierają fragmenty dwuniciowe, z wyeksponowanym szkieletem fosfo-cukrowym, analogicznie jak w dsDNA [1, 2, 9]. Jeśli zatem budowa antygenu (dsDNA) stosowanego do konstruowania testów jest tak trudna do standaryzacji, to nie dziwią istotne różnice w wartości testów (ich czułości i wiarygodności).

Jednakże, z uwagi na wartość diagnostyczną przeciwciał dla dsDNA (wysoko swoiste „markery” w TRU) oraz ww. trudności techniczne w standaryzacji testów do oznaczania przeciwciał anti-dsDNA, a skutkujące istotnymi różnicami w częstości wykrywania tych auto-przeciwciał przez różne laboratoria, np. w pracach standaryzacyjnych w ramach *European Consensus Study on Autoantibodies* (ECSA) i ogólnopolskiego grantu pt. „Opracowanie i wdrożenie wysokospecjalistycznych

procedur diagnostycznych w chorobach o podłożu immunologicznym” (nr PBZ KBN 119/PO5/2005) podjęto próbę ustalenia dodatkowych parametrów zwiększających wiarygodność oznaczania przeciwciał anti-dsDNA [10–12].

Bezpośrednim bodźcem do wykonania pracy były rozbieżności pomiędzy typem ANA uzyskiwanym w teście IIF-Hep-2 a wykrywanymi przeciwciałami dla dsDNA różnymi testami stosowanymi w diagnostyce tych auto-przeciwciał.

Materiał i metody

Badania wykonano na surowicach chorych z układowymi chorobami tkanki łącznej pochodzących z kliniki Instytutu Reumatologii, skierowanych do Zakładu Mikrobiologii i Serologii w celu oznaczenia obecności przeciwciał dla dsDNA.

Przedmiotem szczegółowego rozpracowania było 9 surowic z ww. grupy ok. 80 surowic, co stanowi 11,5% całości, w których stwierdzano podstawową niezgodność typu świecenia ANA uzyskiwanego metodą IIF na komórkach Hep-2, np. przy mianie ANA 1/640 typu plamistego uzyskiwano w metodzie ELISA wysokie poziomy przeciwciał dla dsDNA lub odwrotnie – przy mianie ANA 1/10240 o typie homogenno-plamistym brak było przeciwciał dla dsDNA.

W celu wyjaśnienia powyższych fenomenów wykonano następujące oznaczenia:

- poziomy przeciwciał przeciwjądrowych (ANA) metodą IIF na komórkach Hep-2 (firma Euroimmun) oraz neutralizacja odczynu ANA IIF preparatami kwasów nukleinowych (ds i ssDNA i RNA firmy Sigma),
- poziomy przeciwciał dla dsDNA dwoma typami testów ELISA (I i II) i *Western-blotting* oraz immunofluorescencyjnym testem z zastosowaniem utrwalonych preparatów pierwotniaka *Crithidia luciliae* (CLIFT),
- poziomy przeciwciał dla denaturowanego DNA (ssDNA) – testem ELISA firmy Biomedica,
- poziomy przeciwciał dla kardiolipiny – testem ELISA firmy Biomedica.

Wykonano także neutralizację wyżej opisanych testów do oznaczania przeciwciał dla dsDNA preparatami: dsDNA, ssDNA i preparatem RNA.

Awidność przeciwciał dla dsDNA oznaczano metodą wg Thomasa i wsp. [13], stosując do elucji z frakcji stałej (w metodzie ELISA i *Western-blotting*) 8M mocznik, natomiast awidność przeciwciał wyrażano, stosując tzw. indeks awidności (*avidity index* – AI) [13].

Wysoko oczyszczone (metodą chromatografii powinowactwa) przeciwciała dla dsDNA i kardiolipiny uzyskiwano, stosując opłaszczoną odpowiednim antygenem nitrocelulozę (NC) wg metody Gershoniego i wsp. [14].

Tabela I. Porównanie 4 metod oznaczania przeciwciał anty-dsDNA oraz rezultaty neutralizacji wybranych surowic preparatami dsDNA, ssDNA i RNA
Table I. Comparison of four methods used for anti-dsDNA antibodies estimation and results of neutralization of selected sera by dsDNA, ssDNA and RNA

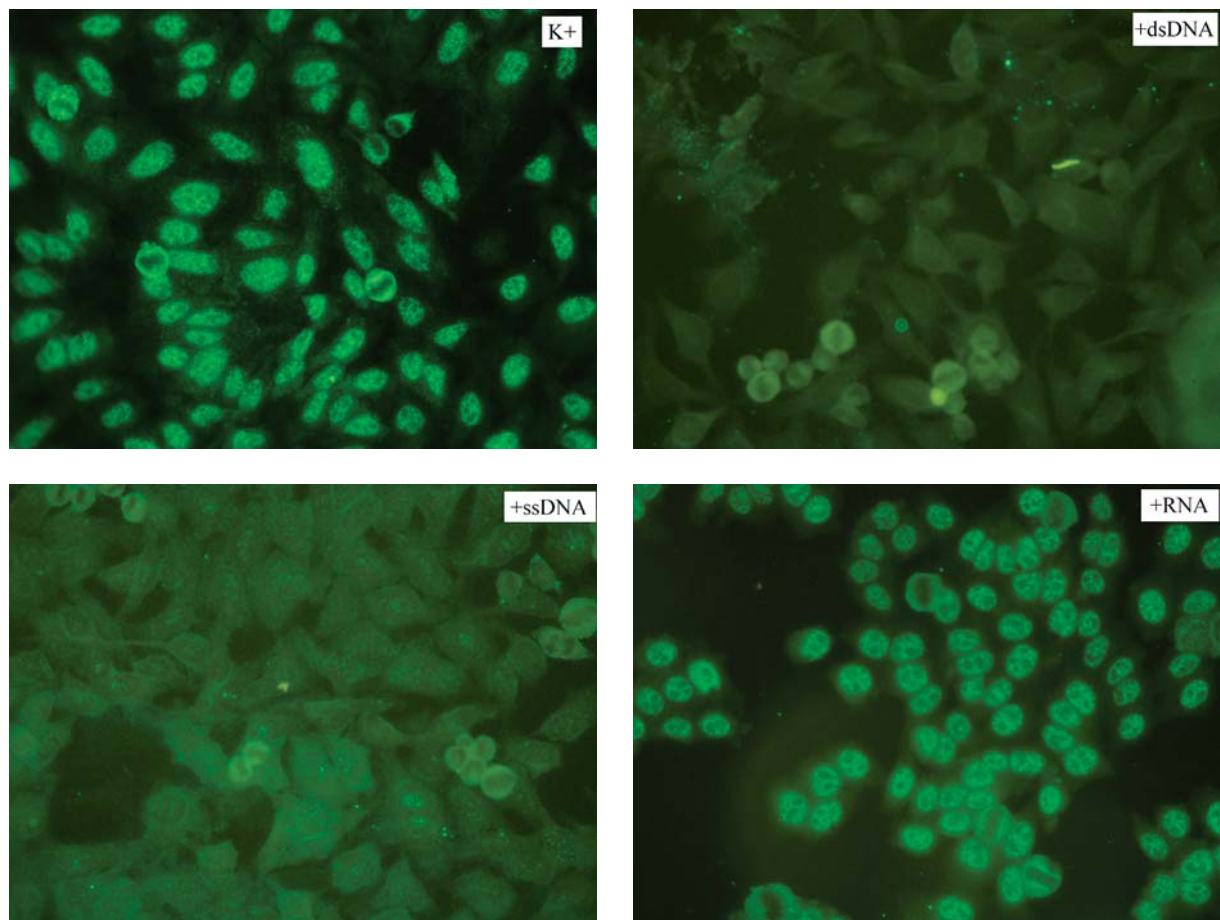
Lp.	ANA (IIS) miano	Metoda oznaczenia przeciwciał anty-dsDNA				Neutralizacja		Przeciwiata	
		ELISA I	Western- blotting	ELISA II	Crithidia luciliae	dsDNA	ssDNA	RNA	Przeciwiata anty-ssDNA (μ /ml)
1.	1/80 -	+	+	+/-	+	-	-	271,4 +	23,8 +/-
2.	1/10240 +++	-	-	+	-	-	-	640,8 +	25,1 +/-
3.	1/2560 ++	+	+	+	stabo +	-	-	547,7 +	44,8 +
4.	1/2560 ++	-	-	+	+	-	-	232,4 +	16,7 -
5.	1/320 stabo +	-	-	-	stabo +	-	-	294,8 +	11,6 -
6.	1/1280 ++	+	-	+	-	-	-	415,6 +	26,5 +/-
7.	1/160 +	+/-	-	-	-	-	-	477,7 +	34,2 +
8.	1/640 +	+	stabo +	+/-	+	-	-	204,2 +	10,5 -
9.	1/640 +	+	++	+	+	-	-	621,6 +	25,6 +/-

Wyniki

W celu wyjaśnienia „kontrowersji” dotyczących obecności przeciwciał dla dsDNA w surowicach, w których typ świecenia ANA-IIF niekoniecznie wskazywałby na obecność przeciwciał dla natywnego DNA, wykonano w pierwszym etapie porównanie wartości oznaczeń przeciwciał dla ww. dsDNA czterema różnymi typami testów (2 typy testu ELISA i *Western-blotting* oraz test z zastosowaniem pierwotniaka *Crithidia luciliae* na 9 wybranych (z 78 surowic) surowicach – takich, w których wystąpiła wyżej opisana niezgodność typu ANA z poziomami przeciwciał dla dsDNA. Oznaczano także przeciwiata dla ssDNA zwykle niebrane pod uwagę w diagnostyce TRU, ale w przypadku wyżej opisanych 9 surowic uwzględniono je z co najmniej dwóch powodów. Po pierwsze, z uwagi na charakter (typ) uszkodzeń tkanek/narządów występujących w TRU, po drugie, z powodu podnoszonych w różnych pracach uzasadnionych wątpliwości dotyczących natywności cząsteczek DNA (występujących fragmentów jednociowych w części dwuniciowej) [5, 15]. Wykonano także neutralizację surowic anty-dsDNA-pozytywnych preparatami dsDNA, ssDNA i RNA. Konieczne także okazało się oznaczenie przeciwciał antykaroliolinowych (aCl), ponieważ już wcześniej stwierdzano wrażliwość testów ELISA aCl na neutralizację różnymi preparatami kwasów nukleinowych [16, 17]. Wyniki ww. testów przedstawiono w tabeli I. Średnio w 72% (6/9 w teście ELISA I i 7/9 w teście ELISA II) uzyskano w teście ELISA wyniki dodatnie poziomów przeciwciał dla dsDNA słabo skorelowane z mianem ANA, co oznacza, że w większości surowic o wyższym poziomie ANA (niezależnie od typu świecenia) uzyskano wyższe rezultaty oznaczeń poziomów przeciwciał dla dsDNA.

Całkowitą zgodność „jakościową” poziomów przeciwciał anty-dsDNA w czterech wyżej opisanych w metodyce testach uzyskano w 4/9 badanych surowicach, co stanowi tylko 44%, częściowa zaś zgodność najczęściej dotyczyła porównywalnych 2 testów ELISA. W celu wyjaśnienia wyżej opisanych sprzeczności pomiędzy typem ANA a występowaniem przeciwciał anty-dsDNA wykonano test neutralizacji odczynów ANA-IIF oraz ELISA (dla wyżej opisanych 9 surowic) preparatami natywnego i denaturowanego DNA oraz preparatem RNA.

Wyniki neutralizacji przedstawiono w tabeli I oraz na rycinie 1. We wszystkich 9 surowicach (100%) uzyskano całkowitą neutralizację odczynu ANA-IIF ELISA preparatami dsDNA i ssDNA oraz częściową dla RNA. Niespodziewanie uzyskano także neutralizację preparatami oczyszczonego RNA, dlatego dokonano precyzyjnej oceny dawek poszczególnych preparatów zastosowanych do neutralizacji, niezbędnych do uzyskania



Ryc. 1. Przykład zmiany typu ANA po neutralizacji surowicy preparatami dsDNA, ssDNA i RNA.

Fig. 1. Example of change in ANA-IF patterns after neutralization of serum by dsDNA, ssDNA and RNA.

neutralizacji odczynu ELISA stosowanego do oznaczania przeciwciał anti-DNA. Okazało się, że preparaty dsDNA i ssDNA neutralizują wyżej opisany odczyn już przy dawkach rzędu < 1 mg/ml, natomiast preparaty wysoko oczyszczone RNA neutralizowały odczyn ELISA-anty-dsDNA w dawkach rzędu 10 mg/ml lub powyżej tej wartości, co może wskazywać, że mamy tu do czynienia z 2 różnymi typami epitopów, a neutralizacja tak dużymi dawkami jest wynikiem obecności w RNA zanieczyszczeń DNA.

Należało zatem rozstrzygnąć kwestię porównywalnej skuteczności (w neutralizacji testu ELISA) preparatu dsDNA i ssDNA – czy jest ona wynikiem obecności w czystych dsDNA fragmentach jednoniciowych, czy też rezultatem obecności w surowicach przeciwciał o zróżnicowanych swoistościach względem bogatej epitopowo cząsteczki DNA, co zostało w skrócie omówione we wstępie.

Jest to tym bardziej istotne, że we wszystkich surowicach (100%) stwierdzano umiarkowane lub wysokie

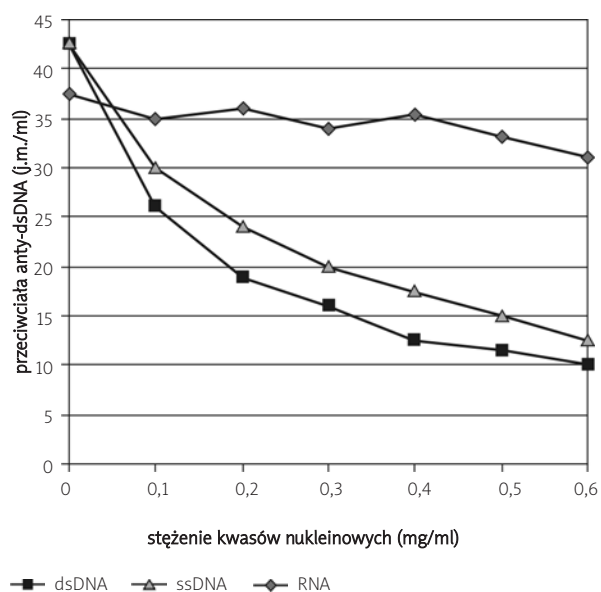
poziomy przeciwciał anti-ssDNA, a w 66% obecność (krzyżowo reagujących z dsDNA) przeciwciał dla kardiolipiny (aCl).

W celu potwierdzenia, czy rzeczywiście mamy tu do czynienia z przeciwciałami anti-dsDNA, które są przeciwciałami „markerowymi” TRU, należało znaleźć parametr różnicujący pule przeciwciał anti-DNA. Ponieważ modyfikacja metodami chemicznymi wysoko czystych dsDNA może prowadzić do denaturacji i ew. fragmentacji cząsteczek, wykonano oznaczenie awidności przeciwciał dla dsDNA i ssDNA metodą ELISA [13], wskazujących wzrost zarówno poziomów, jak i powinowactwa, a także awidności przeciwciał anti-dsDNA w trakcie zaostżenia procesu podstawowego w TRU [18]. We wszystkich 9 przypadkach (100%) uzyskano dla przeciwciał anti-dsDNA wskaźnik AI poniżej 0,25, co dowodzi, że w tych surowicach dominują przeciwciała o niskiej awidności. Również w przypadku przeciwciał dla ssDNA w większości przypadków AI był niższy lub zbliżony do 0,5, z czego

wnioskowano, że pule przeciwciał anti-ds i ssDNA częściowo mogą być tożsame.

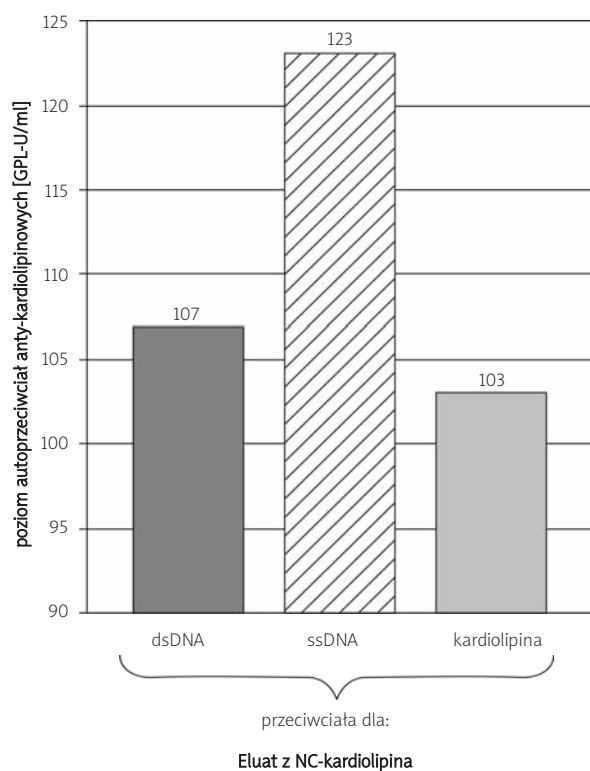
Aby ostatecznie i jednoznacznie udowodnić tę tożsamość (lub tylko częściową tożsamość) pul przeciwciał dla DNA wykonano adsorpcję przeciwciał anti-DNA z wybranych surowic metodą „powinowactwa”, stosując następujące wysoko oczyszczone antygeny: ssDNA i kardiolipinę związane z nitrocelulozą wg metody Gershoniego [14]. W uzyskanych metodą *affinity* wysoko oczyszczonych preparatach immunoglobulin oznaczano reaktywność (metodą ELISA) z antygenem homologicznym (tj. takim, na którym adsorbowano przeciwciało) oraz dwoma pozostałymi.

Wyniki oznaczania swoistości w eluatach z nitrocelulozy przedstawiono na rycinie 3. Wyniki oznaczania swoistości (krzyżowej reaktywności) przeciwciał w eluatach z NC związanej z kardiolipiną i ssDNA wskazują, iż odeluowane metodą *affinity* (powinowactwa) przeciwciała z obu wyżej opisanych immunosorbentów (NC ze związaną kardiolipiną czy ssDNA) reagują także z 2 pozostałymi antygenami, czyli przykładowo przeciwciała eluowane z ssDNA związanej z NC reagują także z dsDNA i kardiolipiną. Nie zamieszczono eluatów z NC związanej z dsDNA, gdyż ich obecność wykazano



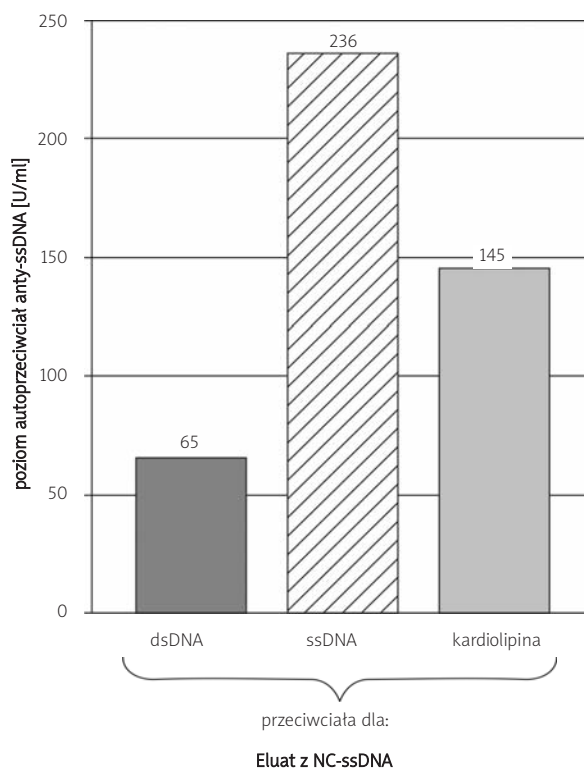
Ryc. 2. Neutralizacja testu ELISA anti-dsDNA preparatami RNA, ssDNA i dsDNA.

Fig. 2. Neutralization of the ELISA anti-dsDNA test by adding preparations of dsDNA, ssDNA and RNA.



Ryc. 3. Krzyżowa reaktywność przeciwciał z eluatów z NC związanej z ssDNA i kardiolipiną.

Fig. 3. Cross-reactivity of antibodies in eluates from NC bound to ssDNA and kardiolipin.



w wielu pracach dotyczących natywności preparatu dsDNA [1, 4, 5]. Jednoczesna analiza AI wykazała, że przeciwciała obecne w eluatach reagujące z antygenami niehomologicznymi wykazywały w 100% niski wskaźnik AI ($\leq 0,25$), a wskaźnik AI dla przeciwciał reagujących z antygenami homologicznymi był nieznacznie wyższy.

Dyskusja

Jak wykazano powyżej, istnieją zatem co najmniej dwie pule przeciwciał dla DNA, których wzajemne proporcje zmieniają się dynamicznie w przebiegu zaostrzeń procesu podstawowego w TRU, ale zmiana nie dotyczy wyłącznie poziomów, lecz także powinowactwa (awidności), która zwiększa się w trakcie zaostrzenia klinicznego [5, 18]. Proces „estymacji” wartości diagnostycznej przeciwciał dla DNA z samego założenia powinien zatem uwzględniać oznaczanie poziomów dla obu pul przeciwciał (anty-ss i dsDNA) oraz oczywiście także oznaczenie powinowactwa (ewentualnie awidności – co jest technicznie prostsze), gdyż oznaczanie samych tylko poziomów przeciwciał dla obu typów DNA, w dodatku wykonywane punktowo, nie daje pełnej informacji o natężeniu procesów patologicznych, których pośrednim wyrazem jest zmiana (wzrost) poziomów przeciwciał dla dsDNA [18]. W celu pełnego wykorzystania walorów diagnostycznych i prognostycznych przeciwciał dla dsDNA powinno się zatem oznaczać nie tylko poziomy dla ss i dsDNA, ich awidność, ale także dynamikę zmian tych parametrów w czasie – nakładającym się na wielorakie objawy kliniczne [5, 19].

Bogactwo dostępnych komercyjnie testów, różniących się swoistością i czułością, zmusza do dokładniejszego przyjrzenia się źródłom tych różnic, a zatem do przyjrzenia się cząsteczkom antygeny (DNA) stosowanym do konstrukcji testów do oznaczania przeciwciał anty-DNA [20, 21]. Podstawowe wątpliwości dotyczą natywności cząsteczki DNA, tj. występowania w cząsteczce dwuniciowego DNA fragmentów jednoniciowych, co prowadzi do pojawienia się epitopów (zasady) dla przeciwciał dla ssDNA i w konsekwencji oznaczania przeciwciał dla obu typów DNA (ss i ds). Niebezpieczeństwo to zwykle jest omijane poprzez stosowanie fagowych, kolistych cząsteczek dsDNA, np. faga MP2 ewentualnie DNA plazmidowego (np. pNC18) [5].

Przedstawiana praca dotyczy nieco bardziej szczegółowego aspektu wyżej opisanych problemów oznaczania przeciwciał dla DNA, gdyż dotyczy tych 5–10% przypadków, w których występuje ewidentna niezgodność typu ANA (uzyskiwanego metodą IIF na komórkach Hep-2) z wynikami uzyskiwanymi różnymi metodami immunoenzymatycznymi (ELISA, *Western-*

blotting) stosowanymi do oznaczania przeciwciał dla dsDNA. W pierwszym etapie dokonano porównania częstości wykrywania przeciwciał dla dsDNA trzema typami testów (po 2 typy testów ELISA i *Western-blotting* oraz test CLIFT, ponieważ chodziło o wyeliminowanie znanej z wielu prac zależności, że testy o wysokiej swoistości zwykle są testami o mniejszej czułości [5]). Najwyższą czułość wykrywania przeciwciał anty-dsDNA wykazał test immunoenzymatyczny I (78% wyników dodatnich), co nie jest zaskoczeniem w świetle wyżej cytowanych prac, a zgodność jakościowa porównywanych testów wynosiła średnio 44%. Następnie należało sprawdzić wrażliwość porównywanych testów oraz ANA-IIF w teście neutralizacji surowic preparatami dsDNA, ssDNA i RNA. Skuteczną neutralizację testu ANA-IIF uzyskano w 100% preparatów ssDNA i dsDNA i – co ciekawe – niezależnie od typu ANA (także w przypadku typu plamistego, homogenno-plamistego czy brzeźnego).

W przypadku neutralizacji odczynów immunoenzymatycznych okazało się, że preparaty dsDNA i ssDNA neutralizują wyżej opisany odczyn już przy dawkach rzędu < 1 mg/ml, natomiast preparaty wysoko oczyszczone RNA neutralizowały odczyn ELISA-anty-dsDNA w dawkach rzędu 10 mg/ml lub powyżej tej wartości, co może wskazywać, że mamy tu do czynienia z 2 różnymi typami epitopów, a neutralizacja tak dużymi dawkami jest wynikiem obecności w RNA śladowych zanieczyszczeń DNA.

Uzyskane wyniki powinny być interpretowane z niezwykłą ostrożnością, zwłaszcza jeśli się weźmie pod uwagę, że antygen ssDNA może przypominać fragmentami strukturę (konformację) antygeny dsDNA – poprzez tworzenie (zwłaszcza na obu końcach antygeny ssDNA) podwójnie zapętłonych fragmentów, przypominających strukturę dsDNA, tzw. heterodupleksów [5, 8]. Na dodatek antygeny RNA, zwłaszcza występujące w kompleksach z białkami (np. RNP, Sm czy SSA i SSB), również zawierają fragmenty dwuniciowe RNA, z wyeksponowanym szkieletem fosfo-cukrowym, analogicznie jak w dsDNA [1, 2, 9]. Ponieważ neutralizacja dotyczyła tylko surowic przy założeniu, że natywność cząsteczek DNA użytych do konstrukcji testów nie budzi zasadniczej wątpliwości, a wątpliwości dotyczą wyżej opisanych struktur antygenów użytych do neutralizacji, to można wyprowadzić ostrożny wniosek, iż brak różnic w dawce „neutralizacyjnej” pomiędzy ssDNA i dsDNA jest wynikiem częściowej homologii cząsteczek dsDNA i ssDNA. Oznacza to, że cząsteczka dsDNA zawiera fragmenty jednoniciowe, a cząsteczka ssDNA dupleksy (fragmenty dwuniciowe) w takim odsetku, że wpływa to na wynik odczynu neutralizacji [5, 8]. W pracach dotyczących obecności dupleksów w ssDNA na ogół nie jest określone, jaki odsetek struktury ssDNA

stanowią ww. dupleksy [5], ustalenie zaś odsetka fragmentów jednoniciowych w dsDNA wymagałoby każdorazowego wytrawiania DNA-azą swoistą dla jednoniciowego DNA (np. tzw. Exo-1 z drożdży) [22], co nie jest do przyjęcia w procedurze diagnostycznej. Procedura neutralizacji nie rozstrzyga więc o proporcjach pul przeciwciał dla dsDNA i ssDNA z wyżej opisanych powodów, a zatem należy powrócić do „pewnego” (wg danych literaturowych) parametru, tj. do oznaczania awidności i na eluowanych metodą powinowactwa z NC optaszczonej ssDNA i dsDNA oraz kardiolipiny przeciwciałach wykazać, że reagują one ze sobą wzajemnie.

Uzyskany dla obu pul przeciwciał niski AI (< 0,25) oraz fakt, że eluaty ww. antygenów (ss i dsDNA oraz Cl), niezależnie od antygeny, z którego były odeluowane, reagują z dwoma pozostałymi wskazuje na podział puli przeciwciał dla DNA nie na 2, ale na 3 podpule przeciwciał anty-dsDNA o wysokiej i niskiej awidności oraz pule przeciwciał anty-ssDNA o niskiej awidności [1, 5, 6], i co najmniej dodatkowo pulę przeciwciał krzyżowo reagujących (np. aCl) o niskiej awidności.

Należałoby te wstępne eksperymenty powtórzyć na większej grupie (badania w toku) oraz dodać grupę surowic uzyskanych od chorych na TRU z przeciwciałami anty-dsDNA o wysokim AI, gdyż w przypadku tej ostatniej grupy (aktywny toczeń) można by pulę przeciwciał anty-dsDNA o niskiej awidności (wykonując odczyn z 8M mocznikiem) analizować oba eluaty pod kątem typu ANA (jaki dadzą) oraz swoistości i ewentualnie krzyżowej reaktywności ze związkami zawierającymi grupy fosfoestrowe (np. fosfolipidy).

Wniosek końcowy, który nasuwa się z tych wstępnych eksperymentów, powinien brzmieć, iż samo oznaczanie przeciwciał anty-dsDNA (nawet najlepszym jakościowo testem) nie jest wystarczające, ponieważ obniża wartość diagnostyczną przeciwciał anty-dsDNA o prognozę co do stadium toczenia oraz ew. zajęcia narządów, co w danych z piśmiennictwa dotyczy przeciwciał anty-dsDNA o wysokiej „awidności” [23, 24]. Należy zatem uzupełnić diagnostykę oznaczania przeciwciał dla dsDNA o oznaczanie awidności, a zastosowana przez zespół autorów procedura, oczywiście po niezbędnym rozszerzeniu badanej grupy surowic, rokuje, że będzie przydatnym testem w wyjaśnieniu sprzeczności (pomiędzy typem ANA a wynikami testów do oznaczania przeciwciał dla dsDNA) występujących w analitycznej procedurze stosowanej do oznaczania przeciwciał dla DNA.

Piśmiennictwo

1. von Mühlen CA, Tan EM. Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum* 1995; 24: 323-358.
2. Tan EM. Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): Their immunobiology and medicine. *Adv Immunol* 1982; 33: 167-240.
3. 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: 507-514.
4. Kadłubowski M, Jackson M, Yap PL, et al. Lack of specificity for antibodies to double stranded DNA found in four commercial kits. *J Clin Pathol* 1991; 44: 246-250.
5. Hamann D, Smeenk RJT. dsDNA autoantibodies. *Autoantibodies*. Elsevier, B.V. 2007; 159-167.
6. Stollar BD. Immunochemistry of DNA. *Int Rev Immunol* 1989; 5: 1-22.
7. Haugbro JC, Nossent T, Winkler Y, et al. Anti-dsDNA antibodies and disease classification in antinuclear antibody positive patients: the role of analytical diversity. *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 386-394.
8. DNA – budowa i właściwości. W: *Genetyka molekularna*. Węgleński P (red.). PWN, Warszawa 1995; 37-44.
9. van Venrooij WJ. Autoantigens in connective tissue diseases. *Immunology of the connective tissue diseases*, ed. GS Panayi. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht, Boston, London 1994; 22: 305-334.
10. Ząbek J. Standaryzacja metod oznaczania autoprzeciwciał markerowych w ramach ECSA – cele a realne efekty. *Reumatologia* 2005; 43: 179-182.
11. Maśliński W, Ząbek J, Brzosko M, et al. Standarization of marker autoantibodies in systemic connective tissue diseases. *Cent Eur J Immunol* 2008; 33: 33.
12. Maśliński W, Ząbek J, Brzosko M. Standaryzacja w reumatologii. II Sympozjum Standaryzacja w Immunologii. VI Konferencja Naukowo-Szkoleniowa Postępy Immunopatologii w Diagnostyce Klinicznej. Poznań, 27-29 listopada 2008 (materiały Konferencji).
13. Thomas HI, Morgan-Capner P, Anders G, et al. Persistence of specific IgM and low avidity specific IgG1 following primary rubella. *J Virol Methods* 1992; 39: 149-155.
14. Gershoni JM, Poladi GE. Protein blotting: principles and applications. *Anal Biochem* 1983; 131: 1-34.
15. Rekvig OP. The immunological basis for selecting anti-dsDNA antibody assays. *Glias J* 2002; 1: 3-6.
16. Ząbek J. Przeciwciała antyfosfolipidowe. W: *Reumatologia kliniczna*. Zimmermann-Górska I (red.). Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2008; 201-206.
17. Kandiah DA, Krilis SA. Immunology and methods of detection of antiphospholipid antibodies. In: *The Antiphospholipid Syndrome*. Asherson RA, Cervera R, Piette J-Ch, Shoenfeld Y (eds). CRC Press, Boca Raton, New York, London, Tokyo 1996; 29-47.
18. Ząbek J, Pyka J, Krzewska I, et al. Autoantibodies in systemic lupus erythematosus (SLE). *Ann Univ Mariae Curie-Skłodowska Lublin – Polonia* 2008; 63: 18-24.
19. Forger F, Matthias T, Oppermann M, et al. Clinical significance of anti-dsDNA antibody isotypes: IgG/IgM ratio of anti-dsDNA antibodies as a prognostic marker for lupus nephritis. *Lupus* 2004; 13: 36-44.
20. Somerfield SD, Roberts MW, Booth RJ. Double-stranded DNA antibodies: a comparison of four methods of detection. *J Clin Pathol* 1981; 34: 1032-1035.

21. Raz E, Brezis M, Rosenmann E, Eilat D. Anti-DNA antibodies bind directly to renal antigens and induce kidney dysfunction in the isolated perfused rat kidney. *J Immunol* 1989; 142: 3076-3082.
22. Poreplikacyjna naprawa przez wycinanie niewłaściwie sparowanych zasad. W: *Genetyka molekularna*. Węgleński P (red.). PWN, Warszawa 1995; 252-254.
23. Bruggen MC, Walgreen B, Rilke T, et al. Antigen specificity of antinuclear antibodies complexed to nucleosomes determines glomerular basement membrane binding in vivo. *Eur J Immunol* 1997; 27: 1564-1569.
24. Božič B, Čučnik S, Kveder T, et al. Affinity and avidity of autoantibodies. *Autoantibodies*. Elsevier BV. 2007; 21-28.